



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologies Moléculaires

Thème

**Etude des activités antibactériennes et antioxydantes des
molécules bioactives produites par une souche d'actinobactérie
d'origine marine**

Présenté par M. AMIR Mohamed Amine

M. BELHAMRI Abdelkader

Devant le Jury :

<i>M. LOUNACI Lamia</i>	<i>Maitre de conférence B</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Président (e)</i>
<i>M. CHELGHOUH Hayet</i>	<i>Maitre de conférence B</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Examineur (ice)</i>
<i>M. RAHIM Ibtissem</i>	<i>Maitre de conférence A</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Promoteur (ice)</i>
<i>M. MATMOURA Amina</i>	<i>Maitre assistante A</i>	<i>SNV, Blida1</i>	<i>Co-Promoteur (ice)</i>

Session 2021 / 2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions "ALLAH" le tout puissant de nous avoir donné la santé, la force, le courage, la patience, la persistance et nous avons permis d'exploiter les moyens disponibles à fin d'accomplir ce modeste travail. Merci de nous avoir éclairé le chemin de la réussite.

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadreur **Dr. RAHIM Ibtissem** qui a dirigés ce travail avec une grande rigueur scientifique, nous la remercions pour sa patience, ses conseils, sa grande disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans lui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Nous tenons à remercier notre Co-promotrice **Dr. MATMOURA Amina** qui nous a enseigné la rigueur scientifique. Nous la remercions pour son aide précieuse, sa patience, les conseils et l'expérience qu'elle nous a prodigués tout au long de ce parcours.*

Nous tenons à exprimer notre respect aux membres du jury.

*Nous commençons d'abord par le **Dr. LOUNACI L.** qui a accepté de consacrer du temps à examiner et juger ce travail comme présidente de Jury. Qu'elle soit assurée de notre respectueuse considération.*

*Nos vifs remerciements vont aussi au **Dr. CHELGHOUH H.** pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant de juger et d'examiner ce modeste travail.*

*Nos sincères remerciements vont aussi au **Dr. AISSANI R.** pour l'honneur qu'elle nous a aidée par l'offre d'une gamme de germes afin de pouvoir accéder à ce travail.*

*Nous adressons, nos sincères remerciements à Mme le **Pr. DJAZOULI-Alim Z.** notre chef d'option BPM à l'USDB pour la confiance et l'aide qu'elle nous a accordé.*

Nous présentons ici le témoignage de nos sincères gratitude à tous les enseignants de l'USDB qui ont contribué à notre formation tout au long de 5 dernières années.

*Nous remercions en particulier, Mme le **Pr. MEKLAT A.** la directrice de laboratoire de biologie des systèmes microbiens de l'ENS de Kouba-Alger, de nous avoir accueilli dans le LBSM et pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de notre travail. Veuillez trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude.*

*Nous n'oublions pas de remercier également, Mme le **Pr. HADJ ZIANE A.** la directrice de laboratoire de chimie de l'USDB, et le **Dr. Timizart Z.** de nous avoir accueilli dans leur laboratoire et pour avoir mis à notre disposition le spectrophotomètre pour la réalisation de l'activité antioxydante. Veuillez trouver ici l'assurance de notre profonde gratitude.*

Nous avons croisé durant ce parcours sinueux, des personnes formidables au grand coeur, qui nous ont apporté aide et soutien sans rien demander en retour. La liste est bien longue et très éclectique; des responsables: Mr Abderrahmane, des ingénieurs de laboratoire : Mme KACI Sonia, et des doctorants : Mme LAHOUME Razika et Mr BERBER Rachid. Nous ne vous oublierons jamais.

Merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la concrétisation de ce mémoire.

Dédicace

Je dédie ce travail à :

MA TRÈS CHÈRE MÈRE

*La source de mes efforts et de mes encouragements, je vous souhaite une vie pleine de santé
et de bonheur
Merci Mama*

MON TRÈS CHER PÈRE

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation
le long de ces années. Merci papa pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien
permanent venu de toi.*

Ma chère sœur

Mes chers frères

Tous les membres de la famille AMIR et KADRI

*Vous trouverez dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la
plus sincère*

Mes chers amis : Anouar, Amine, Adel, Islem, Abdelkader
*en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons
passés ensemble*

Mes chers collègues de travail

Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite

AMIR Mohamed Amine

Dédicace

Je dédie ce travail à :

MES CHERS PARENT

MON TRES CHER FILS IYAD

MA CHERE FEMME
Mes chers frères et sœurs

Tous les membres de la famille BELHAMRI

Vous trouverez dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère

Mes chers amis
en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble

Mes chers collègues de travail
Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite

BELHAMRI Abdelkader

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction 1

Données bibliographiques

Chapitre I : Généralités

I.1. Les Actinobactéries.....	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Taxonomie des actinobactéries	3
I.1.3. Critères d'identification des actinobactéries	4
1. Critères morphologiques	4
1.1. Caractéristiques macromorphologiques	4
1.2. Caractéristiques micromorphologiques	4
2. Critères chimiques ou chimiotaxonomiques	5
3. Critères physiologiques	5
4. Critères moléculaires	6
I.1.4. Distribution des actinobactéries dans la nature.....	6
4.1. Distribution des actinobactéries du milieu marin.....	7
4.2. <i>Streptomyces</i> dans le milieu marin.....	7
4.3. Propriétés des actinobactéries marines.....	8
I.1.5. Importance des actinobactéries	8
I.2. Antibiotiques et antibiorésistance	9
I.2.1. Antibiotiques.....	9
I.2.1.1. Définition	9
I.2.1.2. Classification des antibiotiques.....	9

Sommaire

✓ Classification selon la structure chimique.....	9
✓ Classification selon le spectre d'action	9
✓ Classification selon le mécanisme d'action	10
I.2.1.3. Production des antibiotiques par les actinobactéries.....	10
I.2.2. Antibiorésistance.....	11
I.2.2.1. Origine de la résistance	12
✓ Résistance naturelle.....	12
✓ Résistance acquise.....	12
I.2.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	12
✓ Inhibition d'antibiotiques	13
✓ Modification des cibles des antibiotiques	13
✓ Empêchement de l'entrée de l'antibiotique.....	13
I.3. Activité antioxydante des molécules bioactives des actinobactéries	14

Partie expérimentale

Chapitre II: Matériels et méthodes

II.1. Matériel.....	16
II.1.1. Matériel non biologique.....	16
II.1.2. Matériel biologique.....	16
II.1.2.1. Souche d'actinobactérie marine.....	16
II.1.2.2. Germes cibles	16
II.2. Méthodes	17
II.2.1. Production, extraction, et mise en évidence des composés bioactifs par antibiographie	17
2.1. Cinétique de production des antibiotiques	17
2.2. Production et extraction des composés bioactifs.....	18
2.3. Antibiographie.....	19
II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'actinobactérie	20
II.2.3. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait de l'actinobactérie : piégeage du radical du DPPH.....	21

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1. Résultats	23
III.1.1.Choix du meilleur solvant d'extraction des composés bioactifs et antibiographie	23
III.1.2. Profil de résistance des germes cibles	24
III.1.2.Activité antibactérienne.....	26
✓ <i>Activité antibactérienne contre E. coli</i>	27
✓ <i>Activité antibactérienne contre K. pneumoniae et K.oxytoca</i>	28
✓ <i>Activité antibactérienne contre S.marcescens, E.cloacae et Citrobacter sp.</i>	29
III.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante	30
III.2. Discussion	32
Conclusion	34

Références bibliographiques

Annexes

Liste de figures

- Figure 1.** Micromorphologie de quelques de quelques genres fréquents d'actinobactéries. Les observations ont été effectuées au microscope électronique à balayage (MEB). **A** : Streptomyces **B** :Micromonospora;**C** : Nocardiosis; **D** : Saccharothrix 5
- Figure 2.** Origine des antibiotiques 11
- Figure 3.** Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques..... 14
- Figure 4.** Etapes de production et d'extraction des molécules bioactives produites par la souche *Streptomyces sp.*MBS3 19
- Figure 5.** Schéma récapitulatif des étapes de la méthode de diffusion ou des disques de papier 20
- Figure 6.** La réduction du radical DPPH• en DPPH-H..... 21
- Figure 7.** Test d'activité antibactérienne par antibiographie des différents extraits organiques de la souche *Streptomyces sp.* MBS3 contre *Escherichia coli* ATCC 8739. **A**: extrait à l'acétate d'éthyle; **B**: extrait au dichlorométhane; **C**: extrait butanolique ; **D**: extrait hexanique. Le diamètre des disques de papier (6 mm) est compris dans la mesure des activités..... 24
- Figure 8.** Activité antibactérienne de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces sp.* MBS3. Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs 26
- Figure 9.** Activité anti-*E.coli* de l'extrait l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces sp.* MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre *E. coli* ATCC 25922 (**A**), *E. coli* ATCC 8739 (**B**), *Ec 1* (**C**), et *Ec2* (**D**). Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs 27
- Figure 10.** Activité anti-Klebsielle de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces sp.* MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre *K.pneumoniae* ATCC 13883 (**A**), *Kp 1* (**B**),*Kp2* (**C**), *Kp3* (**D**), *Kp4* (**E**), *Ko* (**F**).Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs 28

Figure11.	Activité anti- <i>Entérobactéries</i> de l'extrait butanolique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre <i>Sm1</i> (A), <i>Sm2</i> (B), <i>Ecl</i> (C), et <i>Csp.</i> (D).Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs	29
Figure 12.	Essaie de la courbe standard de l'antioxydant de référence (acide ascorbique)	31
Figure 13.	Activité anti-radicalaire des différentes concentrations de l'extrait butanolique de la souche <i>Streptomyces</i> sp	31

Liste des tableaux

Tableau I. Principaux caractères physiologiques des actinobactéries.....	6
Tableau II. Distribution de quelques souches de <i>Streptomyces</i> dans les sédiments marins)	7
Tableau III. Principaux antibiotiques produits par des espèces du genre <i>Streptomyces</i>	11.
Tableau IV. Substances bioactives antioxydantes produites par les actinobactéries.....	15
Tableau V. Origines et profil de résistance des germes cibles d'origine clinique	17
Tableau VI. Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche MBS3 contre <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	23
Tableau VII. Caractéristiques des germes cibles cliniques	25

Résumé

Les infections microbiennes sont un problème de santé majeur mondial. Leur complexité réside dans la résistance croissante des pathogènes aux antibiothérapies actuelles, en plus du stress oxydatif qui pourrait aggraver les réponses immuno-inflammatoires de l'hôte. Le présent travail s'intéresse à la production, et l'extraction des molécules bioactives d'une souche d'actinobactérie marine appartenant au genre *Streptomyces* désignée MBS3, et à l'étude du pouvoir antibactérien de ces molécules *vis-à-vis* de 11 germes-cibles d'entérobactéries d'origine clinique et 3 souches de référence, ainsi qu'à l'évaluation de leur activité antioxydante

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques et la détection des phénotypes de résistance a montré que parmi les 11 souches testées, 5 souches étaient des productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), alors que 6 étaient non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (NBLSE).

L'extraction des molécules bioactives de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 a été faite le 5^{ème} jour de production à partir du filtrat de culture du milieu *International Streptomyces Project 2* (ISP2). L'antibiographie montre que parmi les quatre solvants organiques utilisés (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle, et *n*-butanol), le *n*-butanol s'est avéré meilleur pour extraire une grande partie des composés bioactifs de la souche *Streptomyces* sp. MBS3.

L'évaluation du pouvoir antibactérien de l'extrait butanolique de la souche MBS3 a été effectuée par la méthode des disques sur papier. Les résultats montrent des activités nettement fortes à très fortes contre l'ensemble des germes-cibles d'entérobactéries testés y compris les souches multi-résistantes avec des zones d'inhibition allant de 30 à 49mm, à l'exception de l'activité contre *Serratia marcescens* (Sm2), et *Klebsiella pneumoniae* (kp4), qui s'est révélée moyenne (22mm) et faible (15mm) respectivement.

Les résultats de l'activité antioxydante, mesurée *in vitro* par la technique de piégeage du radical DPPH, révèlent que notre extrait présente une activité antioxydante. La concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH est de 140µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL.

L'ensemble des résultats suggèrent que l'extrait de la souche MBS3 contient des molécules bioactives dotées du pouvoir antibactérien et antioxydant et qui pourraient constituer de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique.

Mots clés : Actinobactéries marines, *Streptomyces*, antibiorésistance, entérobactéries, activité antibactérienne, activité antioxydante.

Abstract

Microbial infections are a major global health problem. Their complexity lies in the increasing resistance of pathogens to current antibiotic therapy, in addition to oxidative stress that could worsen the host's immuno-inflammatory responses. This work focuses on the production and extraction of bioactive molecules from a strain of marine actinobacteria belonging to the genus *Streptomyces* designated MBS3, and the study of the antibacterial power of these molecules vis-to 11 enterobacteria target germs of clinical origin and 3 reference strains, as well as to the evaluation of their antioxidant activity

The study of antibiotic susceptibility and detection of resistance phenotypes showed that of the 11 strains tested, 5 strains were expanded-spectrum beta-lactamase (BLSE) producers, while 6 were expanded-spectrum beta-lactamase non-producers (NBLSE). In addition, susceptibility testing revealed that 7 bacteria showed multi-resistance, and they are classified as mutli-resistant bacteria (BMR).

Extraction of bioactive molecules from the strain *Streptomyces sp.* MBS3 was made on the 5th day of production from the culture filtrate of the medium *International Streptomyces Project 2* (ISP2). Antibiography shows that of the four organic solvents used (*n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol), *n*-butanol was better at extracting much of the bioactive compounds from the *Streptomyces sp.* MBS3.

The evaluation of the antibacterial power of the butanolic extract of the MBS3 strain was carried out by the paper disk method. The results show clearly strong to very strong activities against all enterobacteria target germs tested including multi-resistant strains with inhibition zones ranging from 30 to 49mm, with the exception of activity against *Serratia marcescens* (Sm2), and *Klebsiella pneumoniae* (kp4), which was medium (22mm) and low (15mm) respectively.

The results of the antioxidant activity, measured in vitro by the DPPH trapping technique, reveal that our extract has antioxidant activity. The concentration of the tested extract required to reduce 50% of DPPH radicals is 140µg/mL, higher than that of ascorbic acid which is 8µg/mL.

The results suggest that the extract of the MBS3 strain contains bioactive molecules with antibacterial and antioxidant properties that could be new molecules of therapeutic interest.

Keywords: Marine actinobacterials, *Streptomyces*, antibiotic resistance, enterobacteria, antibacterial activity, antioxidant activity.

تعد العدوى الميكروبية مشكلة صحية عالمية رئيسية. يكمن تعقيدها في المقاومة المتزايدة لمسببات الأمراض للعلاج الحالي بالمضادات الحيوية، بالإضافة إلى الإجهاد التأكسدي الذي يمكن أن يؤدي إلى تفاقم استجابات المضيف للالتهابات المناعية. يركز هذا العمل على إنتاج واستخراج الجزيئات النشطة بيولوجيًا من سلالة من البكتيريا الأكتونية البحرية تنتمي إلى جنس *Streptomyces* المعين MBS3، ودراسة القوة المضادة للبكتيريا لهذه الجزيئات مقابل 11 جراثيم معوية مستهدفة من أصل سريري و 3 سلالات مرجعية، بالإضافة إلى تقييم نشاطها المضاد للأكسدة.

أظهرت دراسة قابلية المضادات الحيوية للكشف عن الأنماط الظاهرية للمقاومة أنه من بين 11 سلالة تم اختبارها، كانت 5 سلالات من منتجي بيتا لآكتاماز الموسع الطيف (BLSE)، بينما كانت 6 سلالات من غير المنتجين (NBLSE). بالإضافة إلى ذلك، كشف اختبار القابلية للتأثر أن 7 بكتيريا أظهرت مقاومة متعددة، وتم تصنيفها على أنها بكتيريا متعددة المقاومة (BMR).

تم استخراج الجزيئات النشطة بيولوجيًا من سلالة *Streptomyces sp. MBS3* في اليوم الخامس من الإنتاج من وسط الزراعة (ISP2) *International Streptomyces Project 2 (ISP2)*. تُظهر السيرة المضادة أنه من بين المذيبات العضوية الأربعة المستخدمة (*n*-hexane و *dichloromethane* و *ethyl acetate* و *n*-butanol)، كان *n*-butanol أفضل في استخراج الكثير من المركبات النشطة بيولوجيًا من سلالة *Streptomyces sp. MBS3*.

تم إجراء تقييم القوة المضادة للبكتيريا للمستخلص البوتانولي لسلالة MBS3 بطريقة القرص الورقي. تظهر النتائج بوضوح أنشطة قوية إلى قوية جدًا ضد جميع الجراثيم المستهدفة المعوية التي تم اختبارها بما في ذلك السلالات المقاومة المتعددة مع مناطق تثبيط تتراوح من 30 إلى 49 ملم، باستثناء النشاط ضد *Serratia marcescens* (Sm2)، و *Klebsiella pneumoniae* (kp4)، والتي كانت متوسطة (22 ملم) ومنخفضة (15 ملم).

تكشف نتائج النشاط المضاد للأكسدة، المقاس في المختبر بواسطة تقنية احتجاز DPPH، أن مستخلصنا يحتوي على نشاط مضاد للأكسدة. التركيز المستخلص المختبر المطلوب لتقليل 50٪ من جذور DPPH هو 140µg/mL، أعلى من تركيز حمض الأسكوربيك وهو 8µg/mL.

تشير جميع النتائج إلى أن مستخلص سلالة MBS3 يحتوي على جزيئات نشطة بيولوجيًا ذات خصائص مضادة للبكتيريا ومضادة للأكسدة يمكن أن تكون جزيئات جديدة ذات أهمية علاجية.

الكلمات المفتاحية: البكتيريا الأكتينية البحرية، *streptomyces*، مقاومة المضادات الحيوية، البكتيريا المعوية، النشاط المضاد للبكتيريا، النشاط المضاد للأكسدة.

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
pH :	Potentiel d'hydrogène
°C :	Celsius
ARNr :	Acide ribonucléique ribosomique
S :	Séquences
MA :	Mycélium aérien
MS :	Mycélium du substrat
MEB :	Microscope électronique à balayage
DAP :	Acide diaminopimelique
DAB :	Acide diaminobutirique
% :	Pourcent
ISP2 :	International Streptomyces Project 2
HIV :	Human immunodeficiency virus
MDR :	Multidrugs résistantes
PBP :	Penicillin-binding proteins
ROS :	Reactive oxygen species
O ₂ :	Oxygène
OH :	Hydroxyle
NO :	Monoxyde d'azote
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
BLSE :	β lactamases à spectre étendu
LBSM :	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
ENS :	Ecole Normale Supérieure
UV :	Ultra-violet
DPPH :	2-Diphenyle-1-picrylhydrazyle

IC50 : Concentration inhibitrice à 50%

BLSE : Productrices de bêta-lactamases à spectre élargi

NBLSE : Non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi

BMR : Bactéries multi-résistantes

E. coli : Escherichia Coli

Introduction

Introduction

Les maladies infectieuses représentent la cause majeure de mortalité dans le monde et qui touchent des millions de personnes dans le monde (**Alwash et al., 2013**). L'apparition des souches résistantes aux antibiotiques usuels, l'émergence du pouvoir pathogène des souches habituellement saprophytes de notre environnement et le stress oxydatif associé à la réponse de l'hôte sont les principaux facteurs de la forte recrudescence de ces maladies (**Bagre et al., 2007**).

L'antibiorésistance résulte de l'usage massif des antibiotiques qui exercent une pression de sélection et favorisent l'émergence de gènes de résistance chez les bactéries aboutissant à des souches multirésistantes *vis-à-vis* de plusieurs antibiotiques à la fois (*multidrug resistant* ou MDR). Ces bactéries sont responsables des infections graves (**Courvalin et Philippon, 1990; Bevilacqua, 2011**).

Au cours des deux dernières décennies, il a été clairement établi que ces infections déclenchent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) en faveur d'un stress oxydatif (**Alexander et al., 2017**). Le stress oxydatif est défini comme un déséquilibre entre la production des ROS/RNS et leur neutralisation par les mécanismes de défense antioxydant. Le ROS/RNS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires (**Moukette et al., 2015 ; Jadeja et al., 2017**).

La recherche de nouvelles molécules thérapeutiques avec un effet antibactérien et antioxydant semble être nécessaire. Les actinobactéries sont particulièrement très intéressantes par leur très grande capacité à produire différents composés à intérêt pharmaceutique, tels que les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux, les antiparasitaires, les antioxydants et les antitumoraux, mais aussi, les vitamines, les enzymes, les immunostimulants, les antihistaminiques, les vasodilatateurs, etc (**Valan Arasu et al., 2008; Genilloud et al., 2011 ; Jose et Jebakumar., 2013**).

Les actinobactéries terrestres ont été fortement exploitées comme source de nouvelles biomolécules. De ce fait, la probabilité d'isoler de nouvelles molécules bioactives à partir de ces microorganismes est devenue faible au fil du temps. Les travaux actuels tentent à isoler les actinobactéries des habitats non explorés et sous-explorés comme les écosystèmes marins (**Lee et al., 2014**).

C'est dans cette optique que s'inscrit ce travail qui consiste à rechercher de nouvelles molécules bioactives, à activités antioxydante et antibactérienne extraites d'une souche d'actinobactérie d'origine marine. Cette étude s'articule autour de trois volets :

Introduction

- Le premier volet concerne la production, l'extraction, et la mise en évidence des composés bioactifs par antibiographie, de la souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. « MBS3 ».
- Le deuxième comprend l'étude de l'activité antibactérienne de l'extrait de la souche MBS3 contre des entérobactéries d'origines cliniques.
- Enfin le troisième volet consiste à évaluer l'activité antioxydante de l'extrait de la souche MBS3 *in vitro* par piégeage du radical du DPPH.

Données bibliographiques

I.1. Les Actinobactéries

I.1.1. Définition

Les actinobactéries, appelées auparavant actinomycètes (**Perry et al., 2004**), sont des bactéries à Gram-positif dont la plupart sont mycéliennes, et ayant toutes un taux de guanine + cytosine (G+C) dans leur ADN supérieur à 55%. Elles forment en outre un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S) (**Manuel de Bergey, 2012**).

Etymologiquement, le mot « actinomycète » est dérivé des mots grecs « Aktis » qui veut dire rayon et « mykes » qui veut dire champignon, et ce, en raison de la formation de colonies mycéliennes rayonnantes (**Subramaniam et al., 2016**).

Les actinobactéries étaient considérées comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les vrais champignons (**Waksman, 1950**). Cependant, la découverte de leur structure cellulaire fine et de la composition chimique de leur paroi en 1950, a permis par la suite de les classer définitivement parmi les organismes procaryotes (**Wellington et Ul-Hassan., 2009**).

Leur paroi ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries (**Hubert et Lechevalier, 1985**), elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles aux lysozymes et aux agents antibactériens ; le diamètre de leurs hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**).

La croissance des actinobactéries donne lieu à des colonies circulaires (**Colombié, 2005**). La majorité des actinobactéries ne sont pas mobiles, et quand la mobilité est présente, elle est limitée en général à la production de spores flagellées (**Makhijani, 2008**). La plupart des actinobactéries sont des saprophytes capables d'utiliser une grande variété de sources nutritionnelles, y compris divers polysaccharides complexes (chitine, kératine, cellulose, lignine, etc.). Elles sont principalement neutrophiles et mésophiles (pH optimal entre 7,0 et 7,5 et une température entre 28 et 30 °C) (**Ait Barkaet al., 2016**). Certains espèces sont thermophiles tolérant des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

I.1.2. Taxonomie des actinobactéries

La classification des actinobactéries a subi un profond remaniement sur la base des données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S). Actuellement, les actinobactéries sont classées dans le Domaine des *Bacteria*, le Phylum des *Actinobacteria*, la Classe des *Actinobacteria* et la Sous-Classe des *Actinobacteridae* (**Euzéby, 2015**). Le phylum des *Actinobacteria* contient 6 classes, 22

ordres, 53 familles, 222 genres et environ 3000 espèces (Ludwig *et al.*, 2012 ; Manuel de Bergey, 2012), alors qu'il contenait en 2004 une seule classe (*Actinobacteria*) et un seul ordre (*Actinomycetales*) (Manuel de Bergey, 2004). Les genres sont caractérisés par une diversité morphologique importante, allant du simple cocci (ex.: *Micrococcus*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées (ex.: *Nocardia*) ou non (ex.: *Streptomyces*). Les genres d'actinobactéries les plus courants sont *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* (El-Tarabily et Sivasithamparam, 2006).

I.1.3. Critères d'identification des actinobactéries

La taxonomie des actinomycètes est basée sur une approche poly-phasique qui repose sur plusieurs critères: morphologiques, chimiques (analyse des constituants cellulaires), physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Badji, 2006).

1. Critères morphologiques

Les critères morphologiques sont énoncés dans les manuels de Bergey et consistent en une caractérisation macromorphologique et micromorphologique (Manuels de Bergey, 2012).

1.1. Caractéristiques macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois à différencier les groupes d'actinobactéries entre eux. Ces caractères reposent sur une observation à l'oeil nu et sont basés sur (Saker, 2015 ; Harir, 2018):

- La production ou non d'un mycélium aérien (MA).
- La présence ou non d'un mycélium du substrat (MS).
- La détermination de la couleur du MA et du MS ainsi que celle des pigments diffusibles dans le milieu de culture dans le cas où ils sont sécrétés.

1.2. Caractéristiques micromorphologiques

Réalisée par observation au microscope optique et parfois électronique des colonies Il s'agit de noter (Figure 1) (Harir, 2018):

- La fragmentation ou non des mycéliums.
- La présence des spores (forme, mobilité, surface, disposition sur les hyphes, nombre)
- La présence ou non de sporanges sur le mycélium aérien (MA) ou sur le mycélium de substrat (MS), et la forme et la taille des sporanges.
- La formation ou non de structures spéciales.

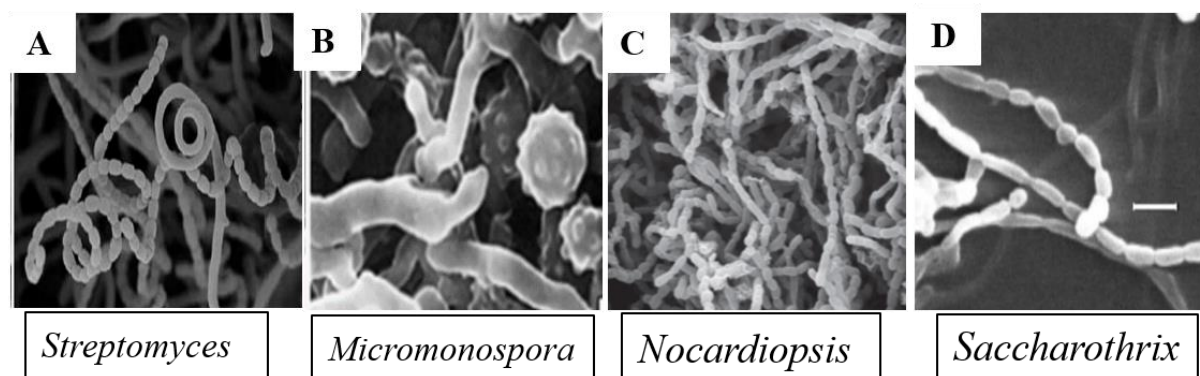


Figure 1. Micromorphologie de quelques de quelques genres fréquents d'actinobactéries. Les observations ont été effectuées au microscope électronique à balayage (MEB). **A** : *Streptomyces* (**Belyagoubi, 2014**); **B** : *Micromonospora* (**Prescott et al., 2002**); **C** : *Nocardioopsis* (**Boubetra et al., 2013**); **D** : *Saccharothrix* (**Camas et al., 2014**).

2. Critères chimiques ou chimiotaxonomiques

Les critères chimiques consistent en la détermination de la composition cellulaire en acides aminés pariétaux, en glucides totaux, en phospholipides, en ménaquinones et en acides gras membranaires (**Manuel de Bergey, 2012**). Les deux acides aminés pariétaux taxonomiquement importants sont l'acide diaminopimelique (DAP), et la glycine qui peut être présente ou absente (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**). Le DAP peut être parfois remplacé par la lysine, l'ornithine et l'acide diaminobutyrique (DAB) (**Becker et al., 1965**). Les sucres ayant une importance taxonomiques sont principalement les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose », « rhamnose-galactose », ou encore le madurose (**Lechevalier et Gerber, 1970**).

Les lipides cellulaires tels que les acides mycoliques pariétaux qui peuvent être présents ou absents, les phospholipides ainsi que les ménaquinones membranaires sont aussi importants pour l'identification des actinobactéries. L'analyse des phospholipides a permis de distinguer plusieurs genres ayant entre eux même morphologie et le même type pariétal (**Lechevalier et al., 1977**).

3. Critères physiologiques

Les critères physiologiques sont utilisés pour la détermination des espèces d'actinobactéries. Ils consistent en :

- Des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.),
- Des tests de résistance à différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents),
- Des tests de croissance et de tolérance à différents conditions de pH, température, salinité, etc (**Tableau II**).

Tableau I. Principaux caractères physiologiques des actinobactéries (Djaballah, 2010).

Caractères physiologiques	Caractéristiques
pH	Neutrophile : Neutre ou peu alcalin 5-9 (Lee et Hwang, 2002)
Température	Mésophile à thermophile 50 °C- 60 °C (Holt et al., 1994)
Oxygène	- Formes oxydatives aérobies, - Formes fermentatives anaérobies (Silini, 2012)
Taux d'humidité	Faible à modérés (Oskay et al., 2004 ; Prescott et al., 2010)

4. Critères moléculaires

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie des actinobactéries sont :

- Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S,
- Le taux d'hybridation ADN-ADN (Wayne et al., 1987),
- La détermination du pourcentage de guanine-cytosine (Coefficient de Chargaff, GC%) de l'ADN génomique (Stackebrandt et al., 1981).

I.1.4. Distribution des actinobactéries dans la nature

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans la plupart des niches écologiques (Narayana et al., 2008 ; Boudjelal, 2012). La grande majorité est d'origine tellurique et c'est à partir du sol que ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes: l'air, composts, les eaux (douces, lacs, rivières, ruisseaux, mers et océans), les fourrages, les fumiers, les graines de céréales, les débris des végétaux, le pollen, les abeilles mellifères, les plantes en culture (endophytes), les lichens, les systèmes d'air climatisé, la poussière de maison, le foin et les pailles, les résidus fibreux de canne à sucre et bien d'autres substrats (Promnuan et al., 2011 ; Boudjelal, 2012).

Cette capacité de colonisation des milieux très divers est due à leur capacité d'adaptation et leur résistance à certaines conditions hostiles par formation des hyphes ramifiés et des spores (Sudhanshu et al., 2011 ; Panchanathan et al., 2013). Les spores leur permettent de résister pendant longtemps aux conditions hostiles de froid, des teneurs en sels élevées ou des pressions élevées (Zaitlin et al., 2003). Leur temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (Larpen et Sanglier., 1989).

De plus, leur grande capacité d'adaptation aux différentes conditions environnementales et leur grande variabilité métabolique ont permis d'être répartis dans les écosystèmes extrêmes particuliers, tels que les sols désertiques hyper-arides (Sabaou et al., 1998; Okoro et al., 2009), les glaciaires (Zhang et al., 2012), les sols pollués par les hydrocarbures ou par les

métaux lourds, les sédiments marins profonds (**Pathom-aree et al., 2006**), les eaux usées, l'eau des fjords (**Hakvåg et al., 2008**) ou encore les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (**Kitouni, 2007**).

4.1. Distribution des actinobactéries du milieu marin

Les actinobactéries d'origine marines ont été isolés dans le monde entier, allant des sédiments côtiers peu profonds aux sédiments les plus profonds de la fosse des Mariannes. Il semble qu'elles soient largement distribuées dans : tout l'océan, les zones intertidales, l'eau de mer, les animaux (**Ramesh et Mathivanan, 2009**), les plantes (**Castillo et al., 2005**), les éponges et les algues (**Sun et al., 2010**), et dans les sédiments océaniques (**Sivakuma et al., 2007**).

4.2. *Streptomyces* dans le milieu marin

Plusieurs espèces des genres *Streptomyces* ont été isolées à partir d'environnement marin ces dernières années ce qui montre la richesse de ce milieu en ces genres. Ils sont parmi les populations les plus prédominantes dans les sédiments marins (**Tableau III**) (**Maldonado et al., 2009**).

Tableau II. Distribution de quelques souches de *Streptomyces* dans les sédiments marins

Espèces	Prévenance	Références
<i>Streptomyces oceani</i>	Sédiment de la mer de Chine méridionale	Tian et al., 2012
<i>Streptomyces alkaliphilus</i>	Sédiments du lac Elmenteita dans la vallée du Rift au Kenya	Akhwale et al., 2015
<i>Streptomyces chitinivorans</i>	Sédiments lacustres estuariens	Ray et al., 2016
<i>Streptomyces mutabilis</i>	Sédiments de la mer Rouge, côte d'Hurghada	Hamed et al., 2018
<i>Streptomyces chartreusis</i>	Sédiment de l'île de Xiamen, Fujian, Chine	Jiang et al., 2018

4.3. Propriétés des actinobactéries marines

Selon certains chercheurs, les souches d'actinobactéries isolées du milieu marin ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer alors que selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinobactéries isolée propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et sa température optimale faible (**Theilleux, 1993 ; Okasaki, 2006**). Cependant, en 2002, **Mincer et al.**, ont isolé, à partir du milieu marin, des souches d'actinobactéries nécessitant de l'eau de mer pour leur croissance, et ces souches ont été désignées comme actinobactéries marines.

Les écosystèmes marins sont considérés comme de riches sources d'actinobactéries rares métaboliquement actifs, avec un potentiel énorme pour produire de nouveaux composés intéressants (**Hong et al., 2009**). En effet, comme les conditions environnementales de la mer sont extrêmement différentes des conditions terrestres, les actinobactéries marines pourraient avoir des caractéristiques différentes des actinobactéries terrestres et pourraient donc produire de nouveaux composés bioactifs et de nouveaux antibiotiques (**Subramani et Aalbersberg., 2013**).

1.1.5. Importance des actinobactéries

Les actinobactéries suscitent beaucoup d'intérêts, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique (**Boucheffa, 2011**). Ainsi, d'autres métabolites sont également synthétisés. En plus du domaine pharmaceutique, ces molécules bioactives jouent un rôle primordial dans autres domaines comme le domaine agronomique, alimentaire et environnemental (**Nouioui, 2014**).

On estime que les deux tiers des quelques six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les actinobactéries. On estime qu'environ 45% des métabolites d'origine microbienne sont produits par ce groupe, dont plus de 55% d'antibiotiques. La richesse des actinobactéries dans ce domaine a été démontrée par **Selman Waksman**. Dans ses laboratoires il a isolés quatre premiers antibiotiques : l'actinomycine (1940), la streptomycine (1944), la néomycine (1949) et la candidicine (1953).

Les actinobactéries sont également la source de substances à large spectre d'activité biologique: antibactérienne, antivirale, antitumorale, immunostimulant, immunosuppresseur, antiparasitaire, antioxydante, cytotoxique et anti-enzymatique,...etc (**Takahashi et Omura, 2003; Kahana et al., 2008 ; van Bergeijk et al., 2020**).

Ces produits naturels ont des potentialités de lutter contre certaines maladies majeures comme le cancer, le HIV, l'infection du protozoaire et d'inflammations sévères (**Hassan et al., 2017**).

I.2. Antibiotiques et antibiorésistance

I.2.1. Antibiotiques

I.2.1.1. Définition

Le terme “antibiotique” est dérivé des mots grecs “*anti*” qui veut dire contre et “*bios*” qui signifie la vie, c'est-à-dire, “contre la vie”. Un antibiotique est une substance d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique, capable de tuer les germes pathogènes ou d'inhiber leur croissance à faible concentration et sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). Un antibiotique peut être antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiviral, inhibiteur d'enzymes, ou encore antiparasitaire, insecticide et herbicide, etc. (Demain, 1999; Barka *et al.*, 2016; Mohammadipanah et Wink, 2016).

I.2.1.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives présentant différentes structures chimiques. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères: la structure chimique, l'origine, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Yala *et al.*, 2001).

✓ Classification selon la structure chimique

Un système de classification, répartit les antibiotiques dans neuf grandes familles chimiques, est le plus utilisé en recherche fondamentale (Tableau 01, Annexe 01) (Becker *et al.* 1965). :

- Antibiotiques contenant des glucides,
- Lactones macrocycliques,
- Quinones et antibiotiques apparentés,
- Acides aminés et peptides,
- Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote,
- Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène,
- Antibiotiques aromatiques,
- Antibiotiques alicycliques,
- Antibiotiques aliphatiques.

✓ Classification selon le spectre d'action

Définit par l'activité antibactérienne d'un antibiotique qui peut être actif contre les bactéries à Gram positif et/ou les bactéries à Gram négatif et/ou les champignons parfois même contre d'autres microorganismes tels que les virus et les protozoaires. Le spectre d'action des antibiotiques pourrait être étroit ou large. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large (Harir, 2018).

✓ Classification selon le mécanisme d'action

Les antibiotiques sont classés selon leur cible moléculaire sur lesquelles ils peuvent agir au niveau cellulaire à différents niveaux (**Pebret, 2003; Walsh, 2003**):

- Au niveau de la paroi en inhibant la synthèse du peptidoglycane (ex.: β -lactamines).
- En détruisant les membranes cellulaires, externe et cytoplasmique (ex.: polymyxines B et E).
- En inhibant la synthèse de l'acide nucléique par action sur l'ADN (ex.: quinolones et fluoroquinolones) et par action sur la synthèse d'ARN (ex.: rifampicine).
- En inhibant la synthèse protéique (ex.: macrolides, phénicoles et certains aminosides).
- En modifiant le métabolisme par interférence avec des métabolites (ex.: sulfamides).

I.2.1.3. Production des antibiotiques par les actinobactéries

Les actinobactéries constituent, actuellement, la source majeure des antibiotiques (**Hamaki et al., 2005**). Elles produisent plus de 6000 molécules d'antibiotiques chimiquement différentes. Une grande fraction d'antibiotiques sur le marché provient d'actinobactéries. Au sein de ce groupe, le genre *Streptomyces* est le plus grand producteur, où approximativement, plus de deux tiers des milliers d'antibiotiques (75% des antibiotiques) et d'autres molécules bioactives naturels ont été isolés principalement par ce genre (**Omura, 1992 ; Ravel et al., 2000**).

De nombreuses études se sont récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinobactéries appelées « rares » ou peu fréquentes, mais qui sont en fait les actinobactéries autres que le genre *Streptomyces*, largement prédominant dans la nature. De nombreux antibiotiques intéressants ont été isolés à partir de ces genres tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, etc. (**Figure 2**) (**Sarkar et al., 2008; Genilloud et al., 2011**). Les principaux antibiotiques secrétés par les espèces de *Streptomyces* sont répertoriés dans le tableau III.

Tableau III. Principaux antibiotiques produits par des espèces du genre *Streptomyces* (Madigan et Martinko., 2007).

Espèce productrice	Dénomination commune	Classe d'antibiotique
<i>S. griseus</i>	Streptomycine	Aminoglycosides
<i>Streptomyces</i> sp.	Spectinomycine	
<i>S. fradiae</i> .	Néomycine	
<i>S. auréofaciens</i>	Tétracycline	Tétracyclines
<i>S. lincolnensis</i>	Erythromycine Clindamycine	Macrolides
<i>S. venezuelae</i>	Chloramphénicol	Phénicolés

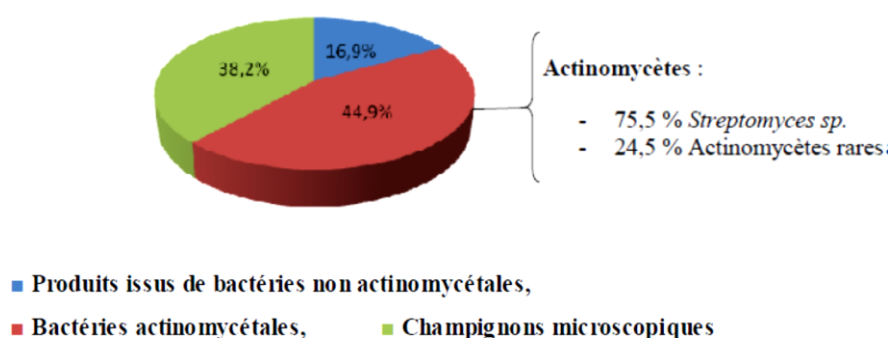


Figure 2. Origine des antibiotiques (Berdy, 2005).

I.2.2. Antibiorésistance

La découverte des premiers agents antibactériens, sulfamides en 1935, puis pénicilline au lendemain de la seconde guerre mondiale, avait suscité le grand espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, révolutionné la médecine moderne, a fortement diminué la souffrance humaine et le taux de mortalité et de morbidité mondiale. L'usage massif des antibiotiques a abouti, non à l'élimination des infections mais à apprendre aux microbes à résister à ces antibiotiques en exerçant une pression de sélection qui a favorisée l'émergence de gènes de résistance chez les bactéries aboutissant à des souches multirésistantes vis-à-vis de plusieurs antibiotiques à la fois (*multidrug resistant* ou MDR) responsables d'infections graves. Ces dernières années la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un phénomène mondial inquiétant (Courvalin et Philippon, 1990; Bevilacqua, 2011). Parmi les bactéries pathogènes qui sont devenues de vrais problèmes pour la santé humaine, on trouve des espèces appartenant aux familles des Entérobactéries, des

Pseudomonadacés et des bactéries de la famille des Acinetobacter qui sont quasiment résistantes à tous les antibiotiques prescrits (**Chaudhary, 2016**).

Face à ce problème, beaucoup d'études ont été réalisées pour développer des molécules alternatives efficaces contre ces maladies infectieuses. Les actinobactéries constituent une source importante de molécules bioactives qui pourraient être exploitées dans la thérapie des maladies infectieuses. Les métabolites secondaires produits par les actinobactéries présentent un grand nombre d'effets biologiques divers, d'abord des activités antimicrobiennes. L'ordre des *Actinomycetales* sont célèbres producteurs de métabolites bioactifs avec une expérience professionnelle de plus de 10 000 agents antimicrobiens à usage clinique (**Demain, 2009**).

I.2.2.1. Origine de la résistance

La résistance bactérienne aux antibiotiques aurait deux origines essentielles, naturelles et acquise. La première est programmée au niveau du pool génomique alors que la seconde est développée en fonction des conditions métaboliques (**Julian et Dorothy., 2010**).

✓ Résistance naturelle

C'est une résistance intrinsèque, commune à une population, due essentiellement à la présence de gènes spécifiques (**Allen et al., 2010**). Elle se caractérise par des modifications structurales, dans le cas de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, et métaboliques, dans le cas du bacille de la tuberculose insensible à un grand nombre d'antibiotiques en s'opposant à l'action des antibiotiques par le biais de son métabolisme original. Les gènes de résistance sont exprimés soit d'une manière constitutive ou bien induite en répondant à un signal enzymatique établi par la mise en œuvre d'un processus d'échappement vis-à-vis de l'antibiotique (**Doyle, 2006**).

✓ Résistance acquise

Il s'agit d'une acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ceci conduit à des modifications dans le profil d'expression génique via des mutations ponctuelles (au niveau du chromosome) ou acquises (transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons). Grâce à ce processus, les bactéries partagent entre elles des informations génétiques, ce qui leur confère un très grand pouvoir d'adaptation aux milieux environnementaux qu'elles habitent (**Yala et al., 2001 ; Springman et al., 2009**).

I.2.2.2. Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques ont été largement étudiés, et de nombreuses cibles des fonctions cellulaires ont été impliquées dans ces mécanismes

(Giedraitiene et al., 2011). Les sites de résistance sont variables entre les espèces bactériennes, et ils sont classés en plusieurs voies. Dans certains cas, au sein de la même souche bactérienne, on peut trouver plusieurs mécanismes de résistance différents (**Figure 3**) (Marshall et al., 2009).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être regroupés en trois grands types (**Figure 3**) (Levry et Maishall., 2004):

✓ **Inhibition d'antibiotiques :**

Certaines bactéries synthétisent des enzymes qui inhibent l'action des antibiotiques en dégradant ou en modifiant ce dernier. La modification des antibiotiques peut se faire de différentes façons selon les réactions chimiques catalysées (l'acétylation, la glycosylation, la nucléotidylation, la substitution, la ribosylation et/ou la phosphorylation). La modification induite, par ces enzymes, peut inactiver certains antibiotiques tels que les aminoglycosides, le chloramphénicol, les streptogramines, les macrolides et les rifampicines ou bien diminuer leurs affinités vis-à-vis de leurs cibles (Dzidic et al., 2008). Les enzymes qui réalisent le blocage et/ou la dégradation des antibiotiques sont diverses. Par exemple, la β -lactamase est une métalloenzyme (possédant le zinc comme cofacteur) détruisant les antibiotiques de la famille des β -lactamines (Jacoby et Munoz-Price., 2005).

✓ **Modification des cibles des antibiotiques :**

Le deuxième mécanisme de résistance est celui qui affecte les cibles des antibiotiques. Dans certaines situations, la bactérie modifie l'affinité de ses protéines de liaison à des antibiotiques spécifiques. Par exemple, certaines souches pathogènes telles que *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* et *Shigella dysenteriae* modifient l'affinité des protéines de liaison à la pénicilline (*penicillin-binding proteins, PBP*), ce qui leur permet de résister à des antibiotiques de la famille des β -lactamines (les antibiotiques qui ciblent spécifiquement les enzymes de synthèse de la paroi bactérienne) (Poole, 2004). En plus de la modification enzymatique, certaines souches pathogènes mobilisent le positionnement de leurs organites pour échapper à l'action des antibiotiques. Par exemple, les ARN ribosomiques de méthylation (rRNA methylase), suite à des mutations chromosomiques, modifient l'emplacement topologique des ARNr 16S vers des positions spécifiques privilégiant ainsi ces complexes de l'action des antibiotiques de la famille des Aminoglycosides (Jana et Deb., 2006).

✓ **Empêchement de l'entrée de l'antibiotique :**

Certaines souches bactériennes empêchent les antibiotiques de rentrer dans la cellule bactérienne, et cela grâce à un mécanisme de transport particulier dit pompe à efflux qui leur permet d'exporter les antibiotiques à l'extérieur (Li et Nikaido., 2009).

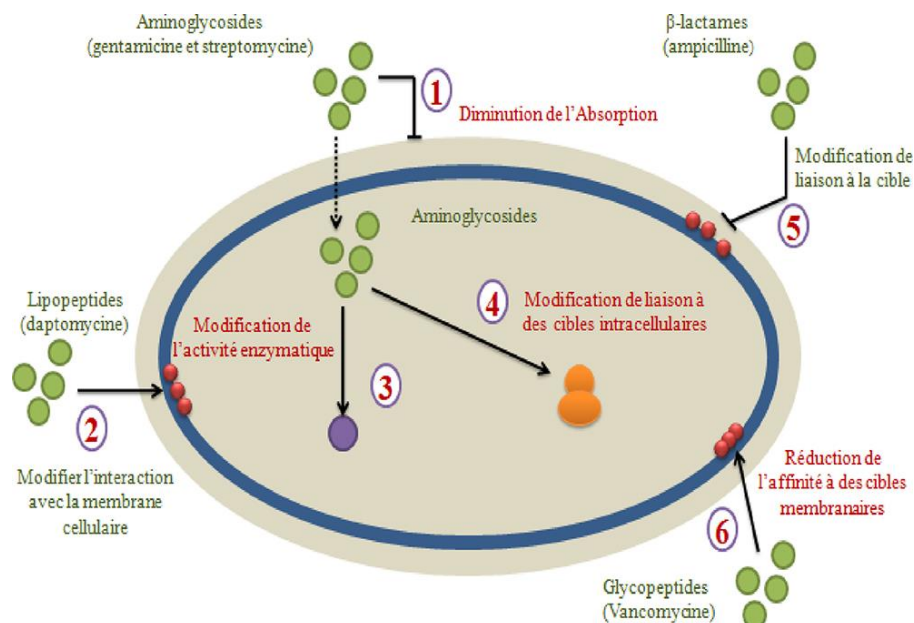


Figure 3. Schéma général des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Bouyahya *et al.*, 2017).

Les bactéries possèdent différents modes de résistance aux antibiotiques. 1) Diminution de l'adsorption des aminoglycosides. 2) Modification de l'interaction des lipopeptides avec la membrane cellulaire. 3) Modification de l'activité enzymatique des aminoglycosides. 4) Modification de liaison des β-lactamines à des cibles intracellulaires. 5) Modification de liaison à des cibles membranaires. 6) Réduction de l'affinité des glycopeptides à des cibles membranaires.

I.3. Activité antioxydante des molécules bioactives des actinobactéries

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

- selon leur cible et leur mécanisme d'action : les antioxydants primaires et les antioxydants secondaires.
- selon leur origine : les antioxydants naturels (synthétisés dans l'organisme ou amenés par l'alimentation) ou synthétiques.

L'oxydation des molécules est due à la génération massive des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cette surproduction de ROS résulte d'un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants et antioxydants définis comme un stress oxydatif (Sid *et al.*, 2013).

Ce déséquilibre peut se produire quand le système de défense antioxydant est surmené par l'augmentation des oxydants ou lorsque les défenses sont affaiblies par une carence d'apport et/ou de production d'antioxydants (Kirschvink *et al.*, 2008).

L'appellation ROS n'est pas restrictive, elle inclut les radicaux libres de l'oxygène proprement dit : radical superoxyde O_2^\bullet , radical hydroxyl OH^\bullet , monoxyde d'azote NO^\bullet , mais aussi certains dérivés oxygénés réactifs non radicalaires dont la toxicité est importante : l'oxygène singulet 1O_2 , peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , peroxydinitrite $ONOO^-$ (Labioud, 2016).

Les ROS oxydent et endommagent les macromolécules comme l'ADN, les protéines et les lipides conduisant à des lésions cellulaires (Moukette *et al.*, 2015 ; Jadeja *et al.*, 2017). La génération excessive de ROS épuise les antioxydants endogènes, qui par la suite, ne parviennent pas à piéger tous les ROS conduisant à des lésions cellulaires associées à diverses pathologies, comme le cancer, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires, infectieuses et neuro dégénératives (Jadeja *et al.*, 2017).

Les actinobactéries d'origine marine sont des fournisseurs potentielle de nouveaux métabolites bioactives et sont actuellement considérées comme une source important d'énergie (Mohankumer *et al.*, 2012).

Les actinobactéries isolées des sédiments marins peuvent être la source potentielle d'antioxydant avec propriétés anticancéreuses (Tableau V) (Shin *et al.*, 2008 ; Arumugam *et al.*, 2010 ; Nagaseshu *et al.*, 2016).

Tableau IV. Substances bioactives antioxydantes produites par les actinobactéries.

Substance antioxydante	Source	Référence
5-(2,4 diméthylbenzyl) pyrrolidin-2-one	Marine Streptomyces VITSVK5	Takamatsu <i>et al.</i> , 2003
(Z)-1-((1-hydroxypenta-2,4-dien-1-yl)oxy)anthracene-9,10-dione.	<i>Nocardiosis alba</i>	Avilala <i>et al.</i> , 2013
ABTRI12	<i>Streptomyces sp.</i>	Arulappan <i>et al.</i> 2012
Dihydroherbimycin	<i>Streptomyces sp.</i>	Chung <i>et al.</i> , 2006).
BC 01	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	Kothagorla <i>et al.</i> , 2013
VITMSS05	<i>Streptomyces sp.</i>	Revathy <i>et al.</i> , 2013

Matériel et méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie des systèmes microbiens l'ENS-Kouba-Alger, durant une période de 3 mois du 01 Mars au 31 Mai 2022.

Notre travail a porté sur :

- ✓ La production et l'extraction de molécules bioactives à partir d'une souche d'actinobactérie d'origine marine.

L'étude des activités anti-oxydante et antibactérienne contre des entérobactéries sécrétrices de β lactamases à spectre étendu (BLSE) et Non BLSE d'origine clinique.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel non biologique

La verrerie, les appareillages, les solutions et réactifs utilisés dans cette étude sont résumés dans *l'annexe II*.

II.1.2. Matériel biologique

II.1.2.1. Souche d'actinobactérie marine

Notre travail a été réalisé sur un extrait d'une souche d'actinobactérie d'origine marine codée «**MBS3**». La souche MBS3 provient du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba-Alger. Elle a été isolée en 2019 par **Matmoura et al** (Travaux en cours) à partir d'un échantillon de sédiment marin prélevé de la région Sablette d'Alger, sur le milieu « chitine-vitamines B- agar » (**Hayakawa et Nonomura., 1987**) par la méthode de suspension-dilution (**Rapilly, 1968**).

L'isolat MBS3 a fait l'objet d'une étude taxonomique basée sur les critères macro et micro-morphologiques effectuée sur deux milieux de culture *International Streptomyces Project 2*, et 4 (ISP2 et ISP4) (voir la composition en *annexe III*). Cette étude nous a permis de la rattacher de manière présomptive au genre *Streptomyces* et ce, sous réserve d'une analyse moléculaire qui permettra dans le futur de statuer définitivement sur sa position taxonomique. La souche MBS3 a été conservée à 4 °C sur le milieu ISP2 incliné (en tubes à vis) ce milieu est adéquat pour la croissance et la sporulation des actinobactéries (**Shirling et Gottlieb., 1966**).

II.1.2.2. Germes cibles

L'activité antibactérienne a été testée contre 11 entérobactéries d'origine clinique: *Escherichia coli* (2 souches), *Klebsiella pneumoniae* (4 souches), *Serratia marcescens* (2

souches), et une souche de chacune des espèces; *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, et *Citrobacter* sp. Les souches cliniques proviennent de la collection de Dr. Aissani-El Fertas Radia, enseignante à l'université de Blida. Les germes cibles ont été isolés des patients atteints de différentes infections dans le CHU de FrantzFanon (Blida) et le laboratoire Tarzali. Ces germes cibles ont été sélectionnés sur la base de leurs profils d'antibiorésistance *vis-à-vis* d'antibiotiques de différentes familles et dans le but d'évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 (**Tableau V**). En outre, trois germes-cibles de référence de la collection mondiale "Type Culture Collection" (ATCC) à savoir ; *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* ATCC 8739, et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 ont été utilisés pour tester l'activité antibactérienne

Tableau V. Origines et profil de résistance des germes cibles d'origine clinique.

N°	Code	Espèces	Profil de résistance
1	<i>Ec1</i>	<i>E.coli</i>	AMP. AMC.CZ.CTX. CIP. SXT. FOS
2	<i>K o</i>	<i>K. oxytoca</i>	AMP, AMC, CZ, CTX, GEN, SXT
3	<i>Kp1</i>	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, CZ, CTX, GEN, SXT, FT
4	<i>Kp2</i>	<i>K. pneumoniae</i>	AMC, AMP, CZ, CTX, GEN, NA, CIP,SXT
5	<i>Kp3</i>	<i>K. pneumoniae</i>	AM, AMC, CZ, CTX, CIP, SXT
6	<i>C sp.</i>	<i>Citrobactersp.</i>	AMP, FT
7	<i>Ecl</i>	<i>E. cloacae</i>	AMP, AMC, CZ, FOX
8	<i>Kp4</i>	<i>K. pneumoniae</i>	AMP, AMC, CZ, FT
9	<i>Sm1</i>	<i>S. marcescens</i>	AMP, AMC, CZ, FT
10	<i>Ec2</i>	<i>E. coli</i>	AMP, AMC, CZ, FOX, GEN, SXT
11	<i>Sm2</i>	<i>S. marcescens</i>	PR, AMP, AMC, CZ, CS

AMP: Ampicilline, **AMC:** amoxicilline + acide clavulanique, **AMX:** amoxicilline, **AN:** amikacine, **CAZ:** ceftazidime, **CIP:** ciprofloxacine, **CS:** colistine, **CTX:** céfotaxime, **CZ:** Céfazoline, **FOS:** Fosfomycine, **FOX:** Céfoxitine, **FT:** furanes, **GEN:** Gentamicine, **NA:** acide nalidixique, **SXT:** Triméthoprime+Sulfaméthoxazole, **PR:** Pristinamycine.

II.2. Méthodes

II.2.1. Production, extraction, et mise en évidence des composés bioactifs par antibiographie

2.1. Cinétique de production des antibiotiques

La cinétique de production des molécules bioactives de la souche MBS3 a été réalisée par **Matmoura et al.** (Travaux en cours) sur le milieu complexe ISP2 liquide afin de déterminer le jour optimal de la production de composés bioactifs.

Des pré-cultures sont préparées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250ml contenant chacune 50 ml de milieu ISP2 (20% de leurs volumes totaux). Chaque fiole est additionnée par un inoculum de deux carottes de 4 mm de diamètre formées par un emporte-pièce stérile à partir des cultures mûres (âgées de 10 jours) poussant sur milieu ISP2 solide. Erlenmeyer sont, ensuite, incubés à 30 °C sous agitation rotative permanente à 250 rpm, pendant 3 jours (**Figure 4**).

Après incubation, les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production (cultures). Dans des fioles d'Erlenmeyer de 500ml contenant 100ml de milieu de culture (20% de leurs volumes totaux) sontensemencées par un inoculum de 3ml (3% du volume utile) de la pré-culture correspondante préparée précédemment en phase exponentielle de croissance (âgée de 3 à 4 jours). Les cultures sont incubées dans les mêmes conditions de température et d'agitation que les prés-cultures pendant une période de 10 jours. Au cours de cette période de fermentation, l'activité antibactérienne est évaluée par la méthode de diffusion des puits quotidiennement pendant 10 jours. Les résultats montrent que l'activité antibactérienne atteint son maximum à partir du 5^{ème} jour pour la souche MBS3 (**Figure 4**).

2.2. Production et extraction des composés bioactifs

Après une production sur milieu ISP2 (aux mêmes conditions 250 rpm, 30°C) d'une durée de 5 jours pour la souche MBS3 (jour optimal de production, déterminé lors des cinétiques), les cultures sont centrifugées à 3000 g pendant 15 min, puis filtrées sur papier Wathman n°1, afin d'éliminer la masse mycélienne qui ne contient pas (ou très peu) de substances antimicrobiennes. Nous avons procédé par la suite aux choix du meilleur solvant d'extraction. Pour cela, quatre solvants non miscibles avec l'eau de polarité croissante à savoir ; le *n*-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), l'acétate d'éthyle (4,4), et le *n*-butanol (4) (l'indice de polarité est donné entre parenthèses) sont testés pour l'extraction liquide-liquide des composés actifs, le filtrat obtenu est divisé en quatre lots de 50 mL et mélangé dans des ampoules à décanter avec un volume égal de chaque solvant. Les phases organiques, séparées des phases aqueuses, sont récupérées et déshydratées par passage à travers un entonnoir contenant un papier filtre (Whatman n° 1) et 2 g de sulfate de sodium anhydre dans le but d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles présents dans la phase organique. Les extraits sont concentrés sous vide à 40 °C en utilisant un évaporateur rotatif. Le résidu sec est récupéré dans 0,5 mL de méthanol afin de réaliser une antibiographie (**Figure4**).

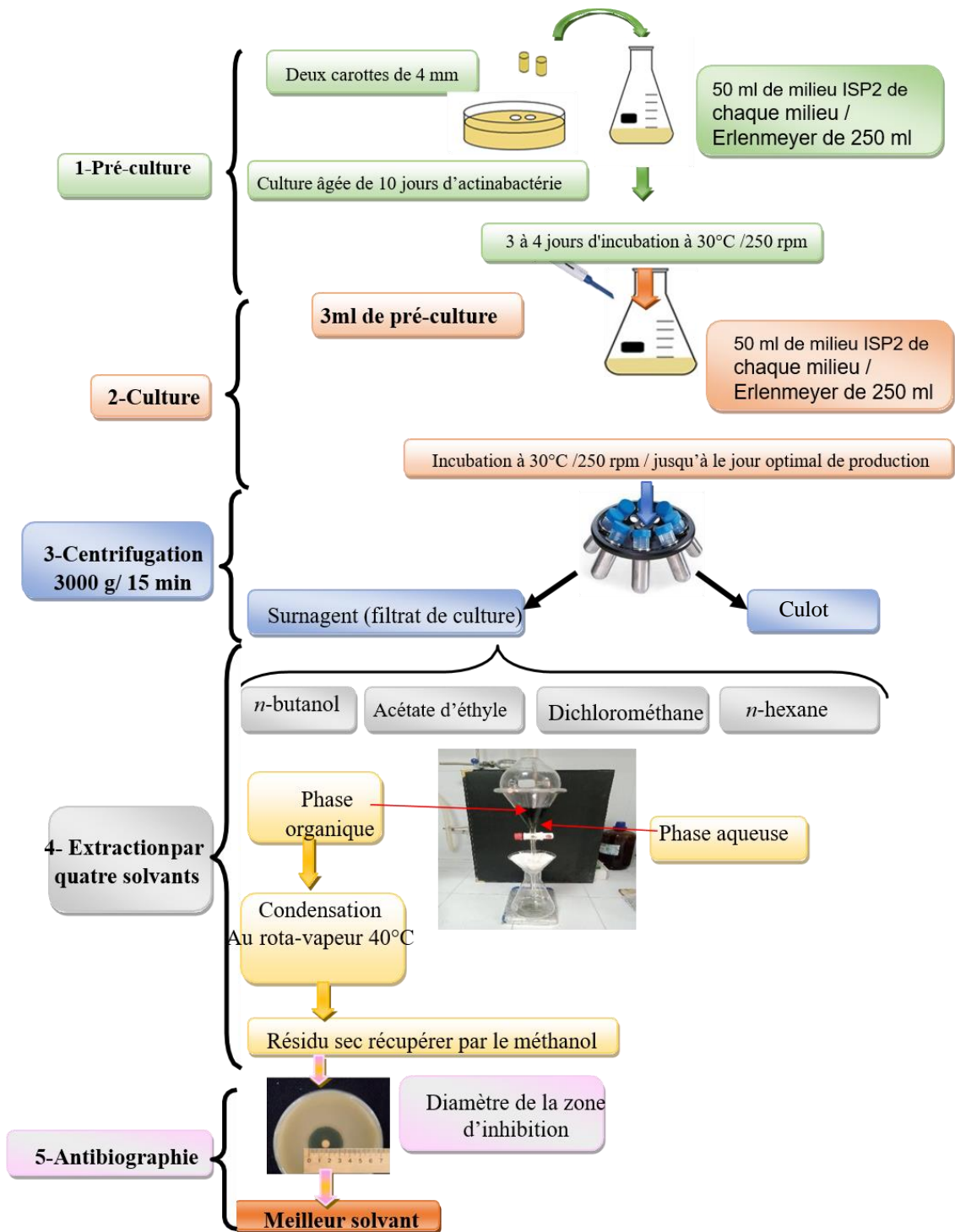


Figure 4. Etapes de production et d'extraction des molécules bioactives produites par la souche *Streptomyces sp.* MBS3.

2.3. Antibiographie

L'antibiographie consiste à sélectionner le meilleur solvant d'extraction des composés bioactifs, les quatre extraits organiques obtenus à partir des filtrats de culture ont été testés

pour leur activité antibactérienne par antibiographie sur disques de papier buvard (6mm) contre *Escherichia coli* ATCC 8739.

Les disques de papiers sont imprégnés de 80µL de l'extrait à l'aide d'une micro-seringue, puis séchés complètement à l'aide d'un séchoir à froid. Ils sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu ISP2 semi-solide (12g/L d'agar) pré-ensemencées par le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à 4°C durant 2h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant de manière temporaire la croissance du germe-cible. Elles sont ensuite incubées à 30°C pendant 24h. La lecture des résultats consiste à déterminer le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction (**Figure 5**).

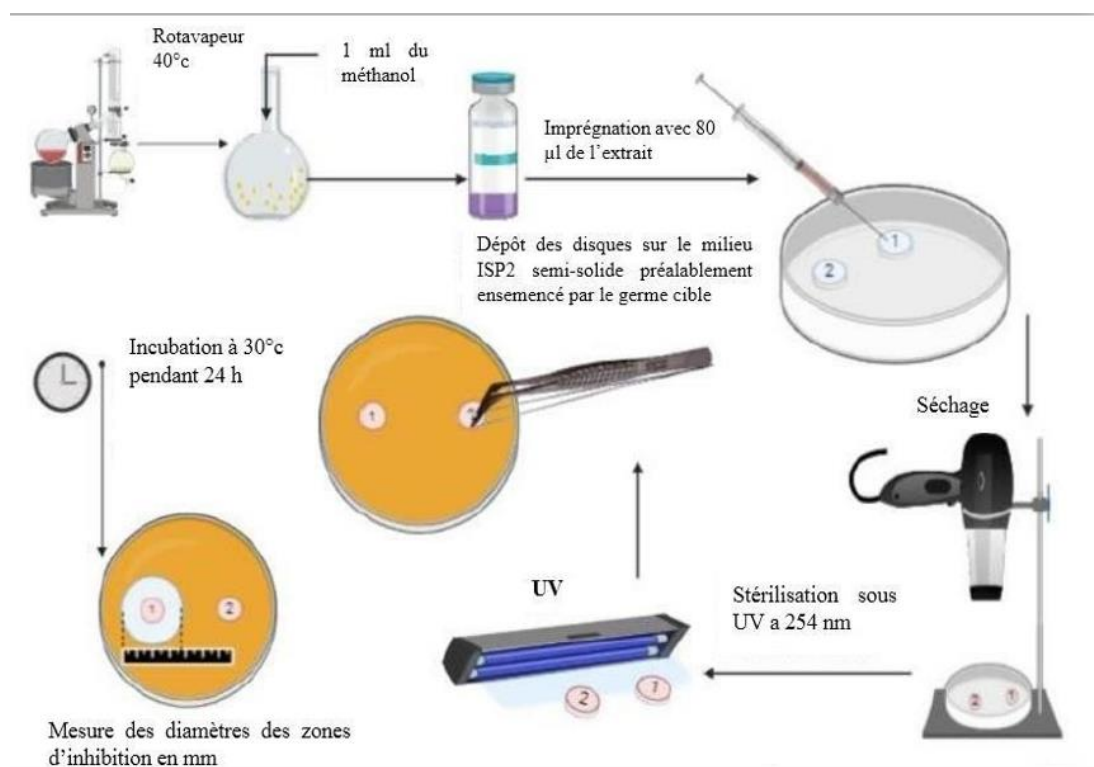


Figure 5. Schéma récapitulatif des étapes de la méthode de diffusion ou des disques de papier.

II.2.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait de l'actinobactérie

L'extrait brut de la souche *Streptomyces sp.* MBS3 obtenu par le meilleur solvant d'extraction a fait l'objet d'un test d'antagonisme visant à tester son activité antibactérienne

vis-à-vis des souches de référence et des souches-cibles de *E.coli*, *K.pneumoniae*, *S.marcescens*, *K.oxytoca*, *E.cloacae*, et *Citrobactersp.* préalablement ensemencés sur milieu ISP2 semi-solide en utilisant la méthode de diffusion des disques de papier (déjà expliqué) (**Figure 5**).

En bref, des disques de papier buvard (6mm) sont imprégnés de 80 μ L de l'extrait, séchés, puis stérilisés sous UV durant 45 min. Les germes cibles sont ensemencés en masse sur milieu semi-solide ISP2 et les disques de papiers contenant l'extrait sont déposés stérilement à la surface du milieu ISP2. Les boîtes sont ensuite mises à 4°C pendant 2h pour que les substances bioactives diffusent dans le milieu. Après 2h, les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h et le diamètre d'inhibition autour du disque est mesuré pour chaque germe (**Figure 5**).

II.2.3. Etude de l'activité antioxydante de l'extrait de l'actinobactérie : piégeage du radical du DPPH

Les actinobactéries sont connues aussi pour leur capacité à synthétiser des substances bioactives avec un effet antioxydant. L'activité antioxydante de l'extrait de la souche MBS3 a été mesurée *in vitro* par la technique de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl).

Le DPPH est un radical libre stable de couleur violacée qui absorbe à 517 nm. En présence de composés antiradicalaires, le radical DPPH est réduit et change de couleur en virant au jaune. Dans ce test les antioxydants réduisent le diphényl picryl-hydrazyl ayant une couleur violette en un composé jaune, dont l'intensité de la couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu à donner des protons (**Figure 6**) (**Majhenic et al., 2007**).

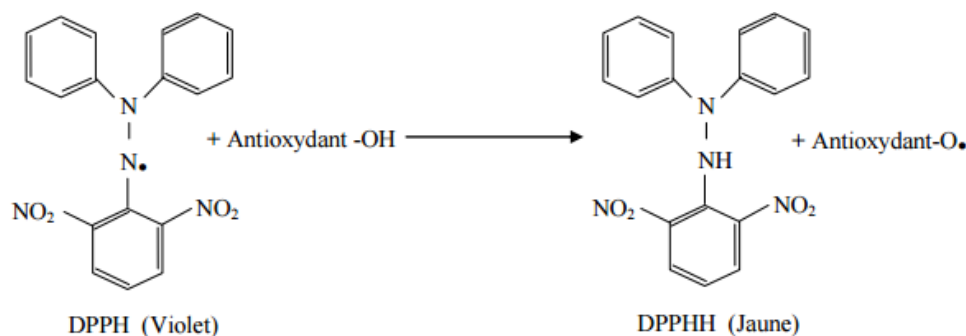


Figure 6. La réduction du radical DPPH• en DPPH-H.

L'effet de chaque extrait brut sur le DPPH est mesuré par la procédure décrite par Sanchez-Moreno et *al.*,(1998). Un volume de 500 μ L de différentes concentrations de l'extrait (62.5, 125, 500, et 1000 μ g/ml) est ajouté à 500 μ L de la solution méthanolique de DPPH (0,025 g/L) fraîchement préparée. Le contrôle négatif est préparé en parallèle en mélangeant 1000 μ L de méthanol avec 1000 μ L d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique dont l'absorbance a été mesuré dans les mêmes conditions que les échantillons et pour chaque concentration. Après incubation à l'obscurité pendant 30min et à température ambiante, la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Tous les essais ont été effectués deux fois afin de vérifier la reproductibilité.

Les résultats sont exprimés en terme pourcentages d'inhibition du radical DPPH, qui est proportionnel au pouvoir antiradicalaire de l'échantillon. Le pourcentage de piégeage du radical est calculé selon l'équation suivante :

$$\% \text{ inhibition du DPPH} = [(A1 - A2)/A1] \times 100$$

A1 : absorbance du contrôle (solution du DPPH sans extrait).

A2 : absorbance en présence d'extrait.

L'IC50 (*inhibitory concentration 50%* ; concentration inhibitrice à 50 %) permet de calculer la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH. Elle est calculée graphiquement par la régression linéaire des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions utilisées.

Résultats et discussions

III.1. Résultats

III.1.1. Choix du meilleur solvant d'extraction des composés bioactifs et antibiographie

Quatre solvants organiques non miscibles à l'eau de polarités différentes ont été utilisés dans l'extraction des composés bioactifs de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 à savoir: le *n*-hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle, et le *n*-butanol. L'extraction des molécules bioactives a été faite le 5^{ème} jour de production à partir du filtrat de culture du milieu ISP2. Les extraits organiques obtenus sont concentrés à l'évaporateur rotatif à 40 °C et récupérés dans 0,5 mL de méthanol pour tester leur activité antibactérienne contre une souche de références : *Escherichia coli* ATCC 8739, par la méthode de disques de papier. Les zones d'inhibition de la croissance du germe-cible sont consignées dans le **Tableau VII**. Nos résultats montrent que l'activité antibactérienne est observée dans 3 extraits organiques, avec des diamètres d'inhibition allant de 35 à 12 mm (**Figure 7**). La meilleure activité est détectée surtout dans l'extrait butanolique (35 mm), suivie de celle de l'extrait au dichlorométhane (29 mm). Cependant, l'extrait d'acétate d'éthyle a montré une activité faible (12 mm), et aucune activité n'a été décelée dans l'extrait hexanique.

Ainsi, le *n*-butanol pu extraire une grande partie des composés antibactériens, il est donc le meilleur solvant d'extraction pour la souche *Streptomyces* sp. MBS3. De ce fait le le *n*-butanol a été retenu comme meilleur solvant d'extraction et l'extrait butanolique a été utilisé pour l'étude des activités antibactérienne et antioxydante.

Tableau VI. Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche MBS3 contre *Escherichia coli* ATCC 8739.

Germe-cible	Extraits			
	EH	EDch	AE	EB
	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)			
<i>E. coli</i> ATCC 8739	-	29	12	35

EH: extrait au *n*-hexane; **EDch:** extrait au dichlorométhane; **AE:** extrait à l'acétate d'éthyle; **EB:** extrait butanolique; (-): pas d'activité autour du disque. Le diamètre du disque de papier (6 mm) est compris dans les mesures.

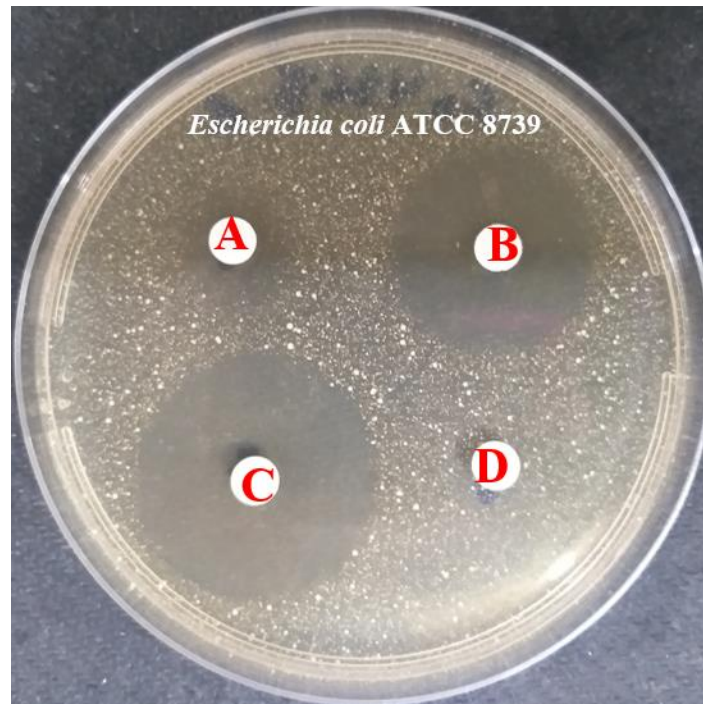


Figure 7. Test d'activité antibactérienne par antibiographie des différents extraits organiques de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 contre *Escherichia coli* ATCC 8739. **A:** extrait à l'acétate d'éthyle; **B:** extrait au dichlorométhane; **C:** extrait butanolique ; **D:** extrait hexanique. Le diamètre des disques de papier (6 mm) est compris dans la mesure des activités.

III.1.2. Profil de résistance des germes cibles

Le profil de résistance des souches d'entérobactéries cliniques testées est variable selon la souche. Les résultats sont illustrés dans le tableau VII.

Tableau VII. Caractéristiques des germes cibles cliniques.

N°	Code	Espèces	Profil de résistance	Nombre de famille Résistance	Phénotype de résistance
1	Ec1	<i>E.coli</i>	AMP. AMC.CZ.CTX. CIP. SXT. FOS β-lactamines ; Quinolones, Sulfamides, others ou acide phosphonique	4 BMR	BLSE
2	Ko	<i>K. oxytoca</i>	AMP.AMC.CZ.CTX.GNT.SXT β-lactamines ; Aminositides, Sulfamides	3 BMR	BLSE
3	Kp1	<i>K. pneumoniae</i>	AMP.CZ.CTX.GENT.SXT.FT β-lactamines ; Aminositides, Sulfamides, nitrofuranes	4 BMR	BLSE
4	Kp2	<i>K. pneumoniae</i>	AMC.AMP.CZ.CTX.GM.NA.CIP.SXT β-lactamines ; Aminositides, Quinolones, Sulfamides	4 BMR	BLSE
5	Kp3	<i>K. pneumoniae</i>	AM.AMC.CZ.CTX.CIP.SXT β-lactamines ; Quinolones, Sulfamides	3 BMR	BLSE
6	C sp.	<i>Citrobactersp.</i>	AMP.FT β-lactamines ; nitrofuranes	2 Non BMR	NBLSE
7	Ecl	<i>E.cloacae</i>	AMP.AMC.CZ.FOX β-lactamines	1 Non BMR	NBLSE
8	Kp4	<i>K. pneumoniae</i>	AMP.AMC.CZ.FT β-lactamines ; nitrofuranes,	2 Non BMR	NBLSE
9	Sm1	<i>S.marcescens</i>	AMP.AMC.CZ.FT β-lactamines ; nitrofuranes,	2 Non BMR	NBLSE
10	Ec2	<i>E.coli</i>	AMP.AMC.CZ.FOX.GNT.SXT β-lactamines ; Aminositides, Sulfamides,	3 BMR	NBLSE
11	Sm2	<i>S.marcescens</i>	PR.AM.AMC.CZ.CS Macrolides, β-lactamines, Polymixines,	3 BMR	NBLSE

AMC : amoxicilline + acide clavulanique : **β-lactamines**, AMX : amoxicilline : **β-lactamines**, AMP : Ampicilline : **β-lactamines**, AN : amikacine : **Aminosides**, CAZ : ceftazidime : **β-lactamines**, CIP : ciprofloxacine : **Quinolones**, CS : colistine : **Polymixines**, CTX : céfotaxime : **β-lactamines**, FOS : Fosfomycine : **others ou acide phosphonique**, FOX : Céfoxitine : **β-lactamines**, FT : furanes : **nitrofuranes**, GM ou GEN : Gentamicine : **Aminosides**, NA : acide nalidixique : **Quinolones**, SXT : Triméthoprime + Sulfaméthoxazole : **Sulfamides**, PR : Pristinamycine : **Macrolides**.

La totalité des souches testées dans ce travail étaient résistantes aux antibiotiques de la famille β-lactamines (Ampicilline, amoxicilline, ceftazidime, céfotaxime,...etc). Parmi ces souches 5 étaient des BLSE (productrices de bêta-lactamases à spectre élargi) alors que 6 étaient NBLSE (non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi). Presque la moitié des souches étaient résistantes aux sulfamides (5 souches) pendant que 3 souches étaient résistantes soit aux quinolones, aminosides ou nitrofuranes (**Tableau VII**).

L'antibiogramme a aussi révélé un haut niveau de résistance pour 7 souches utilisées (Ec1, Ec2, Kp1, Kp2, Kp3, Ko, Sm2) montrant une multirésistance *vis-à-vis* d'au moins 5 antibiotiques testés appartenant à diverses familles (au moins 3 différentes familles), ce qui permet de les classer comme bactéries multi-résistantes (BMR) (**Tableau VII**).

III.1.2. Activité antibactérienne

L'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 a été testé contre 14 souches d'Entérobactéries englobant 5 souches BLSE (productrices de bêta-lactamases à spectre élargi), 6 souches NBLSE (non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi), et contre 3 souches de référence. Parmi les souches cliniques utilisées 7 étaient des bactéries multi-résistantes (BMR). Les résultats sont illustrés dans les **Figures 8, 9, 10 et 11**.

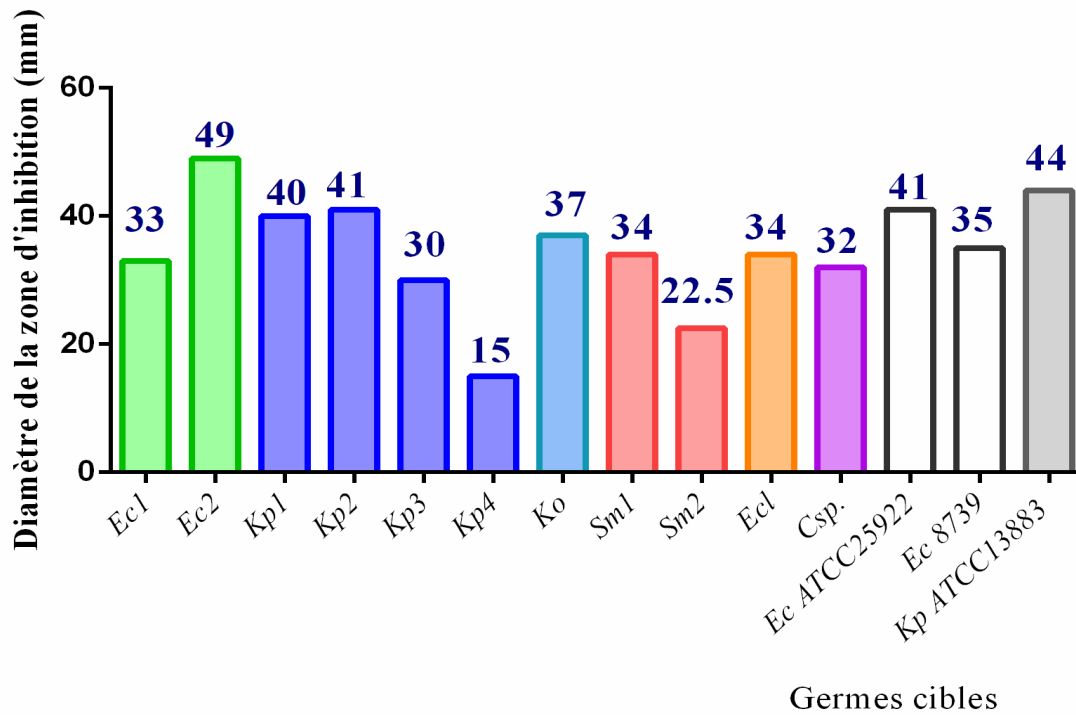


Figure 8. Activité antibactérienne de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3. Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs.

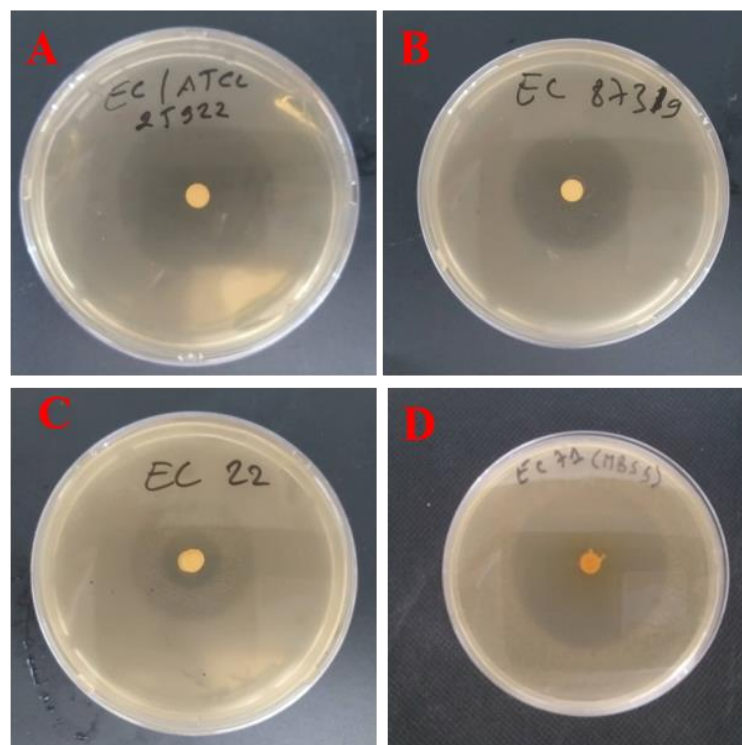
✓ *Activité antibactérienne contre E. coli*

Figure 9. Activité anti-*E.coli* de l'extrait l'extrai butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre *E. coli* ATCC 25922 (A), *E. coli* ATCC 8739 (B), *Ec 1* (C), et *Ec2* (D). Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs.

Nos résultats montrent que l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3, présente une très forte activité (≥ 35 mm d'inhibition) contre la souche clinique d'*E.coli* 2, et les souches de références *E.coli* ATCC25922 et *E.coli* 8739, avec des diamètres d'inhibition respectifs de 49, 41 et 35mm. De plus l'extrait avait une forte activité (plus de 25 à 35 mm d'inhibition) contre la souche clinique d'*E.coli* 1 avec un diamètre d'inhibition de 33 mm (Figure 8 et 9). Les deux souches cliniques d'*E.coli* testées étaient des BMR dont la *E.coli* 1 est une BLSE et la *E.coli*2 est une NBLSE (Tableau VIII).

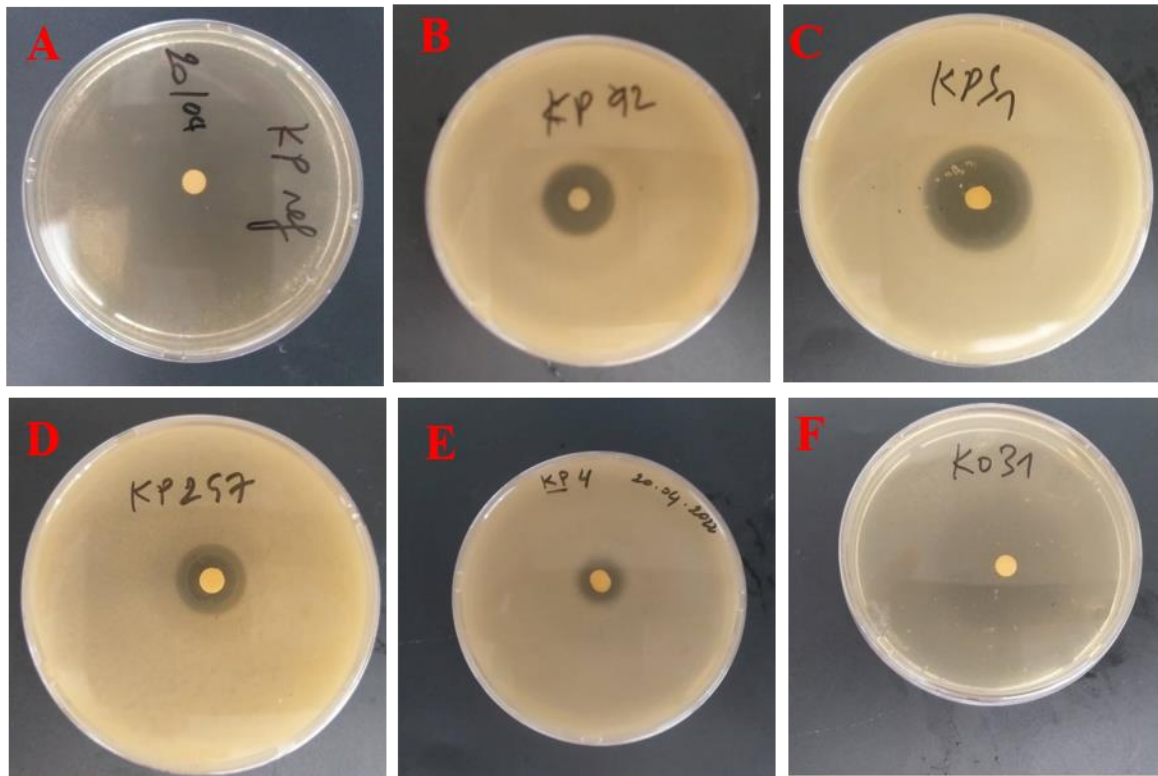
✓ *Activité antibactérienne contre K. pneumoniae et K.oxytoca*

Figure 10. Activité anti-Klebsielle de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre *K.pneumoniae* ATCC 13883 **A)**, *Kp 1* **(B)**, *Kp2* **(C)**, *Kp3* **(D)**, *Kp4* **(E)**, *Ko* **F)**. Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs.

L'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3, s'est également montré actif vis-à-vis des *Klebsiella*. L'activité était très forte (≥ 35 mm d'inhibition) contre toutes les souches 1 et 2 de *K.pneumoniae* cliniques et aussi la souche de référence avec des diamètres d'inhibition de 40, 41 et 44 respectivement. De même, une forte activité (30mm) a été notée contre la souche clinique 3 de *K.pneumoniae*. De plus, l'extrait avait une forte activité de 37mm vis-à-vis de la souche de *K.oxytoca*. En revanche, l'extrait avait une faible activité (≤ 15 mm) contre la souche clinique 4 de *K.pneumoniae* où la zone était de 15 mm **(Figure 8 et 10)**. On note que toutes les souches de *Klebsiella* d'origine clinique étaient des BMR et BLSE sauf la souche 4 *K.pneumoniae* qui était NBLSE, non BMR et avec une faible réponse à l'extrait **(Tableau VIII)**.

✓ *Activité antibactérienne contre S.marcescens, E.cloacae et Citrobacter sp.*

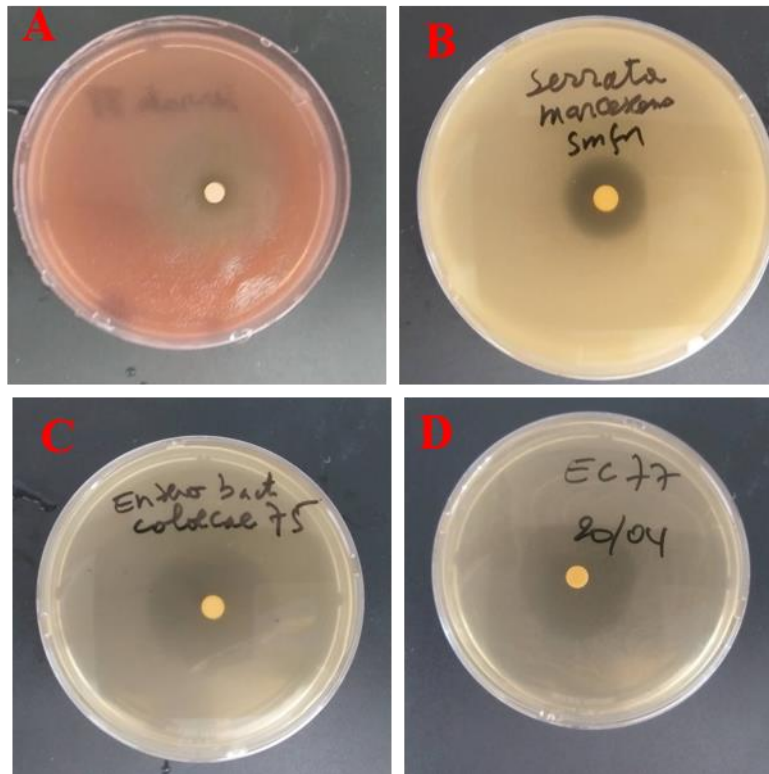


Figure 11. Activité anti-Entérobactéries de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 testée par la méthode des disques de papier contre *Sm1* (A), *Sm2* (B), *Ecl* (C), et *Csp*. (D). Les activités représentent la distance d'inhibition (en mm), le diamètre des disques de papier (6 mm) est inclus dans les valeurs.

L'extrait butanolique de la souche *Streptomyces* sp. MBS3 montre aussi une forte activité contre les souches cliniques de *S.marcescens* 1 (34 mm), d'*E.cloacae* (32 mm) et *Citrobacter* sp. (34 mm) mais une activité modérée contre la souche 2 de *S.marcescens* (22.5 mm) (Figure 8 et 11). Ces souches étaient des NBLSE et non BMR sauf la souche 22 de *S.marcescens* qui était une BMR et NBLSE (Tableau VIII).

D'après les résultats obtenus, les diamètres des zones d'inhibitions diffèrent d'une bactérie à une autre. La variation de l'activité antimicrobienne de l'extrait pourrait être expliquée par la variation de la composition chimique des molécules produites par les actinobactéries et le degré de résistance des germes cibles utilisées (Boudjouref, 2011).

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

III.1.3. Evaluation de l'activité antioxydante

L'activité anti-radicalaire est réalisée par la méthode du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) qui est une méthode fréquemment utilisée pour sa simplicité. Cette méthode est basée sur la réduction d'une solution alcoolique de DPPH en présence d'un antioxydant qui donne un hydrogène et la forme non radicalaire DPPH-H est ainsi formée (**Bortolomeazzi et al. 2007**). L'inhibition de la décoloration du radical DPPH est en fonction de la concentration de l'extrait utilisé et du témoin acide ascorbique (antioxydant de référence) (**Figure 12**). courbe de l'activité antioxydante (**Figure 01, Annexe 03**)

L'activité antioxydante de l'extrait est exprimée en CI50, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH (**Abdulmajed et al., 2005; Ahmad et al., 2012; Ranga et al., 2009**).

Plus la valeur de l'IC50 est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

L'étude de l'activité antioxydante de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces sp.* MBS3, révèle que les substances bioactives produites par cette dernière sont capables de piéger les radicaux libres de DPPH et ont un pouvoir réducteur remarquable. L'extrait bactérien a montré une activité de piégeage des radicaux libres DPPH de 31,97 à 84,32 % à 0,05 à 0,5 mg/mL respectivement par rapport à l'acide ascorbique qui a montré une activité de 41,98 à 88,53 % à une concentration de 0,05 à 0,5 mg/mL, respectivement (**Figure 13**).

La concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH est de 140µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL.

L'activité antioxydante de l'extrait était proportionnellement liée à la composition de métabolites secondaires et liée de concentration de composés bioactifs.



Figure 12. Essai de la courbe standard de l'antioxydant de référence (acide ascorbique).



Figure 13. Activité anti-radicalaire des différentes concentrations de l'extrait butanolique de la souche *Streptomyces sp.*

III.2. Discussion

Dans la présente étude nous avons démontré que l'extrait butanolique de la souche d'actinobactérie d'origine marine « *Streptomyces* sp. MBS3 » présente des activités antioxydante et antibactérienne contre des entérobactéries d'origine clinique.

L'activité antibactérienne était forte à très forte contre l'ensemble des souches aussi bien les souches productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (BLSE), que les non productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (NBLSE) dont on retrouvait des souches multirésistantes.

Ces résultats sont intéressants et suggèrent que notre extrait contient une ou des molécules bioactives à activité antibiotique. Ces résultats concordent avec les résultats obtenus par Bouras *et al.* (2013), Aouich *et al.* (2013) et Dholakiya *et al.* (2017), qui ont montré que l'extrait de *Streptomyces* présente une activité contre les bactéries à Gram positif et négatif et même les champignons. Ceci pourrait être expliqué par le fait que les souches de *Streptomyces* sont connues pour leurs spectre d'action large (Thakur *et al.*, 2007 ; Valanarasu *et al.*, 2008; Duraipandiyam *et al.*, 2010 ; Dholakiya *et al.*, 2017).

Les actinobactéries sont bien connues par leur production de métabolites secondaires avec de nouveaux antibiotiques qui sont d'une immense importance pour prévenir les agents pathogènes multirésistants (Dholakiya *et al.*, 2017). Elles produisent des spores qui résistent aux conditions extrêmes et montrent une plus grande résistance aux fluctuations environnementales permettant leur adaptation aux conditions hostiles contrairement aux autres microorganismes (Hopwood et Wright., 1973).

Approximativement, plus de deux tiers des milliers d'antibiotiques naturels ont été isolés principalement par le genre *Streptomyces* (Omura, 1992). Plusieurs espèces de *Streptomyces* d'origine marines ont été récemment décrites et étudiées pour leur potentiel à produire des métabolites secondaire, y compris la production des antibiotiques. Ces antibiotiques sont originaux et particuliers par rapport à ceux produits par les actinobactéries terrestres (Sanchez *et al.* 2003; Maskey *et al.*, 2004; Macherla *et al.* 2005).

Le milieu marin est considéré comme une source inexploré de nouveaux produits naturels bioactifs (Fenical, 1993; Gulder et Moore, 2009; Molinski *et al.*, 2009). Leur diversité structurelle rend d'elles une cible prometteuse pour la découverte de nouveaux antibiotiques et de molécules bioactives en général (Newman et Cragg., 2007).

Nos résultats ont aussi montré une activité antioxydante intéressante. Les antioxydants jouent un rôle important dans l'inhibition et la neutralisation des radicaux libres, offrant ainsi une protection aux humains contre diverses infections et maladies impliquant le stress oxydatif.

Les antioxydants réagissent avec le DPPH et le réduisent selon groupement hydroxyle libres disponibles. (Matthäus, 2002). Nos résultats concordent avec ceux des travaux de Rajan et al. (2012) Dholakiya et al. (2017) qui ont démontré que des souches d'actinobactéries isolés des sols marins du Kerala et du Golfe de Khambhat, en Inde présentaient des activités antioxydantes intéressantes.

Nos résultats ont montré de piégeage du radical DPPH, révèlent que notre extrait présente une activité 83.7% d'activité de piégeage du DPPH et à concentration de 1 mg/mL. Nos résultats ont montré une meilleure activité comparée aux travaux de Thenmozhi et Kannabiran (2012), qui ont trouvé que l'extrait d'acétate d'éthyle de l'espèce *Streptomyces* VITSTK7, isolé du milieu marin du golfe du Bengale, en Inde présentait 43,2% d'activité de piégeage du DPPH à une concentration de 10 mg/mL.

La concentration de l'extrait testé nécessaire pour réduire 50 % (IC50) des radicaux DPPH est de 140µg/mL, elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL. L'effet inhibiteur de notre extrait butanolique de la souche MBS3 est moins important que l'effet inhibiteur puissant du standard « acide ascorbique », cela est dû essentiellement à la pureté de ce dernier. Des résultats similaires ont été rapporté par d'autres auteurs (Kekuda et al., 2010 ; Manasa et al., 2012 ; Priya et al., 2012 ; Thenmozhi et Kannabiran., 2012 ; Gautham et al 2013 ; Dholakiya et al., 2017).

L'activité antioxydante des extraits d'actinobactéries est due à leur teneur en polyphénols et en flavonoïdes. L'activité antioxydante dépend de la concentration mais aussi de la qualité de polyphénols et flavonoïdes présents dans l'extrait (Rodriguez-Bernaldo et al., 2010). Certains travaux ont montré une bonne corrélation entre les IC50 et la teneur en polyphénols et en flavonoïdes, à l'opposé d'autre études n'ont pas établie cette corrélation (Athamena et al., 2010 ; Mariod et al., 2010).

En plus des polyphénols et flavonoïdes d'autres molécules pourraient être responsables de cette activité (Lertcanawanichakul et al.,2014).

Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats de notre travail suggère :

Le *n*-butanol est le meilleur solvant organique pour l'extraction des composés bioactifs à partir de la souche d'actinobactérie d'origine marine « *Streptomyces* sp. MBS3 ».

L'extrait butanolique de la souche MBS3 présente une activité antibactérienne nettement fortes à très fortes contre l'ensemble des germes cibles d'entérobactéries d'origine cliniques testés y compris les souches multi-résistantes. Les zones d'inhibition variaient entre 30 à 49mm, sauf pour *Serratia marcescens* (Sm2), et *Klebsiella pneumoniae* (Kp4), où l'activité antibactérienne était moyenne (22mm) et faible (15mm) respectivement.

En outre, notre extrait a montré une activité antioxydante ou antiradicalaire intéressante. La concentration de l'extrait nécessaire pour réduire 50 % des radicaux DPPH est de 140µg/mL, et elle est supérieure à celle de l'acide ascorbique qui est de 8µg/mL.

Notre étude confirme que le milieu marin constitue un réservoir important de souches d'actinobactéries qui pourraient représenter une source prometteuse pour la production de nouvelles molécules bioactives à activité antimicrobienne et antioxydante.

L'ensemble de nos résultats ouvrent des perspectives très prometteuses quant à l'utilisation thérapeutique des molécules bioactives extraites d'actinobactéries.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Analyser, purifier et caractériser les composantes bioactives de l'extrait par différentes techniques comme HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression, LC-MS (Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse), et RMN (la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13).
- Déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques produits par notre souche en utilisant des germes multi-résistants aux antibiotiques cliniques.
- Etudier l'effet antibactérien de l'extrait et des molécules bioactives sur des bactéries BMR Gram positif.
- Rechercher d'autres activités biologiques de l'extrait telles que les activités antifongiques, antiparasitaires, anti-tumorales, anti-infectieuses, etc.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

ABDULMAJED K., MCGUIGAN C. AND HEARD C. M.(2005). Topical delivery of retinyl ascorbate: 4. Comparative anti-oxidant activity towards DPPH. *Free Radic. Res*)39(: 491-498.

AHMAD N., FAZAL H., ABBASI B. H., ANWAR S. AND BASIR A.(2012). DPPH free radical scavenging activity and phenotypic difference in hepatoprotective plant (*Silybum marianum* L.). *Toxicol.Ind. Health*.

AIT BARKA, E., VATSA, P., SANCHEZ, L., GAVEAU-VAILLANT, N., JACQUARD, C., KLENK, H. P., ... & VAN WEZEL, G. P. (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1-43.

ALLEN HK, DONATO J, WANG HH, ET AL (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Microbiol* 8:251–9 Bouyahya, A., Bakri, Y., Et-Touys, A. et al. Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie* (2017). <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>

ALEXANDER V. IVANOV, BIRKE BARTOSCH, MARIA G. ISAGULIANTS, "Oxidative Stress in Infection and Consequent Disease", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 3496043, 3 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3496043>

ALLEN P., HAYES J. E., STEPANYAN V.,, O'GRADY M.N. AND KERRY J.P. (2010). Effect of lutein, sesamol, ellagic acid and olive leaf extract on the quality and shelflife stability of packaged raw minced beef patties. *Meat Science*, 84 (4): 613-620.

ALWASH M. S., IBRAHIM N. AND AHMAD W. Y. (2013). Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* linn leaves. *J. Infect. Dis.* 9(2). 46- 58.

ARASUVALAN M, DURAIPANDIYAN V, AGASTIAN P, IGNACIMUTHU S (2009), In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India), *Journal de Mycologie Médicale* 19: P 22-28.

ATHAMENA, S., CHALGHEM, I., KASSAH-LAOUAR, A., LAROUI, S., & KHEBRI, S. (2010). ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET ANTIMICROBIENNE D'EXTRAITS DE CUMINUM CYMINUM L. *LEBANESE SCIENCE JOURNAL*, 11 (1), 69 – 81.

Références bibliographiques

- BADJI. B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p
- BAGRE I., BAHY C., GNAHOUE G., DJAMAN A. J. ANDGUEDE G F. (2007).** Composition phytochimique et évaluation in vitro de l'activité antifongique des extraits des feuilles de *Morinda morzinoensis* Baker (Milne-Redhead) (Rubiaceae) sur *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. J. sci. pharm. Boil. 8 (1). 15-23.
- BELYAGHOUBI L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen. 143p.
- BERDY J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* **58** :1-26.
- BERDY J., AASZALOS A. AND MC NITT K.L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- BEVILACQUA S. (2011).** Evaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy, (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de doctorat. Sciences de la vie et de la santé. Université Nancy, France.
- BOUBETRA D., SABAOU N., ZITOUNI A., BIJANI C., LEBRIHI A. AND F. MATHIEU. (2013C).** Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix* SA198 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.* 168 (4): 223-230.
- BOUCHEFFA K. (2011).** Criblage des souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire de Magister. Université Abderrahmane Mira Bejaia.
- BOUDJOUREF. M. (2011).** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de magister. Université Ferhat Abbas, Sétif.
- BOUGHACHICHE F., REGHIOUA S., ZERIZER H., OULMI L., BOUDEMAGH A., KITOUNI M. ET BOULAHROUF A. (2005)** Isolement d'Actinomycétales productrices de

Références bibliographiques

substances antimicrobiennes a partir de la Sebkhha de Ain Mlila. *Sciences et Technologies*. 23 : 5-10.

BOUYAHYA, A., BAKRI, Y., ET-TOUYS, A. (2017). Résistance aux antibiotiques et mécanismes d'action des huiles essentielles contre les bactéries. *Phytothérapie* (2017). <https://doi.org/10.1007/s10298-017-1118-z>

BRETON A., THEILLEUX J., SANGLIER J.J. AND VOBİ G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In : *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent, J.P. and Sanglier, J.J. Paris, Masson. 33–70p

COLOMBIE V (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces* Crawford

D. L., Lynch J. M., Whipps J. M., Ousley M. A.,(1993) Isolation and D'ANTANANARIVO, Pp. 5-10.

COURVALIN P. AND PHILIPPON A.(1990). Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. *Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammation. France*. **14**. 332-355.

D. A. HOPWOOD (1973), Differentiation in actinomycetes. In: J. M. Ashworth and J. E. Smith (Eds.) *Microbial Differentiation*. Cambridge University Press. London: P 143–160.

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

DHOLAKIYA R. N., KUMAR R., MISHRA A., MODY K. H., & JHA B. (2017). Antibacterial and antioxidant activities of novel actinobacteria strain isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Front. Microbiol.* 8. 2420

DJABALLAH C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de lasebkhha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine.

DONG-RYUNG LEE, SUNG-KWON LEE, BONG-KEUN CHOI, JINHUA CHENG, YOUNG-SIL LEE, SEUNG HWAN YANG ET JOO-WON SUH. (2014). Antioxidant

Références bibliographiques

activity and free radical scavenging activities of *Streptomyces* sp. strain MJM 10778. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **14**, 962-967

DOYLE MP (2006). Antimicrobial resistance: implications for the food system. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 5:71–137

DZIDIC S, SUSKOVIC J, KOS B (2008) Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol* 46:11–21

EEL-TARABILY K.A. AND SIVASITHAMPARAM K. (2006). Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology and Biochemistry*. 34:1–16.

EUZÉBY J.P. (2015). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.

FENICAL, W.; SIMS, J.J.; SQUATRITO, D.; WING, R.M.; RADLICK, P. MARINE (1973) natural products VII. Zonarol and isozonarol, fungitoxic hydroquinones from the brown seaweed *Dictyopteris zonarioides*. *J. Org. Chem.*, 38, 2383–2386

GENILLOU O., GONZALEZ I., ALAZAR O., MARTIN J., VICENTE F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial and Microbiological Biotechnology*, 38,375–389.

GIEDRAITIENE A, VITKAUSKIENE A, NAGINIENE R, ET AL (2011) Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina* 47:137–46

GOTTLIEB D., (1973). General considerations and implications of the actinomycetes. In: *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Sakes G., Skinner FA. Ed. Academic Press, New York. pp.1–10.

GULDER, T.A.M.; MOORE, B.S. (2009) Chasing the treasures of the sea-bacterial marine natural products. *Curr. Opin. Microbiol.*, 12, 252–320.

HAMAKI T., SUZUKI M., FUDOU R., JOJIMA Y., KAJIURA T., TABUCHI A., SEN K. AND SHIBAI H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J Biosci Bioeng*. 99: 485-492.

Références bibliographiques

HAMED A, ABDEL-RAZEK A S, FRESE M, WIBBERG D, ELHADDAD A F, IBRAHIM TM, KALINOWSKI J, SEWALD N, SHAABAN M (2018) N-Acetylborrelidin B: a new bioactive metabolite from *Streptomyces mutabilis* sp. MII. Z Naturforsch C 73:49–57.

HARIR. M, (2018). Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi-arides d'Algérie. Thèse de doctorat, Harrach (Alger).p177.

HASSAN. U. S. S, ANJUM. K, ABBAS. S. Q, AKHTER. N, SHAGUFTA. B. I, SHAH. S. A. A, TASNEEM .U(2017). Review Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. Environmental Toxicology and Pharmacology (; 49: 34–47.

HAYAKAWA M. AND NONOMURA H. (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferm Technol.65 :501–509.

JACOBY GA, MUNOZ-PRICE LS (2005) The new beta-lactamases.N Engl J Med 352:380–91

Jana S, Deb JK (2006) Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. Appl Microbiol Biotechnol 70:140–50

JIANG YJ, ZHANG DS, ZHANG HJ, LI JQ, DING WJ, XU CD, MA ZJ (2018) Medermycin-type naphthoquinones from the marine-derived *Streptomyces* sp. XMA39. J Nat Prod 81:2120–2124.

KEKUDA P.T.R., SHOBHA K.S., ONKARAPPA R. (2010) Studies on Antioxidant and Antihelmintic activity of two *Streptomyces* species isolated from Western Ghat soil of Agumbe, Karnataka. Journal of Pharmacy Research, 3(1), 26-29.

KIRSCHVINK N ., DE MOFFARTS B., LEKEUX P.(2008) . The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. The Veterinary Journal. Vol.177; pp 178–191.

KITOUNI, M., BOUDEMAGH, A., OULMI, L., REGHIOUA, S., BOUGHACHICHE, F., ZERIZER, H.,HAMDIKEN, H., COUBLE, A., MOUNIEE, D., BOULAHROUF, A., BOIRON, P. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. J Med Mycol, 15(1) : 45–51.

Références bibliographiques

KITOUNI M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaires des souches actives et caractérisation préliminaires des substances élaborées. Thèse de Doctorat. Université Mentouri de Constantine. Algérie.

LABIOD R. (2016). Valorisation des huiles essentielles et des extraits de *Satureja calaminthanepeta* : activité antibactérienne, activité antioxydante et activité fongicide. Thèse du diplôme de Doctorat, Université Badji Mokhtar-Annaba.

LECHEVALIER, H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. pp 315–360

LECHEVALIER M. P., DE BIEVRE C. AND LECHEVALIER H. A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic

LECHEVALIER, H.A., LECHEVALIER, M.P. (1967). Biologie of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 21: 71–100

LECHEVALIER M.P. AND LECHEVALIER H.A. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **20**, 435-443.

LI XZ, NIKAIDO H (2009) Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69:1555–623

LUDWIG W., EUZÉBY J. AND WHITMAN W.B. (2012). Taxonomic outline of the phylum actinobacteria. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. **5** :29-31.

MACHERLA, V. ; LIU, J ; BELLOWS, C. ; ET AL. GLACIAPYRROLES (2005)A, B and C pyrrolonesquiterpenes from a *Streptomyces* sp. Isolated from an Alaskan marine sediment. *J Nat Prod*. 2005. 68:780– 783.

MAKHJANI K. (2008). Textbook of Environmental Microbiology. I. K. International Pvt Ltd. 30p.

MAJHENIC L., KERGET M.S., KNEZ Z. (2007). Antioxidant and antimicrobial activity of Guarana seed extracts. *Food Chemistry*. **104** : 1258–1268.

Références bibliographiques

MANASA, M., POORNIMA, G., ABHIPSA, V., ET AL. 2012. “Antimicrobial and Antioxidant Potential of Streptomyces sp. RAMPP 065 Isolated from Kudremukh Soil, Karnataka, India.” *Science Technology and Arts Research Journal* 1 (3): 39-44.

MARIOD, A. A., RAMLAH, M. I., MAZNAH, I., & NORSHARINA, I. (2010). Antioxydant activities of phenolic rich fraction (PRFs) obtained from black mahlab *Monechma* Références bibliographiques 79 ciliatum and white mahlab *Prunus mahaleb* seedcakes. *Food Chemistry*, 118, 120 – 127

MARSHALL BM, OCHIENG DJ, LEVY SB (2009) Commensals: unappreciated reservoir of antibiotic resistance. *Microbe* 4:231–8

MASKEY R., HELMKE, E.; KAYSER, O.; 2004.) Anticancer and antibacterial trioxacarcins with high anti-malaria activity from a marine Streptomycece and their absolute stereochemistry. *J Antibiot (Tokyo)* 2004. 57:771–779.

MOORE L.H., MOORE W.E.C., MURRY R.G.E., STACKEBRANDT E., STARR M P AND TRÜPER RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 88 H.G. (1987). - Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterialsystematics. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 463-464.

MOLINSKI, T.F.; DALISAY, D.S.; LIEVENS, S.L.; SALUDES, J.P (2009). Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 8, 69–75.

MOUKETTE BM, PIEME CA, NJIMOU JR, BIAPA CPN, MARCO B & NGOGANG JY. 2015. In vitro antioxidant properties, free radicals scavenging activities of extracts and polyphenol composition of a non-timber forest product used as spice: *Monodora myristica*. *Biological Research* 48: 15.

NAGASESHU, P., GAYATRIDEVI, V., KUMAR, A. B., KUMARI, S., MOHAN, M. G., AND MALLA, R. (2016). Antioxidant and antiproliferative potentials of marine actinomycetes. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8, 277–284.

NARAYANA K.J ., KUMAR K.G ., VIJAYALAKSHMI M.L. (2008). Asparaginase production by streptomyces Albido. *Flavus. Indian Journal of microbiology*, 48(3), 331-336

NEWMAN D.J. AND CRAGG M.G (2007). - Natural products as sources of new drugs over the last 25years. *J. Nat. Prod.*, 70, 461-477p.

Références bibliographiques

OKORO C. K., BROWN R., JONES A. L., ANDREWS B. A., ASENJO J. A.,

GOODFELLOW M., BULL A. T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*. **95**:121–133.

OMURA, S. (1992) The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.

PATHOM-AREE W., STACH J., WARD A., HORIKOSHI K., BULL A. AND

GOODFELLOW M. (2006).Diversity of actinomycetes isolated from challenger deep sediment (10,898m) from the Mariana Trench. *Extre.* 10:181-189.

PEBRET F.(2003).Maladies infectieuses: toutes les pathologies des programmes officiels des études médicales ou paramédicales. Heures de France. 592p.

PERRY J.J., STALEY J.T. AND LORY S. (2004). Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod. Paris.497-850p.

P. JOSE AND S. R. JEBAKUMAR, (2013) “Phylogenetic diversity of actinomycetes cultured from coastal multipond solar saltern in Tuticorin, India,” *Aquatic Biosystems*, vol. 8,

RAPILLY F. (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann. Epiphyties.

19,numéro hors-série.

RAUHA JP, JL. WOLFENDER, JP. SALMINEN, K. PIHLAJA, K. HOSTETTMANN ET H. VOURELA.(2001). Characterization of the polyphenolic composition of purple loosestrife (*Lythrum Salicaria*). *Z.Naturforsch.* **56**, 13-20.

RAVEL J., WELLINGTON E. M.,& HILL, R. T. (2000).Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **66(2)**.529-534.

RODRIGUEZ-BERNALDO, A. Q. F. S., FRECHA, P. A., VIDAL., & LOPEZ, H. J. (2010). Antioxydant compounds in edible brown seaweeds. *European Food Research & Technology*, 231 (3), 495 –498.

Références bibliographiques

- SABAOU N., BOUDJELLA H., BENNADJI A., MOSTEFAOUI A., ZITOUNI A., LAMARI L., BENNADJI H., LEFEBVRE G. ET GERMAIN P.(1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien. sources d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*.9: 147-153.
- SAKER R.(2015).**Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes .por obtention de diplôme doctorat. Université Ferhat Abbas. Sanglier J.J., Masson : Paris. 33-70p.
- SARKAR S., SAHA S. AND DEBASHIS R. (2008).** Enhanced Production of Antimicrobial Compounds by Three Salt-Tolerant Actinobacterial Strains Isolated from the Sundarbans in a Niche-Mimic Bioreactor. *Mar. Biotechnol.* **10**:518–526.
- SARMA A D, MALLICK A R ET GHOSH A K. (2010).** Free Radicals and Their Role in Different Clinical Conditions: An Overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)*. **1**, 185-192.
- SPRINGMAN AC, LACHER DW, MILTON GWN, ET AL (2009)** Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J Bacteriol* 191:5419–27
- STACKEBRANDT E. ET WOESE C.R. (1981B).** The evolution of prokaryotes. *Synposium Society General Microbiology*. **32**, 1-31
- SUBRAMANIAM G., ARUMUGAM S., AND RAJENDRAN V. (2016).** Plant Growth Promoting Actinobacteria: A New Avenue for Enhancing the Productivity and Soil Fertility of Grain Legumes. Springer. 84p.
- SUBRAMANI R. AND AALBERSBERG W. (2013).** Culturable rare Actinomycetes : diversity, isolation and marine natural product discovery .*Appl Microbiol Biotechnol.* 97:9291–9321
- SUDHANSHU D., RAVINDRA., VIJAY U., SANJAY K., (2011).** Isolation and Characterization of Actinomycetes Producing Antimicrobial Substance against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Pharmacy Research*.vol 4(11), 4066-4068.
- TAKAHASHI Y., OMURA S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49(3):141–154.

Références bibliographiques

THAKUR D, YADAV A, GOGOI B.K, BORA T.C (2007), Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites, *Journal de Mycologie Médicale* 17 : P 242-249.

THEILLEUX J. (1994). Les actinomycètes. In: *Microbiologie industrielle: les micro-organismes d'intérêt industriel*. (Leveau, J.Y. and Bouix, M., Eds). Collection Sciences et Techniques agro-alimentaires.

VALANARASUM, KANNANP, EZHILVENDANS, GANESANG,IGNACIMUTHUS &AGASTIAN P (2010), Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of Streptomyces spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu, *Journal de Mycologie Médicale* 20 : P 290—297.

WAKSMAN S.A. AND HENRICI A.T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol.* 46 :337-341.

WALSH C. (2003). Where will new antibiotics come from?. *Nat Rev Microbiol.* 1(1):65–70.

WAYNE L.G., BRENNER D.J., COLWELL R.R., GRIMONT P.A.D., KANDLER O., KRICHEVSKY M.I., ZHANG Y.Q., LIU H.Y., CHEN J., YUAN L.J., SUN W., ZHANG L.X., ZHANG Y.Q., YU L.Y. AND LI W.J. (2010). Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. *Antonie Leeuwenhoek.* 98 (2):213-223..

WAYNE L.G., BRENNER D.J., COLWELL R.R., GRIMONT P.A.D., KANDLER O., KRICHEVSKY M.I., ZAITLIN B AND WATSON S.B (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. *Water research.* 40.1741-1753

YALA D., MERAD A. S., MOHAMED D., OUAR KORICH M. N., (2001). Classification et Yunnan, China. *Appl Environ Microbiol* ; 62: 244-248

YALA D., MERAD A. S., MOHAMED D. AND OUARKORICH M. N.(2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb.* N° 91

ZHANG Y.Q., LIU H.Y., CHEN J., YUAN L.J., SUN W., ZHANG L.X., ZHANG Y.Q., YU L.Y. AND LI W.J. (2010). Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. *Antonie Leeuwenhoek.* 98 (2):213-223.

Annexe I

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

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

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

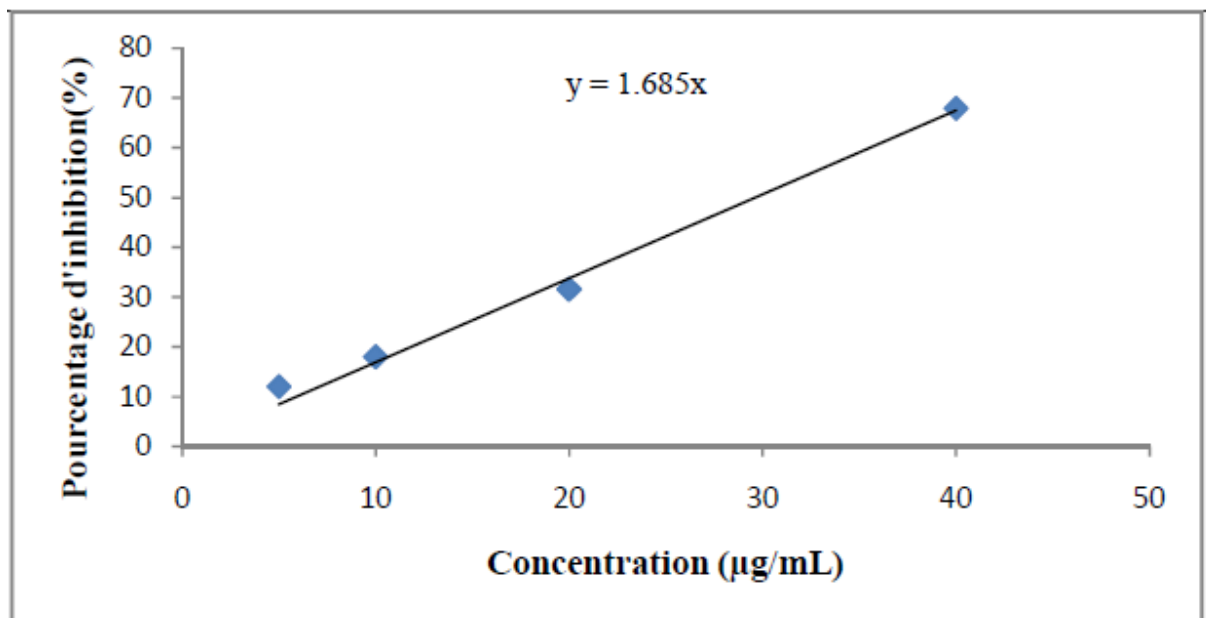


Figure 01 . Activité antioxydante de l'acide ascorbique

Annexe II

Matériel non biologique

- Autoclave
- Anse en platine
- Bain-Marie
- Balance analytique
- Ballons
- Bec Bunsen
- Bêchers
- Boîtes de pétri
- Ecouvillons
- Entonnoir
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Etuves à 28 °C et à 37°C (memmert)
- Flacons
- Micropipette de 10-100µL
- Séchoir
- Shaker
- Pipettes Pasteur
- Plaque agitatrice (Raypa AG-5)
- Rotavapor (Bûchi Rotavapor R-114)
- Tube à essais
- Vortex

Annexe II



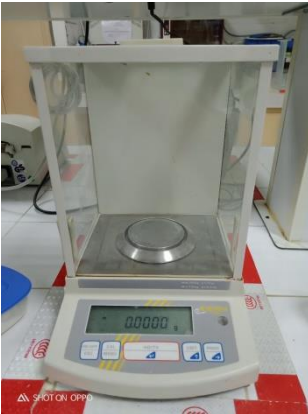
Ampoule à déconter



Erlenmeyer



Centrifugeuse



Balance de précision



Autoclave



Etuve d'incubation



Shaker à l'intérieur



Shaker



Séchoir

Annexe III

Composition de milieux de cultures

✓ **ISP 2 (pH = 7,25)**

Extrait de levure.....	4 g
Extrait de malt.....	10 g
Glucose.....	4 g
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

✓ **ISP 4 (pH = 7,2)**

Amidon	10 g
K ₂ HPO ₄	01 g
MgSO ₄ , 7 H ₂ O.....	01 g
NaCl.....	01 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	02 g
CaCO ₃	02 g
Solution saline standard: FeSO ₄ , 7H ₂ O	01 ml
Agar.....	20 g
Eau distillée.....	1000 ml

✓ **Muller Hinton (pH = 7,5)**

Extrait de viande.....	2 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	10 g
Eau distillée.....	1000 ml