



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université Mohamed Chérif Messaadia
Souk Ahras

– Laboratoire de Sciences et Techniques de l'Eau
et Environnement

Faculté des **Sciences de la Nature et de la Vie**

Thèse

Présentée pour obtenir le diplôme de Doctorat

de 3^{ème} Cycle en : **Sciences Biologiques**

Spécialité : **Biochimie Appliquée**

Titre

Activités biologiques et caractérisations biochimiques des extraits de la plante *Peganum harmala* : effet sur la cinétique de croissance et production des métabolites des actinomycètes (*Streptomyces ayarius* sp. S115)

Présentée par :

NAIT MARZOUG Amel

Devant le jury suivant :

Présidente :	BOURAFI Nadjette	M.C.A	Univ. de Souk Ahras
Directrice de thèse :	KHALDI Fadila	Professeur	Univ. de Souk Ahras
Co-directeur de thèse :	AYARI Adel	M.C.A	Univ. de Souk Ahras
Examinatrice :	GRARA Nedjoud	Professeur	Univ. de Guelma
Examinatrice :	BENHADJ Mabrouka	M.C.A	Univ. de Tébessa
Examinatrice :	AMRI Assia	M.C.A	Univ. de Souk Ahras

Remerciements

Tout d'abord je remercie Allah le tout puissant et miséricordieux, qui m'a donné la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail.

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mes directeurs de thèse, le Professeur **KHALDI Fadila** et le Docteur **AYARI Adel**, d'avoir accepté d'encadrer ce travail, ainsi que pour leurs orientations et leurs conseils qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Je remercie également tous les membres du jury de ma soutenance comprenant le docteur **BOURABA Nadjette** de l'université Souk de Ahras d'avoir accepté de présider le jury, ainsi qu'aux Professeur **GRARA Nedjoud** de l'université de Guelma, Docteur **BENHADJI Mabrouka** de l'université de Tébessa et Docteur **AMRI Assia** de l'université de Souk Ahras d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit malgré leurs occupations.*

*Je voudrais sincèrement remercier le Professeur **KOUACHI Nouha**, chef du laboratoire des écosystèmes aquatiques et terrestres de Souk Ahras, qui m'a accueilli au sein de son laboratoire et qui a mis à ma disposition les conditions nécessaires pour la réalisation de la partie microbiologique qu'elle trouve ici mon respect et reconnaissance.*

Mes remerciements vont également à tout le personnel du laboratoire de Biochimie, Centre de Recherche en Biotechnologie (C.R.Bt), Constantine, pour le climat familiale afin de réaliser une partie de cette thèse.

Mes plus vifs remerciements s'adressent à tout le personnel pédagogique de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.

Dédicaces

À tous ceux qui me sont chers

À une Algérie meilleure



Amel NAIT MARZOUG

Table des matières

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Abstract	
الملخص	
Introduction	1
<i>Première partie. Synthèse bibliographique</i>	
<i>Chapitre 1. Présentation de la plante étudiée : Peganum harmala L.</i>	
1. Généralités sur <i>Peganum harmala</i> L.	4
2. Description botanique	4
3. Position taxonomique	5
4. Aire de répartition	5
5. Étude phytochimique	6
6. Utilisations traditionnelles	9
7. Utilisations pharmacologiques	9
<i>Chapitre 2. Généralités sur les activités biologiques de la plante</i>	
1. Activité antioxydante	10
1.1. Stress oxydatif	10
1.2. Radicaux libres	10
1.3. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées	11
1.4. Antioxydants	11
1.4.1. Antioxydants enzymatiques	11
1.4.2. Antioxydants non enzymatiques	12
2. Activité anti-cholinestérasique	12
2.1. Histoire	12
2.2. Définition	13
2.3. Traitements pharmacologiques	13
2.3.1. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase	13
<i>Chapitre 3. Généralités sur les Streptomyces et leurs métabolismes secondaires</i>	
1. Genre <i>Streptomyces</i>	16
1.1. Diversité, morphologie, taxonomie et génétique des <i>Streptomyces</i>	16
1.2. Produits naturels issus des <i>Streptomyces</i>	17
1.3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques	18

Deuxième partie. Matériel et méthodes

Chapitre 1. Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante *Peganum harmala* L.

1. Matériel végétal	19
2. Analyse qualitative (Screening phytochimique)	20
2.1. Tanins	21
2.2. Anthocyanes	21
2.3. Leuco-anthocyanes	21
2.4. Saponosides	21
2.5. Alcaloïdes	21
2.6. Flavonoïdes	21
2.7. Triterpènes	22
2.8. Coumarines	22
2.9. Quinones	22
2.10. Glucosides	22
3. Préparation des extraits	22
3.1. Rendement d'extraction	23
4. Analyse quantitative des composés phénolique	24
4.1. Dosage des polyphénols totaux	24
4.2. Dosage des Flavonoïdes totaux	24
5. Évaluation <i>in vitro</i> des activités biologiques	24
5.1. Activités antioxydantes	24
5.1.1. Test du piégeage du radical DPPH	24
5.1.2. Test du piégeage du radical ABTS	25
5.1.3. Test du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)	25
5.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	26
5.1.5. Test du pouvoir réducteur	26
5.1.6. Test du piégeage du radical phénanthroline	26
5.1.7. Test de blanchiment du β -carotène	26
5.1.8. Test de chélation des ions ferreux	27
5.2. Activité anti-cholinestérase	27
6. Analyse statistique	28

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

1. Revivification de l'espèce <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115	29
2. Préparation du milieu ISP2 modifié	29
3. Culture et extraction de molécules bioactives de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	29
4. Activité antibactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	30
5. Détermination de la biomasse bactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	30
6. Cinétique de croissance et production de métabolites secondaires dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	30
6.1. Effet des sources de carbone et d'azote	30

Troisième partie. Résultats et Discussion

Chapitre 1. Étude phytochimique et évaluation des activités biologiques de la plante Peganum harmala L.

1. Analyse qualitative	31
2. Rendement d'extraction	32
3. Analyse quantitative	33
3.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes	33
4. Résultats des activités biologiques	35
4.1. Activités antioxydantes	35
4.1.1. Test du piégeage du radical DPPH	35
4.1.2. Test du piégeage du radical ABTS	37
4.1.3. Test du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)	38
4.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)	40
4.1.5. Test du pouvoir réducteur	41
4.1.6. Test du piégeage du radical phénanthroline	43
4.1.7. Test de blanchiment du β -carotène	44
4.1.8. Test de chélation des ions ferreux	46
4.2. Activité anti-cholinestérase	50

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante Peganum harmala L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche Streptomyces ayarius sp. S115

1. Description de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115	53
2. Caractérisations morphologiques de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	54
3. Activité antibactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	55
4. Détermination de la biomasse bactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié	57
5. Cinétique et optimisation de la croissance et de la production de métabolites secondaires dans le milieu ISP2 et ISP2 modifié	59
Conclusion et perspectives	67
Références bibliographiques	69
Annexes	
Productions scientifiques	

Liste des abréviations

A_{0,5}	Concentration indiquant 0,50 d'absorbance
AA	Acide Acétique
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-éthylBenzoThiazoline-6-Sulphonique)
ACh	AcétylCholine
AChE	AcétylCholinEstérase
AChEI	AcétylCholinEstérase Inhibitor
AE	Acétate d'Éthyle
ATCC	American Type Culture Collection
BChE	ButyrylCholinEstérase
BHA	ButylHydroxyAnisole
BHT	ButylHydroxyToluène
CaCO₃	Carbonate de Calcium
CHES	CholinEstérases
CI₅₀	Concentration Inhibitrice à 50%
CuCl₂	Chlorure de Cuivre (II)
CUPRAC	Cupric Reducing Antioxidant Capacity Assay
DPPH	2,2-DiPhényl 1-PicrylHydrazyle
DTNB	DiThiobis 2-NitroBenzoïque
EAG	Equivalent en Acide Gallique
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid
EQ	Equivalent en Quercétine
ERN	Espèces Réactives de Nitrogène
ERO	Espèces Réactives d'Oxygène
FeCl₃	Chlorure de Fer
FeSO₄	Sulfate de Fer
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GOR	GalvinOxyl Radical
H₂SO₄	Acide Sulfurique
HCl	Chlorure d'Hydrogène
Hx	Hexane
ISP2	International <i>Streptomyces</i> Project-2
K₂HPO₄	Phosphate Dipotassique
K₃Fe(CN)₆	FerriCyanure de Potassium
KNO₃	Nitrate de Potassium
KOH	Hydroxyde de Potassium
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
MA	Maladie d'Alzheimer
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>
n-But	n-Butanol
NH₄OH	Ammoniaque
SD	Standard Deviation
TCA	Acide TrichloroAcétique

Liste des figures

Figure 1. Différentes parties de la plante <i>Peganum harmala</i> L. (A) ; (B) Feuilles et Fleurs; (C) Fruits ; (D) Graines.	5
Figure 2. Structure chimique des principaux alcaloïdes de <i>Peganum harmala</i> L.	6
Figure 3. Synthèse des β -carbolines de <i>Peganum harmala</i> L. et de la sérotonine à partir du Tryptophane.	7
Figure 4. Structure générale des quinazolines de <i>Peganum harmala</i> L.	7
Figure 5. Structure chimique des flavonoïdes isolés de <i>Peganum harmala</i> L.	8
Figure 6. Structure chimique des anthraquinones isolés de <i>Peganum harmala</i> L.	8
Figure 7. Stress oxydant et le système antioxydant dans la cellule.	12
Figure 8. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.	14
Figure 9. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> .	16
Figure 10. Situation géographique de la zone d'étude (Carte établie à l'aide du logiciel Mapinfo Pro, Version 12.0.2).	19
Figure 11. <i>Peganum harmala</i> L. en période de floraison.	20
Figure 12. Protocole d'extraction de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	23
Figure 13. Pourcentages d'inhibitions du test DPPH pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	36
Figure 14. Pourcentages d'inhibitions du test ABTS pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	37
Figure 15. Pourcentages d'inhibitions du test galvinoxyl pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	39
Figure 16. Réduction des ions Cu^{2+} par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	40
Figure 17. Capacité de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à réduire le fer (pouvoir réducteur) à différentes concentrations.	42
Figure 18. Test phénanthroline de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	43
Figure 19. Pourcentages d'inhibitions du test β -carotène pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	45
Figure 20. Pourcentages d'inhibitions du test de chélation des ions ferreux pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. à différentes concentrations.	46
Figure 21. Caractéristiques morphologiques de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).	55
Figure 22. Meilleurs solvants dans l'activité antibactérienne de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	56
Figure 23. Cinétique de la biomasse de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	58
Figure 24. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources de carbone) de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).	60
Figure 25. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources d'azote) de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).	63

Liste des tableaux

Tableau 1. Résultats du criblage phytochimique des graines de <i>Peganum harmala</i> L.	31
Tableau 2. Différentes caractéristiques des extraits obtenus à partir de <i>Peganum harmala</i> L.	32
Tableau 3. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	33
Tableau 4. Valeurs de CI ₅₀ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test DPPH.	36
Tableau 5. Valeurs de CI ₅₀ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test ABTS.	38
Tableau 6. Valeurs de CI ₅₀ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test GOR.	39
Tableau 7. Valeurs de A _{0,5} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test CUPRAC.	41
Tableau 8. Valeurs de A _{0,5} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test FRAP.	42
Tableau 9. Valeurs de A _{0,5} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test phénanthroline.	44
Tableau 10. Valeurs de CI ₅₀ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test β-carotène.	45
Tableau 11. Valeurs de CI ₅₀ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L. par le test de chélation des ions ferreux.	46
Tableau 12. Inhibition de l'acétylcholinestérase par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	50
Tableau 13. Inhibition de la butyrylcholinestérase par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante <i>Peganum harmala</i> L.	51
Tableau 14. Caractérisations biochimiques et physiologiques de <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115.	54
Tableau 15. Activité antibactérienne de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	56
Tableau 16. Cinétique de la biomasse de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	58
Tableau 17. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources de carbone) de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	59
Tableau 18. Optimisation de la production de métabolites secondaires (effet des sources de carbone) de <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	61
Tableau 19. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources d'azote) de la souche <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	62
Tableau 20. Optimisation de la production de métabolites secondaires (effet des sources d'azote) de <i>Streptomyces ayarius</i> sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.	64

Résumé

Ce travail contribue à l'étude des activités biologiques des différents extraits obtenus à partir de la plante *Peganum harmala* L. et leur effet sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115.

Un criblage phytochimique a été effectué afin d'identifier les principaux groupes chimiques présents. L'analyse quantitative a été faite en mesurant le contenu en polyphénols et flavonoïdes totaux. La puissance antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par huit méthodes différentes. L'activité enzymatique a été estimée par la méthode d'Ellman. Les caractéristiques morphologiques et l'activité antibactérienne de la souche *S. ayarius* sp. S115 ensemencée dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié a été évaluée par la méthode de diffusion sur puits. La biomasse de la souche *S. ayarius* sp. S115 dans les deux milieux a été déterminée. La cinétique de croissance et la production de métabolites secondaires ont été étudiées pendant 7 jours avec différentes sources de carbone et d'azote.

Le criblage phytochimique a révélé la présence de nombreuses classes de métabolites secondaires. La fraction acétate d'éthyle contenait la teneur la plus élevée en polyphénols et flavonoïdes ($237,23 \pm 1,06 \mu\text{g EAG/ mg}$ d'extrait et $82,58 \pm 0,03 \mu\text{g EQ/mg}$ d'extrait respectivement). La fraction acétate d'éthyle à haute teneur phénolique a présenté également la plus forte activité antioxydante. En outre, la fraction chloroformique a montré l'effet inhibiteur le plus puissant contre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (CI_{50} : $14,69 \pm 0,10$ et $7,36 \pm 0,77 \mu\text{g/ml}$ respectivement). La culture sur l'ISP2 modifié a montré une croissance importante de la souche *S. ayarius* sp. S115 avec un changement de couleur du mycélium aérien de gris au blanc. L'activité antibactérienne a révélé des grandes zones d'inhibition contre les bactéries pathogènes testées par rapport à celles de l'ISP2 avec des zones d'inhibition allant de 13,5 mm à 60,5 mm. Ainsi, la quantité de biomasse de la souche *S. ayarius* sp. S115 était deux fois plus élevée dans l'ISP2 modifié. L'effet des différentes sources de carbone et d'azote sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *S. ayarius* sp. S115 a révélé que la biomasse et les activités antibactériennes les plus élevées étaient obtenues en utilisant du glucose et du tryptone dans l'ISP2 modifié alors que, le glycérol et l'extrait de levure ont été trouvés comme des sources de carbone et d'azote optimales dans l'ISP2. La présente étude a permis de confirmer l'efficacité de la plante comme un ingrédient important dans la composition du milieu ISP2 nécessaire pour la culture des *Streptomyces* producteurs d'antibiotiques et d'apporter une preuve biologique mesurable de son pouvoir antioxydant et anti-cholinestérase.

Mots clés : *Peganum harmala* L., teneur en polyphénols, activités antioxydantes, activité anti-cholinestérase, *Streptomyces ayarius* sp. S115, activité antibactérienne, biomasse, croissance.

Abstract

This work contributes to the study of the biological activities of different extracts obtained from the plant *Peganum harmala* L. and their effect on the growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* strain sp. S115.

A phytochemical screening was performed to identify the main chemical groups present. Quantitative analysis was done by measuring the total polyphenol and flavonoid content. The antioxidant power of extracts was evaluated *in vitro* by eight different methods. Enzymatic activity was estimated by Ellman's method. The morphological characteristics and antibacterial activity of *S. ayarius* strain sp. S115 seeded in ISP2 and the modified ISP2 media was evaluated by well diffusion method. The biomass of *S. ayarius* strain sp. S115 in both media was determined. Growth kinetics and production of secondary metabolites were studied for 7 days in different carbon and nitrogen sources.

The phytochemical screening revealed the presence of numerous classes of secondary metabolites. The ethyl acetate fraction contained the highest content of polyphenols and flavonoids (237.23 ± 1.06 μg GAE/mg of extract and 82.58 ± 0.03 μg QE/mg of extract, respectively). The ethyl acetate fraction with high phenolic content also exhibited the strongest antioxidant activity. In addition, the chloroform fraction showed the most potent inhibitory effect against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (IC₅₀: 14.69 ± 0.10 and 7.36 ± 0.77 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). Culture on the modified ISP2 showed an effective growth of *S. ayarius* strain sp. S115 with changed color of the aerial mycelium from gray to white. The antibacterial activity revealed large inhibition zones against the tested pathogenic bacteria compared to those of ISP2 with inhibition zones ranging from 13.5 mm to 60.5 mm. Thus, the amount of *S. ayarius* strain sp. S115 biomass was twice as high in the modified ISP2. The effect of different carbon and nitrogen sources on the growth and production of secondary metabolites of *S. ayarius* strain sp. S115 revealed the highest biomass and antibacterial activities were obtained through using glucose and tryptone in the modified ISP2, whereas glycerol and yeast extract were found as the optimal carbon and nitrogen sources in ISP2. The present study confirmed the effectiveness of the plant as an important ingredient in the ISP2 medium required for the culture of antibiotic-producing *Streptomyces* and provided measurable biological proof of its antioxidant and anti-cholinesterase power.

Key words : *Peganum harmala* L., polyphenol content, antioxidant activities, anti-cholinesterase activity, *Streptomyces ayarius* sp. S115, antibacterial activity, biomass, growth.

الملخص

يساهم هذا العمل في دراسة الأنشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة التي تم الحصول عليها انطلاقاً من نبات *Peganum harmala* L. وتأثيرها على نمو وإنتاج الأيض الثانوي لسلالة *Streptomyces ayarius* sp. S115.

تم إجراء فحص كيميائي نباتي لتحديد المجموعات الكيميائية الرئيسية الموجودة. تم تنفيذ التحليل الكمي عن طريق قياس المحتوى الكلي للبوليفينول و الفلافونويد. تم تقييم فاعلية المستخلصات المضادة للأكسدة في المختبر بثمانية طرق مختلفة. أما بالنسبة للنشاط الأنزيمي فقد تم تقديره وفق طريقة Ellman's. تم تقييم الخصائص المورفولوجية والنشاط المضاد للبكتيريا لسلالة *S. ayarius* sp. S115 المزروعة في الأوساط ISP2 و ISP2 المعدل بواسطة طريقة الانتشار على الإبار. كما تم تحديد الكتلة الحيوية لسلالة *S. ayarius* sp. S115 في كلا الوسيطين. أيضاً تمت دراسة حركية النمو وإنتاج الأيض الثانوي لمدة 7 أيام بمصادر مختلفة من الكربون و الأزوت.

كشفت الفحص الكيميائي النباتي عن وجود فئات عديدة من الأيض الثانوي. حيث احتوى جزء أسيتات الإيثيل على أعلى كمية من البوليفينول والفلافونويد (1.06 ± 237.23 مكغ مكافئ حمض الغاليك/ملغ من المستخلص و 82.58 ± 0.03 مكغ مكافئ كيرسيتين/ملغ من المستخلص على التوالي). كما أظهر جزء أسيتات الإيثيل ذو المحتوى الفينولي الكبير أعلى نشاط مضاد للأكسدة. بالإضافة الى ذلك، سجل جزء الكلوروفورم التأثير المثبط الأكثر فعالية ضد الأستيل كولينستراز والботيريل كولينستراز (CI50: $0,10 \pm 14,69$ و $0,77 \pm 7,36$ مكغ/مغ على التوالي). أظهرت الزراعة على ال ISP2 المعدل نموًا ملحوظًا في سلالة *S. ayarius* sp. S115 مع تغير لون الميسيليوم الهوائي من الرمادي إلى الأبيض. كما أظهر النشاط المضاد للبكتيريا عن وجود مناطق تثبيط كبيرة تتراوح ما بين 13,5 مم و 60,5 مم ضد البكتيريا المسببة للأمراض التي تم اختبارها مقارنة بتلك الموجودة في ال ISP2. كذلك، كانت كمية الكتلة الحيوية لسلالة *S. ayarius* sp. S115 أعلى بضعفين في ال ISP2 المعدل. بينت الدراسة تأثير مصادر الكربون و الأزوت المختلفة على نمو وإنتاج الأيض الثانوي لسلالة *S. ayarius* sp. S115 أن أعلى كتلة حيوية وأنشطة مضادة للبكتيريا تم الحصول عليهم عند استخدام الجلوكوز والتريبتون في ال ISP2 المعدل بينما، تم العثور على الجليسيرول ومستخلص الخميرة كمصادر كربون مثالية في ال ISP2. أكدت الدراسة الحالية فعالية النبات كمكون مهم في وسط ال ISP2 الضروري لزراعة *Streptomyces* المنتجة للمضادات الحيوية وقدمت دليلاً بيولوجياً قابلاً للقياس لمضادات الأكسدة و الكولينستراز.

الكلمات المفتاحية: *Peganum harmala* L.، محتوى البوليفينول، الأنشطة المضادة للأكسدة، النشاط المضاد للكولينستراز، *Streptomyces ayarius* sp. S115، الكتلة الحيوية، النمو.

Introduction

Introduction

L'utilisation empirique des plantes médicinales est aussi vieille que l'histoire de l'humanité. Depuis les temps anciens, elles constituent la colonne vertébrale du système traditionnel de guérison dans le monde entier (**Malik et al., 2022**). Dans les pays en développement, plus de 80% de la population dépend des plantes médicinales pour ses soins de santé primaires (**Adnan et al., 2014 ; Zargoosh et al., 2019**). Le recours au traitement par les plantes ainsi que la recherche de nouvelles substances à activité biologique constituent une des plus grandes préoccupations scientifiques, pour un objectif majeur, d'éviter l'utilisation des médicaments synthétiques qui ont des effets secondaires non négligeables sur la santé humaine (**Karimi et al., 2015**).

La surproduction des espèces réactives d'oxygènes, au-delà des capacités antioxydantes des systèmes biologiques conduit au stress oxydant, qui est impliqué dans l'apparition de plusieurs troubles à savoir le cancer, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives. Bien que, l'utilisation de molécules antioxydantes de synthèse est actuellement remise en cause en raison des risques toxicologiques potentiels et de cancérisation (**Bammou et al., 2020**).

D'un autre côté, l'émergence de la résistance bactérienne vis-à-vis aux antibiotiques, constitue un sérieux problème de santé publique du fait de l'inefficacité et du nombre limité des agents antimicrobiens disponibles. En outre, devant le nombre très limité de nouvelles molécules antimicrobiennes en développement, l'augmentation des résistances présente une des plus grandes menaces du 21^{ème} siècle (**Junior et al., 2018**). D'où l'importance d'orienter les recherches vers de nouvelles molécules antimicrobiennes, d'origine naturelle, à cause de la toxicité des antibiotiques synthétiques.

Dans ce contexte, les industries pharmaceutiques mondiales sont intéressées par la production d'antibiotiques à partir des actinomycètes et plus particulièrement les *Streptomyces* en raison de leur capacité à synthétiser de métabolites secondaires bioactifs (**Amin et al., 2017**). Ces bactéries constituent la source idéale de plusieurs composés anticancéreux, enzymatiques, inhibiteurs d'enzymes et principalement d'antibiotiques (**Bhakyashree et al., 2020 ; Al-shaibani et al., 2021 ; Vijayakumar et al., 2021**). Ces derniers sont majoritairement produits à grande échelle par des procédés de fermentation, par lequel l'augmentation des rendements de production nécessite l'amélioration des souches productrices et de leurs conditions de culture et par conséquent, le métabolisme bactérien peut

être régulé de manière efficace. De ce fait, il est nécessaire de chercher des stimulateurs qui augmentent la croissance et la production des antibiotiques afin de pouvoir les utiliser vis-à-vis les micro-organismes pathogènes. Ainsi, l'utilisation des extraits de plantes médicinales dans les milieux de cultures, est un outil précieux de conception et de développement des procédés de fermentation (**Kannaiyan et al., 2012**).

Les plantes médicinales constituent un réservoir important inépuisable de biomolécules présentant des vertus thérapeutiques variées. Elles contiennent une grande diversité de biomolécules très intéressantes pour le développement de médicaments contre diverses cibles pharmacologiques. En effet, les métabolites secondaires font et restent l'objet de nombreuses recherches *in vitro* et *in vivo*, notamment la recherche de nouveaux constituants naturels tels que les alcaloïdes et les composés phénoliques (**Iqbal et al., 2017**).

Grâce à sa surface, sa situation géographique particulière, ses sols et son climat très variés, l'Algérie, constitué d'une gamme d'espèces végétales très diversifiée et riche en matières actives, sa richesse floristique est incontestable avec environ 4300 espèces et sous-espèces de plantes vasculaires avec un taux d'endémisme à 10% environ du nombre total des espèces (**Kouider et al., 2019**). Cependant, ce potentiel floristique reste très peu exploré d'un point de vue phytochimique et biologique.

De ces nombreuses plantes médicinales, notre étude s'est portée essentiellement sur l'espèce *Peganum harmala* L. généralement connue sous le nom de harmel de la famille des *Zygophyllaceae*, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle dans le traitement des maladies respiratoires et les inflammations (**Wang et al., 2016**). Cette espèce est également utilisée pour ses propriétés anticancéreuses, antivirales, antidiabétiques, antidépressives et antimicrobiennes (**Al-Harrasi et al., 2022 ; Gazel et al., 2023 ; Morsy et al., 2023**). De plus, la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 est une nouvelle souche découverte par Dr. AYARI Adel en 2017 et qui a été isolée à partir des sédiments du lac Oubeira, situé au Nord-Est Algérien enregistrée dans la base des données GenBank sous le numéro d'accès JQ96575.

Le but de notre travail s'inscrit donc dans le cadre d'une contribution à une meilleure connaissance des molécules bioactives contenues dans *Peganum harmala* L. poussant en Algérie et d'évaluer leurs activités biologiques. Outre, l'étude de l'effet de cette espèce algérienne sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 n'a pas fait jusqu'à présent l'objet d'études.

Notre travail est divisé en trois parties, nous aborderons dans la première partie une étude bibliographique qui regroupe trois chapitres dont le premier présente un aperçu sur l'espèce étudiée, *Peganum harmala* L., son utilisation traditionnelle et pharmacologique. Le deuxième chapitre comprend des généralités sur l'activité antioxydante et anti-cholinestérase. Le troisième chapitre expose des données générales sur le genre *Streptomyces*.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes utilisées dans ce travail qui porte sur :

- Récolte, identification et criblage phytochimique de l'espèce étudiée ;
- Extraction et dosage quantitatif des taux de polyphénols et flavonoïdes ;
- Évaluation de l'activité antioxydante des extraits par différents tests *in vitro* ;
- Évaluation de l'activité anti-cholinestérase ;
- Tester le comportement de la souche vis-à-vis de l'extrait végétal ;
- Étude de la biomasse de la souche vis-à-vis de l'extrait végétal ;
- Étude de l'effet de l'extrait de la plante médicinale sur la cinétique de croissance et de production de métabolites secondaires de la souche.

La dernière partie de ce travail comprend l'interprétation des résultats au regard de la littérature. Et à la fin une conclusion sur l'ensemble des résultats, ainsi que les perspectives attendues.

Première partie. Synthèse
bibliographique

Chapitre 1.

Présentation de la plante étudiée:

Peganum harmala L.

1. Généralités sur *Peganum harmala* L.

Peganum harmala L. est une plante faisant partie de la famille des *Zygophyllaceae*. Les plantes de cette famille sont facilement identifiables grâce à leur aspect, qu'il s'agisse d'herbes, d'arbustes ou d'arbres. Selon la classification de Sheahan et Chase (1996), cette famille compte environ 285 espèces, réparties en cinq sous-familles et 27 genres. Elles sont largement répandues dans les régions arides, semi-arides, les sols salins et les pâturages désertiques (Asgarpanah et Ramezanloo, 2012). Le genre *Peganum* tire son nom du grec qui signifie "rue", tandis que le nom d'espèce "*harmala*" est dérivé de celui de la ville libanaise Hermel (Mars, 2009).

2. Description botanique

Peganum harmala L. est une plante herbacée vivace très ramifiée, densément feuillue, avec une étendue de 120 cm et une hauteur allant jusqu'à 60 cm, et semble généralement ronde et touffue (Dube, 2011) (Figure 1). Chez les plantes matures, la tige est rigide, dressée, fortement ramifiée, inclinée au-dessus et glabre (Watson *et al.*, 2011). Les feuilles sont alternes, charnues, vert vif, de 2 à 5 cm de long, et irrégulièrement divisées trois fois ou plus en segments linéaires (Roché, 1991 ; Parsons et Cuthbertson, 1992). Les fleurs sont bisexuées, blanches ou jaune pâle, de 2,5 cm de diamètre et solitaires sur des tiges de 2 à 5 cm de long ou plus dans les aisselles foliaires. Elles sont dotées de dix à quinze étamines. Le gynécée est de 8 à 9 mm de longueur, à ovaire supère (une fleur hypogyne) et globuleux, surmonté d'un style cylindrique. Il est composé de trois à quatre loges et de stigmates à trois carènes (Bouziane, 2012). Les fruits sont des capsules sphériques et coriaces de 7 à 15 mm de diamètre, vertes quand elles ne sont pas mûres et brun orangé à maturité (Preedy *et al.*, 2011). Les capsules ont trois chambres, qui s'ouvrent par trois valves à l'apex pour libérer de nombreuses graines brun foncé à noires, anguleuses, de 3-4 mm de long (Bahmani *et al.*, 2013 ; Kemassi *et al.*, 2013). La racine est oblongue, dure et garnie de fibres. Elle peut atteindre plus de 3 m de profondeur (Quézel et Santa, 1963). Des nouvelles pousses peuvent se développer à partir des racines latérales (Roché, 1991 ; Parsons et Cuthbertson, 1992). La plante n'est généralement pas broutée par les animaux en raison de son goût amer (Khan *et al.*, 2017).



Figure 1. Différentes parties de la plante *Peganum harmala* L. (A) ; (B) Feuilles et Fleurs ; (C) Fruits ; (D) Graines (**Kemel et al., 2024**).

3. Position taxonomique

Règne : Plantae

Embranchement : Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe : Dicotylédones

Sous classe : Rosidae

Ordre : Sapindales

Famille : *Zygophyllaceae*

Genre : *Peganum*

Espèce : *Peganum harmala* L. (**Ozenda, 1991**).

4. Aire de répartition

Peganum harmala L. est une plante de désert, originaire de la région de la Méditerranée orientale. Elle est particulièrement répandue dans les régions semi-arides, arides et sahariennes (**Lamchouri et al., 2013**). Cette plante pousse en Afrique du Nord, Moyen-

Orient, Inde, Pakistan, Turquie, Iran et a été introduite en Australie et en Amérique (**Moshiri et al., 2013**).

En Algérie, cette espèce est commune aux Hauts Plateaux, au Sahara méridional, septentrional, et aux montagnes du Sahara central. Elle est réputée pour les terrains sableux, à l'intérieur des agglomérations et dans les lits d'oued (**Ozenda, 1991**).

5. Étude phytochimique

Les études phytochimiques de *Peganum harmala* L. ont conduit à l'isolement des différents composés les plus pharmacologiquement actifs tels que les alcaloïdes, les flavonoïdes et les anthraquinones (**Bukhari et al., 2008**). La teneur totale en alcaloïdes de *Peganum harmala* L. varie entre 2 et 5 %. L'harmaline, l'harmine, l'harmalol, l'harmol et la tétrahydroharmine (**Figure 2**) sont identifiés et quantifiés comme les principaux alcaloïdes de la bêta-carboline (dérivés de l'acide amine Tryptophane) (**Figure 3**) dans les extraits de *Peganum harmala* L., le contenu de ces métabolites secondaires dépend du stade de développement de la plante (**Mayad et al., 2013**). L'harmaline et l'harmine s'accumulent dans les graines sèches à 5,6 et 4,3 % (p/p). De même, la tétrahydroharmine et l'harmalol sont respectivement à 0,1 % et à 0,6 % (p/p). Les racines contiennent l'harmol et l'harmine avec 1,4 et 2,0 % (p/p) (**Herraiz et al., 2010**).

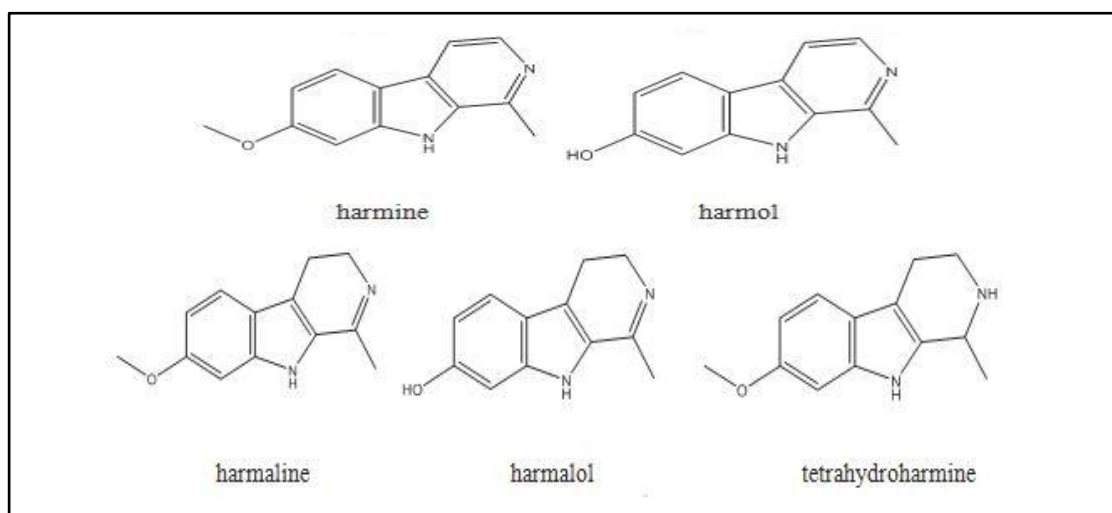
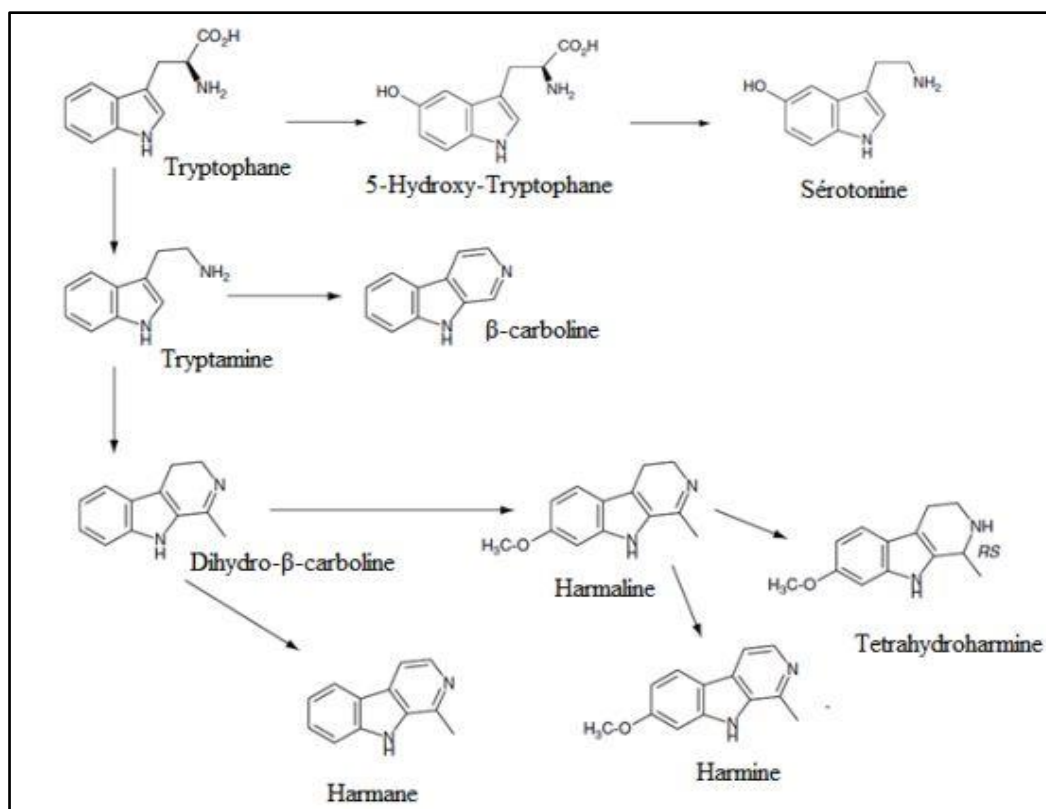
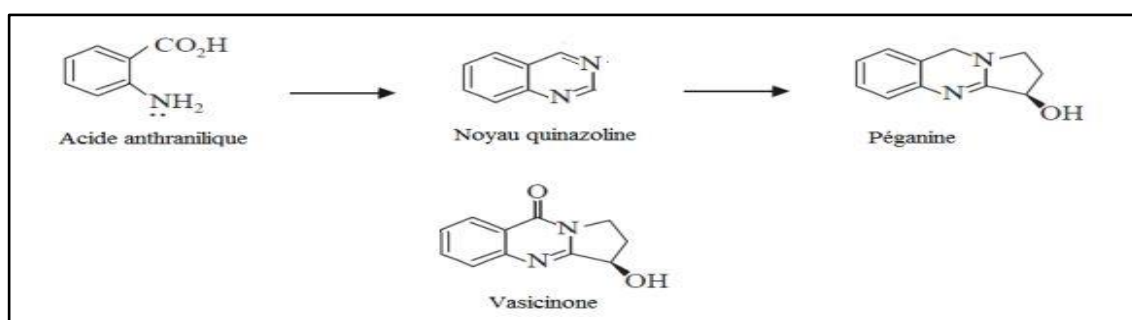


Figure 2. Structure chimique des principaux alcaloïdes de *Peganum harmala* L. (**Mamadaliyeva et al., 2022**).



La teneur en alcaloïdes des graines en maturation est inférieure à celles mûres (Kartal *et al.*, 2003). De nombreuses études montrent que d'autres alcaloïdes présents dans *Peganum harmala* L. jouent également un rôle dans les effets pharmacologiques de la plante tels que la Peganine, dipeganine, isopeganine, désoxypéganine (Fathizad *et al.*, 2007) et les dérivés de quinazoline, tels que vasicine, vasicinone et deoxyvasicinone (Mahmoudian *et al.*, 2002, Kartal *et al.*, 2003). Les graines de *Peganum harmala* L. contiennent ces quinazolines, dont le précurseur est l'acide anthranilique (Figure 4) (Khashimov *et al.*, 1969).



Les parties aériennes de *Peganum harmala* L. contiennent quatre nouveaux flavonoïdes (**Figure 5**), dont l'acétine 7-O-rhamnoside, le 7-O-6''-O-glucosyl-2''-O-(3'''-acétylrhamnosyl) glucoside, le 7-O-(2'''-O-rhamnosyl-2''-O-glucosylglucoside) et la glycoflavone 2'''-O rhamnosyl-2''-O-glucosylcytioside (**Elansary et al., 2020**).

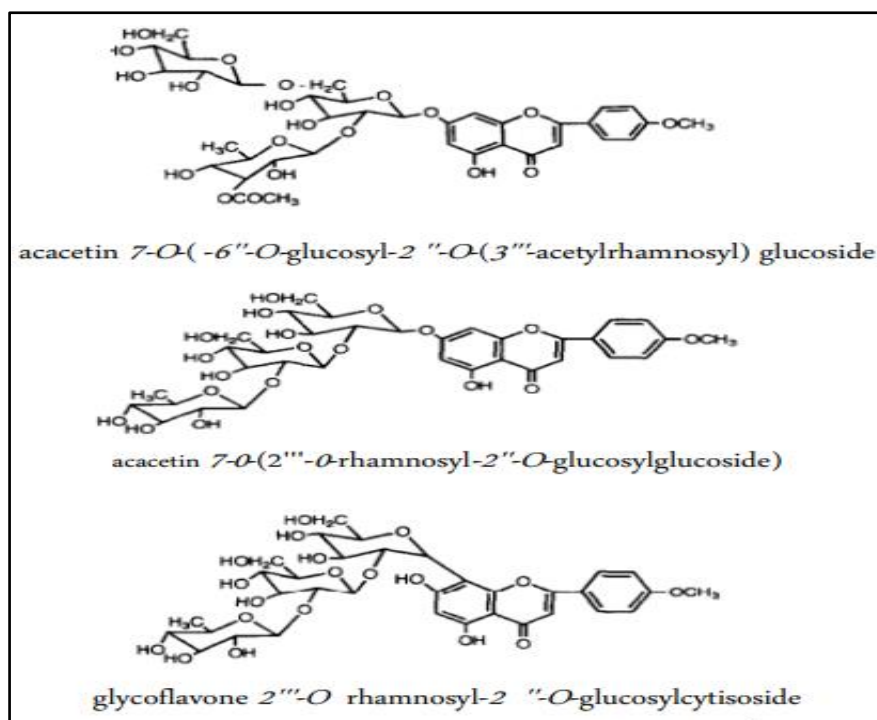


Figure 5. Structure chimique des flavonoïdes isolés de *Peganum harmala* L.
(Sharma et al., 2022).

Deux nouvelles anthraquinones ont été isolées des graines de *Peganum harmala* L. (**Figure 6**) et les structures sont établies comme 3,6-dihydroxy-8-méthoxy-2-méthylantraquinone (peganone1) et 8-hydroxy-7-méthoxy-2-méthylantraquinone (peganone2) (**Wang et al., 2017**).

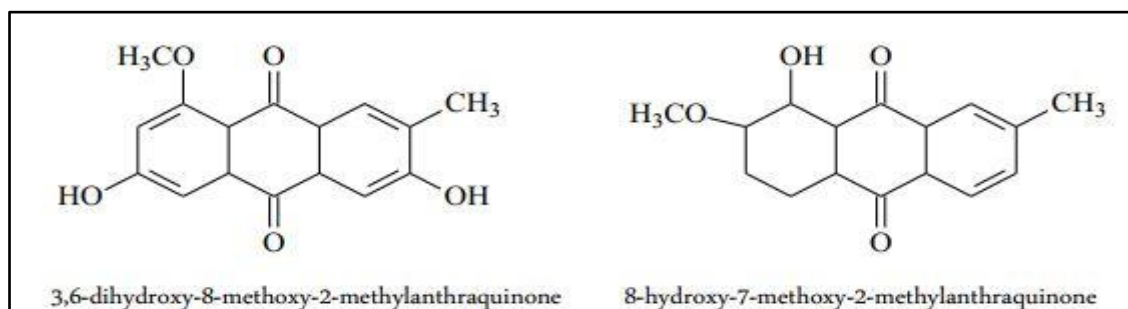


Figure 6. Structure chimique des anthraquinones isolés de *Peganum harmala* L.
(Sharma et al., 2022).

6. Utilisations traditionnelles

Peganum harmala L. est considérée parmi l'une des plantes médicinales les plus célèbres dans la médecine traditionnelle (**Boullard, 2001**), ses graines sont connues pour leurs propriétés hallucinogènes, hypothermiques, emménagogues, narcotiques, antispasmodiques et anthelminthiques (**Idrissi Hassani et Hermas, 2008**).

Cette plante est traditionnellement utilisée pour le traitement du diabète en médecine folklorique dans certaines parties du monde et pour traiter certains troubles du système nerveux tels que la maladie de Parkinson (**Leporatti, 2009**) et des conditions psychiatriques comme la nervosité (**Herraiz et al., 2010**). Diverses parties de la plante, notamment ses graines, son écorce et sa racine, sont très réputées dans la médecine traditionnelle pour le traitement d'une variété de maladies humaines, y compris les rhumatismes, l'asthme, la colique, le lumbago et la jaunisse (**Asgarpanah et Ramezanloo, 2012**).

Dans la médecine traditionnelle Algérienne et Maghrébine, harmel est très utilisé pour traiter plusieurs troubles tels que la stérilité féminine, dermatoses (eczémas), conjonctivites purulentes, blépharites et alopécie. Il possède des propriétés hypnotiques, antipyrétiques, antalgiques, antitussives, antidiarrhéiques, antiseptiques et cicatrisantes (**Hammiche et Merad, 1997**).

7. Utilisations pharmacologiques

En raison de sa richesse en différents métabolites secondaires, *Peganum harmala* L. présente un large spectre des propriétés pharmacologiques, ce qui en fait un sujet d'étude intéressant pour des nombreux auteurs. Ses alcaloïdes ont montré plusieurs effets pharmacologiques tels que les effets anticancéreux (**Bournine et al., 2016**), analgésiques (**Farouk et al., 2008**), antidépresseurs (**Sassoui et al., 2015**), vasorelaxants (**Astulla et al., 2008**), anticholinestérasiques (**Yang et al., 2015**) et antimicrobiens (**Arshad et al., 2008**).

En outre, différentes activités biologiques et pharmacologiques de *Peganum harmala* L. ont été révélées, à savoir l'activité insecticide (**Jbilou et al., 2008**), antileishmania (**Mirzaie et al., 2007**), antioxydante (**Edziri et al., 2010**), antibactérienne (**Darabpour et al., 2011**), antifongique (**Nenaah, 2010**), antivirale (**Moradi et al., 2017**), hypoglycémique (**Singh et al., 2004**), anti-inflammatoire (**Mahajna et al., 2015**), effet hépatoprotecteur et activité cytotoxique entre autres (**Hamden et al., 2008**).

Chapitre 2.

Généralités sur les

activités biologiques de

la plante

1. Activité antioxydante

1.1. Stress oxydatif

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions physiques, chimiques et métaboliques. La plupart de ces agressions débouchent sur une expression commune appelée stress oxydant (**Toure, 2015**). Ce dernier est défini comme un déséquilibre entre les oxydants et les antioxydants en faveur des premiers, conduisant à une perturbation de la signalisation et du contrôle redox et/ou à des dommages moléculaires (**Sies, 2020**).

1.2. Radicaux libres

L'oxygène (O_2) est le premier élément essentiel à la vie de tous les organismes aérobies, il joue un rôle très important dans la respiration mitochondriale afin de produire l'énergie. Cependant, la réduction de l'oxygène lors de l'oxydation des molécules endogènes ou bien exogènes aboutira à la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Par définition, un radical libre est une entité chimique, molécule ou atome contenant un ou plusieurs électrons célibataires « non-appariés », sur la couche périphérique du squelette moléculaire. Les radicaux libres sont très instables et réagissent rapidement avec d'autres molécules, essayant de capturer l'électron nécessaire pour se stabiliser, déstabilisant ainsi d'autres molécules et initiant une réaction en chaîne (**Atta et al., 2017**).

Les radicaux libres font partie de la famille des espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui regroupe l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical hydroxyle (OH^{\bullet}), le radical peroxyde (RO), et le radical alkoxyde (RO^{\bullet}) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaire dont la toxicité est importante tels que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), l'ozone (O_3) et l'oxygène singulet (1O_2). A côté des ROS, il existe des espèces réactives nitrogènes (ERN) qui sont générés en permanence par l'organisme dont le représentant majeur est le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) (**Dhawan, 2014**).

On distingue deux types de production de radicaux libres:

- Production endogènes comme les réactions enzymatiques (NADPH oxydase, la xanthine oxydase (enzyme dans le foie), lipoxygénase, mitochondries, phagocytoses, peroxysomes, exercice physique, inflammation, métaux de transition, choc...etc) (**Favier, 2003**).
- Production exogènes comme la pollution, les médicaments, l'alcool, le soleil, le tabagisme, les produits chimiques et les rayons UV (**Favier, 2003**).

1.3. Conséquences biologiques des espèces réactives oxygénées

Les réactions des radicaux libres peuvent modifier chimiquement les composés environnants, favorisant la perte des fonctions physiologiques dans les organismes vivants. Un déséquilibre entre la production de radicaux libres (ERO/ERN) et les défenses antioxydantes augmente leurs concentrations, endommageant des classes importantes de molécules biologiques, telles que les acides nucléiques, les protéines, les lipides et les sucres (Martemucci *et al.*, 2022), entraînant des lésions cellulaires et tissulaires ayant des implications pathologiques notamment celles liées au vieillissement, et d'autres maladies comme l'athérosclérose, le cancer, les maladies inflammatoires, cardiovasculaires ou encore les maladies de Parkinson et d'Alzheimer (Vona *et al.*, 2021).

1.4. Antioxydants

Pour faire face aux attaques dues aux ERO, les organismes ont développé des systèmes de défense qui visent à éliminer les ERO et les catalyseurs de leur formation et à induire la synthèse des antioxydants. Ces derniers sont des molécules capable, à concentration relativement faible, d'entrer en compétition avec d'autres substrats oxydables et ainsi retarder, neutraliser ou de réduire l'oxydation et les dommages causés par les ERO sur les composés cellulaires (Rahman, 2007). Le système de défense antioxydant consiste en un réseau enzymatique et non enzymatique aussi bien endogène qu'exogène.

1.4.1. Antioxydants enzymatiques

La cellule est assurée par son système complexe de défense antioxydant endogène. Cette ligne de défense s'agit principalement de trois enzymes: la superoxyde dismutase (catalyse la dismutation de l'anion superoxyde), la catalase (métabolise l' H_2O_2) et la glutathion peroxydase (action réductrice sur l'hydrogène et assure la transformation des hydroperoxydes organiques, lipidiques notamment, de type ROOH en ROH) (Figure 7) (Irato et santovito, 2021).

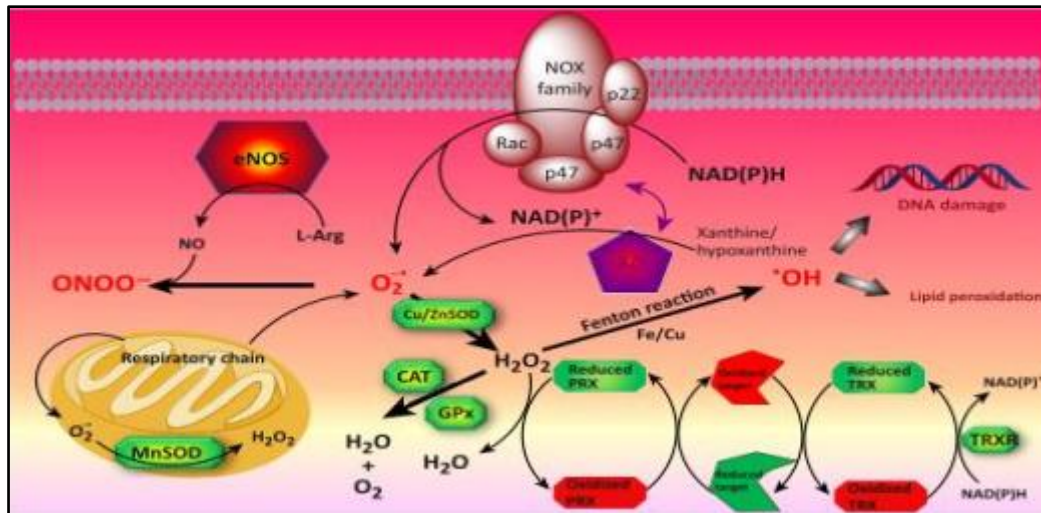


Figure 7. Stress oxydant et le système antioxydant dans la cellule (Poprac *et al.*, 2017).

1.4.2. Antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les vitamines E et C, les oligoéléments, les caroténoïdes, les polyphénols, le glutathion et l'acide lipoïque (Irato et santovito, 2021).

2. Activité anti-cholinestérasique

2.1. Histoire

La maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite pour la première fois par le psychiatre et neurologue allemand Alois Alzheimer en 1901, en étudiant le cas d'un de ses patients de 50 ans (Auguste Deter). Alzheimer l'a suivie jusqu'à sa mort en 1906 et a décrit les changements anatomiques observés dans son cerveau. Après sa mort, Alzheimer a pratiqué une autopsie de son cerveau et a constaté deux types de lésions caractéristiques dans le cortex cérébral: des plaques séniles à la surface des neurones et une dégénérescence neurofibrillaire intraneuronale. En 1906, Alzheimer a présenté publiquement ses observations cliniques et histologiques lors de la 37ème Conférence des psychiatres allemands à Tübingen. Par la suite, un de ses collègues psychiatres, Emil Kraepelin, a proposé que cette pathologie cérébrale soit nommée d'après son découvreur, Alois Alzheimer (Yang *et al.*, 2016).

2.2. Définition

La maladie d'Alzheimer est la principale cause de démence, ce qui en fait un enjeu important pour la santé publique. Elle est définie par une dégénérescence des neurones débutant dans l'hippocampe et se propageant dans l'ensemble du cerveau. Celle-ci implique une détérioration de la mémoire et est caractérisée par un trouble neurodégénératif progressif mais irréversible en raison d'importantes atrophies neuronales avec une perte des neurones et des synapses dans différentes régions du cerveau, conduisant à terme à une atrophie cérébrale généralisée (**Bourdenx et al., 2017**). C'est la forme de démence la plus répandue chez les personnes âgées avec la sévérité de son tableau clinique et l'absence de traitement curatif (**Breijyeh et Karaman, 2020**).

2.3. Traitements pharmacologiques

Actuellement, le traitement de la maladie d'Alzheimer n'a pas d'impact sur la progression ou la pathologie sous-jacente de la maladie. Cependant, grâce aux médicaments et à d'autres thérapies, des mesures sont prises pour améliorer la qualité de vie des personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer. Les thérapies actuelles sont basées sur la théorie cholinergique, qui attribue une diminution de la neurotransmission cholinergique à un déclin des fonctions cognitives. À l'heure actuelle, deux classes de traitements pharmacologiques sont disponibles pour la MA : les inhibiteurs de la cholinestérase (donépézil, rivastigmine et galantamine) qui sont autorisés chez les patients atteints de démence légère, modérée ou sévère de la MA et la mémantine qui est approuvée pour les patients atteints de la MA modérée à sévère qui peuvent également présenter des troubles de la vigilance et de l'attention (**McGirr et al., 2020**).

2.3.1. Inhibiteurs de l'acétylcholinestérase

Les cholinestérases (ChEs) sont une famille des enzymes qui partagent une grande homologie de séquence (65 %). Les ChEs des vertébrés ont été classées en deux types, acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE), sur la base de la spécificité de leurs substrats et de leurs sensibilités distinctes aux inhibiteurs, qui servent des cibles enzymatiques pour la MA. L'AChE joue un rôle crucial dans les synapses cholinergiques du cerveau et les jonctions neuromusculaires. Elle est présente dans les tissus neuronaux et régule le flux nerveux en dégradant l'acétylcholine résiduelle provenant des transmissions nerveuses, libérant ainsi l'espace synaptique pour de nouvelles transmissions potentielles et

permettant le passage des informations (De Boer *et al.*, 2021). Selon l'hypothèse cholinergique, les troubles de la mémoire chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer résultent d'une déficience de la fonction cholinergique dans le cerveau. Plus précisément, des niveaux réduits d'acétylcholine (ACh) dans l'hippocampe et le cortex sont généralement considérés comme la cause des problèmes cognitifs observés dans cette maladie (Bekdash, 2021).

Bien que le rôle précis de la BChE n'est pas encore bien élucidé, il est rapporté d'être impliquée dans la tumorigenèse, la morphogenèse et la cytogénèse, la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires au cours du développement neuronal précoce, en tant que fixateur pour la détoxification de certains produits chimiques, et dans le métabolisme des lipoprotéines. De plus, les données biologiques confirment le rôle de la BChE dans la perturbation de la neurotransmission cholinergique observée dans la MA (Jasiecki *et al.*, 2021).

Une des approches pour augmenter les niveaux d'acétylcholine au niveau synaptique consiste à réduire sa dégradation en inhibant l'action de l'acétylcholinestérase (Figure 8). C'est sur la base de cette hypothèse que les inhibiteurs de l'AChE sont apparus sur le marché. Par la suite, il a été découvert que cette enzyme, en plus de sa fonction dans la dégradation de l'acétylcholine, accélère la formation de plaques amyloïdes, ceci renforce l'intérêt de découvrir de nouveaux inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Wang et Zhang, 2018).

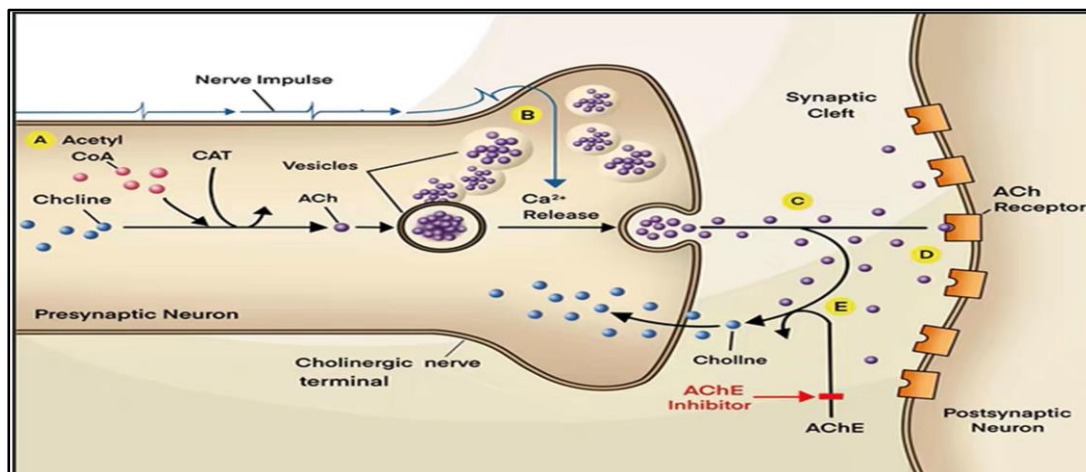


Figure 8. Mécanisme d'action des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Chen *et al.*, 2022).

Plusieurs études sur les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChEi) nouvellement découverts provenant des plantes, des champignons et d'organismes marins ont également été publiées ces dernières années. La majorité de ces AChEi appartiennent au groupe des alcaloïdes, y compris les alcaloïdes indoliques. D'autre part, plusieurs AChEi puissants et non alcaloïdaux ont été obtenus à partir des sources naturelles, notamment les terpénoïdes, les flavonoïdes et d'autres composés phénoliques (**Gregory *et al.*, 2021**).

Chapitre 3.
Généralités sur les
Streptomyces et leurs
métabolismes
secondaires

1. Genre *Streptomyces*

1.1. Diversité, morphologie, taxonomie et génétique des *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* représente la famille la plus importante au sein des *Streptomycetaceae* (ordre des *Actinomycetales*) (Lee *et al.*, 2020), qui comprend plus de 850 espèces, résidant dans une variété d'environnements, tels que les environnements extrêmes et les habitats sous-explorés, les régions terrestres et marines, les symbiotes, les endophytes, les mangroves (Aryal *et al.*, 2020). Il s'agit des bactéries filamenteuses à Gram positif, neutrophiles, aérobies facultatives, mésophiles, dont la température de croissance se situe entre 25 et 35 °C et dont l'ADN a une teneur en G + C supérieure à 70 % et des génomes linéaires et modérément grands (8-10 Mb), considérés comme des caractéristiques particulières parmi les bactéries (Hopwood, 2019).

Les espèces de *Streptomyces* peuvent former des mycéliums de substrats ramifiés et des mycéliums aériens étendus et possèdent des caractéristiques morphologiques complexes avec un développement multicellulaire complexe commençant par la germination d'hyphes à partir de spores et se terminant par la formation de septa avec une chaîne de spores non nucléées (Figure 9) (Chater, 2016).

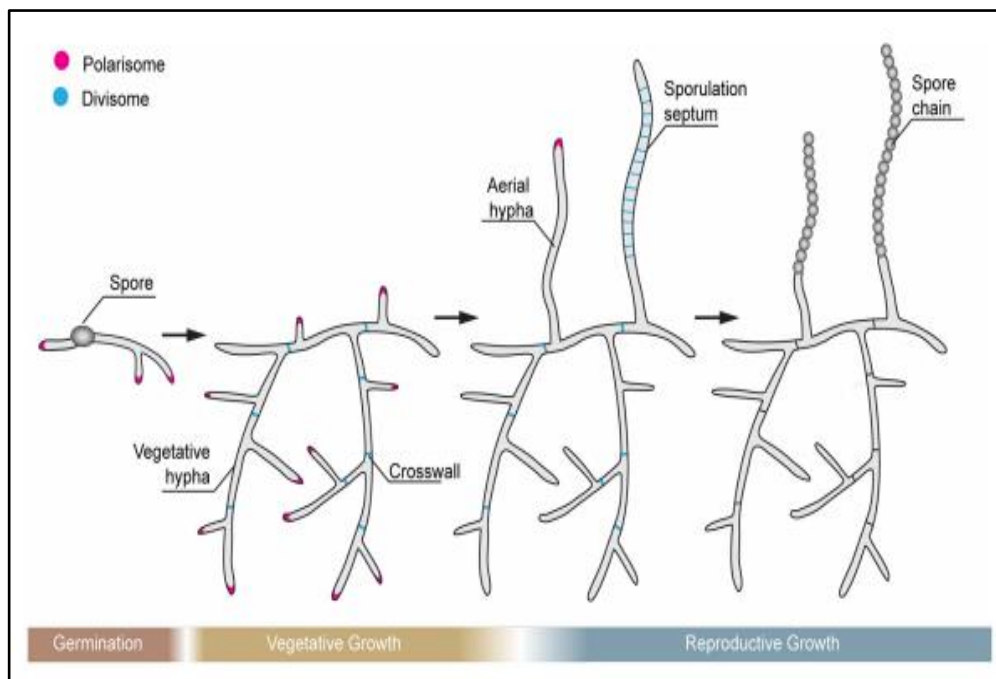


Figure 9. Cycle de développement des *Streptomyces* (Schlimpert et Elliot, 2023).

Elles possèdent plusieurs groupes des gènes biosynthétiques (BGC) sur chaque génome, qui sont la source des nombreux composés bioactifs à usage médical ou agricole (Nicault *et al.*, 2021). En outre, la diversité de leur métabolisme leur a permis de coloniser différents habitats et d'utiliser des sources de carbone et d'azote variées. Bien que son pH optimal de croissance se situe entre 6,5 et 8, d'autres souches de ce genre capables de croître dans des milieux au pH de 9 ou plus. Sa présence dans le sol est favorisée par sa croissance mycélienne et sa capacité à former des spores, ce qui constitue un système de dispersion et une forme de résistance qui favorise la survie pendant des longues périodes de pénurie d'eau et de nutriments (Pacios-Michelena *et al.*, 2021).

1.2. Produits naturels issus des *Streptomyces*

Les espèces de *Streptomyces* ont été considérées comme un réservoir d'une gamme variée des produits naturels en raison de leur métabolisme secondaire puissant et complexe. Elles produisent environ 100 000 antibiotiques, qui représentent 70 à 80 % de tous les produits bioactifs naturels ayant des applications pharmacologiques ou agrochimiques (Abdel-Razek *et al.*, 2020).

Les *Streptomyces* produisent une variété des produits naturels d'une grande diversité structurale, notamment des macrolides, des tétracyclines, des aminoglycosides, des glycopeptides, des ansamycines et des terpènes (Alam *et al.*, 2022).

Les produits naturels bioactifs dérivés de ce genre sont des agents antimicrobiens, antiviraux, cytotoxiques, antitumoraux, antihypertenseurs, immunosuppresseurs, insecticides, antioxydants, promoteurs de la croissance des plantes et herbicides (Sharma *et al.*, 2021).

Les métabolites découverts peuvent donc être classés en quatre catégories : (i) les composés ayant des activités régulatrices, notamment les agents morphogènes, les sidérophores et les facteurs de croissance ; (ii) les anti-protazoaires, les antibactériens, les antifongiques et les antiviraux en tant qu'agents antagonistes ; (iii) les insecticides, les pesticides et les herbicides en tant qu'agents agrobiologiques ; et (iv) les agents neurologiques, les immunomodulateurs, les agents antitumoraux, les enzymes et les inhibiteurs d'enzymes en tant que médicaments pharmacologiques (Alam *et al.*, 2022).

Les *Streptomyces* produisent ces composés sous forme des métabolites secondaires pendant la phase stationnaire, qui ne sont pas nécessaires à leur développement ou à leur multiplication, mais qui peuvent apporter un avantage concurrentiel aux organismes.

Certains de ces métabolites aident les cellules bactériennes reproductrices en confisquant des métaux comme le fer (sidérophores), en les protégeant de la lumière UV (via la pigmentation), en limitant la concurrence (antibiotiques), en leur permettant de communiquer avec d'autres espèces et en régulant les voies de biosynthèse (Wang *et al.*, 2019). De plus, elles jouent un rôle essentiel dans la biodégradation des sols et dans la formation de l'humus et produisent des nombreuses substances volatiles, comme la géosmine, responsable de la caractéristique "odeur de terre mouillée" (Alam *et al.*, 2022).

1.3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques

La composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires (Yu *et al.*, 2008). Alternativement, une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir de la souche sélectionnée peut être réalisée à travers des études des conditions physico-chimiques de la culture, ainsi que la composition du milieu de croissance et de production. Ces deux dernières caractéristiques montrent la relation étroite entre la production d'antibiotiques et les conditions de culture du microorganisme producteur.

Généralement, la production n'est déclenchée qu'après épuisement de l'une des trois sources principales de nutriments (source de carbone, source d'azote et phosphore). Ceci peut être expliqué par l'importance de la croissance cellulaire et sa priorité sur la production de métabolites secondaires. En effet, les systèmes de défense et de survie sont désactivés jusqu'à épuisement de ces nutriments (Smaoui, 2010). En fait, les travaux ont montré que la nature des sources de carbone, d'azote, de phosphore, et de trace d'éléments minéraux (essentiellement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}) affectent fortement la production de la molécule antimicrobienne. Ainsi, la production d'antibiotiques est généralement inhibée ou diminuée quand certains substrats comme le glucose, le glycérol, les sels d'ammonium, les acides aminés et le phosphate inorganique nécessaires à la croissance microbienne sont présents à des taux dépassant certains seuils (Smaoui, 2010).

Le choix des facteurs opérationnels comme le pH et la température, sont d'une importance capitale pour la production d'antibiotiques. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture. Concernant la température l'optimum de production est obtenu à 30°C qui correspond à la température optimale de croissance (Sujatha *et al.*, 2005).

Deuxième partie. Matériel et
méthodes

Chapitre 1.

Étude phytochimique et évaluation
des activités biologiques de la plante
Peganum harmala L.

1. Matériel végétal

Les graines de *Peganum harmala* L. ont été récoltées en Juillet 2019 pendant la période de maturation, au niveau de la région de Sidi Fredj de la wilaya de Souk Ahras, localisée au Nord-Est de l'Algérie, à une Latitude de: 36° 0'58.94" Nord, Longitude de: 8°13'54.03" Est et une altitude égale à 544 m, qui se caractérise par un climat semi-aride (**Figure 10**).

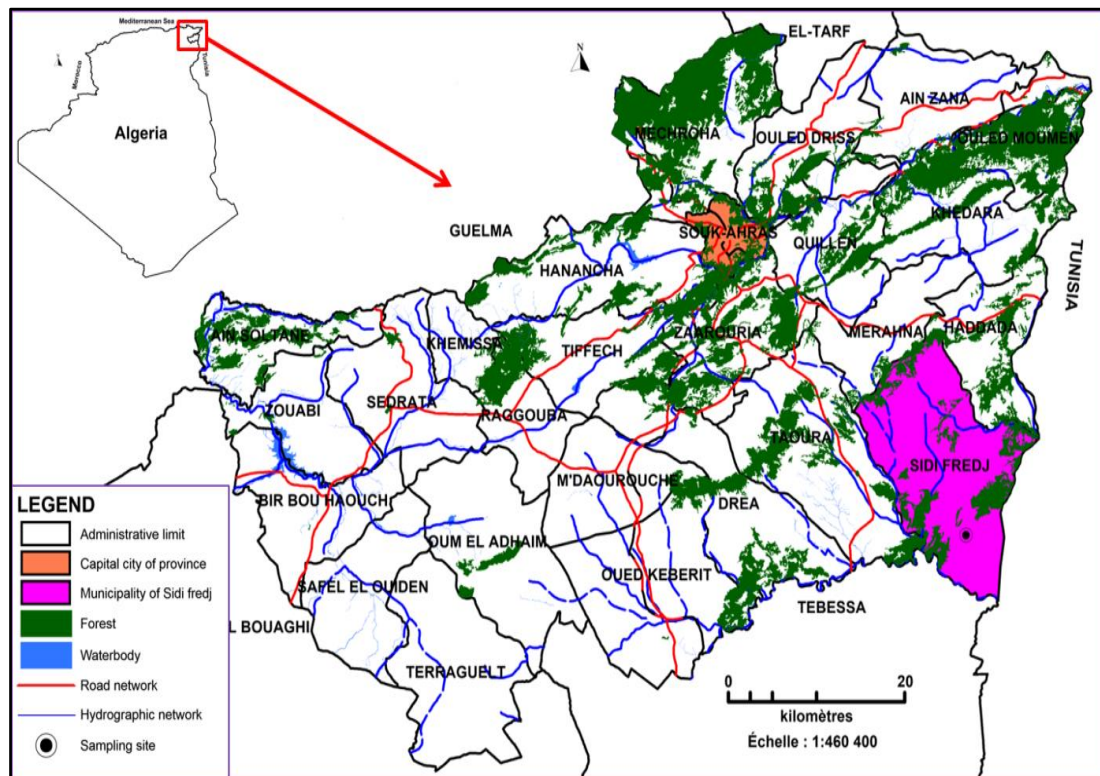


Figure 10. Situation géographique de la zone d'étude (Carte établie à l'aide du logiciel Mapinfo Pro, Version 12.0.2)

Le matériel végétal recueilli est ensuite nettoyé, séché à l'ombre et à l'air libre pendant 15 jours, puis transformé en fine poudre à l'aide d'un broyeur électrique. La poudre ainsi obtenue est stockée dans des flacons en verre ambrés jusqu'à son utilisation (**Figure 11**).



Figure 11. *Peganum harmala* L. en période de floraison (Photo personnelle, 2019).

2. Analyse qualitative (Screening phytochimique)

L'investigation phytochimique est basée sur des réactions de coloration ou de précipitation plus ou moins spécifiques à chaque classe de principes actifs. Elle a été effectuée soit sur la poudre de la plante, soit sur son infusé à 10 %. Les méthodes de caractérisation utilisées dérivent de celles décrites par : **Solfo, (1973) ; Paris, (1976) et Harborne, (1989).**

Les résultats sont exprimés selon le type de réaction :

- Très positive : +++
- Moyennement positive : ++
- Positive : +
- Négative : –

🚩 Préparation de l'infusé à 10 %

L'infusé à 10 % est préparé par l'ajout de 10 g de poudre végétale à 100 ml d'eau bouillante, après 15 minutes de contact, l'infusé est filtré.

2.1. Tanins

Nous avons pris 5 ml de l'infusé, en ajoutant goutte à goutte 1 ml d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1 %. L'apparition d'une coloration bleue noirâtre indique la présence des tanins galliques et la coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques.

2.2. Anthocyanes

Quelques gouttes d'HCl pur sont ajoutées à l'infusé. Ensuite, nous avons mis quelques gouttes de NH_4OH , le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

2.3. Leuco-anthocyanes

5 ml de l'infusé est mélangée avec 4 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol/HCl pur 3v/v). Après un chauffage au bain-marie à 50 °C, pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco-anthocyanes.

2.4. Saponosides

Dans un tube à essai, on met 10 ml de l'infusé. Le tube est agité pendant 15 secondes et laisser reposer 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence des saponosides.

2.5. Alcaloïdes

Une quantité de 5 g de la poudre est mélangée avec 50 ml d'HCl à 1 % dans un récipient. Après une macération, nous avons filtré le mélange et additionné au filtrat quelques gouttes de réactif de Dragendorff. L'apparition d'un précipité orangé indique la présence des alcaloïdes.

2.6. Flavonoïdes

10 g de poudre sont macérés dans 150 ml d'HCl à 1 % pendant 24 h. Ensuite, 10 ml du filtrat sont mélangés avec du NH_4OH et mis au repos 3 heures. L'apparition d'une couleur jaune claire dans la partie supérieure du tube indique la présence des flavonoïdes.

2.7. Triterpènes

On utilise le test de Liebermann Buchard. Dans un tube à essai, une quantité de poudre a été solubilisée dans 5 ml de chloroforme. À cette solution, sont ajoutés 2 ml d'anhydride acétique et 1 ml de H₂SO₄ concentré. L'apparition d'une coloration bleu verdâtre indique la présence de triterpènes.

2.8. Coumarines

Faire bouillir 2 g de poudre dans 20 ml d'alcool éthylique pendant 15 minutes, puis on rajoute au filtrat 10 gouttes de la solution alcoolique de KOH à 10 %. La formation d'un trouble indique la présence des coumarines.

2.9. Quinones

2 g de poudre sont humectés par 2 ml HCl (1 N) additionnés de 20 ml de chloroforme. On laisse incuber pendant 3 heures. On filtre le mélange et on ajoute 5 ml d'ammoniaque (1/2). La coloration rouge indique la présence des quinones libres.

2.10. Glucosides

À 2 g de poudre, on rajoute quelques gouttes de H₂SO₄. La formation d'une coloration rouge brique ensuite violette indique la présence des glucosides.

3. Préparation des extraits

Une quantité de 100 g de la poudre végétale des graines de *Peganum harmala* L. a été macérée dans une solution hydro-méthanolique (80 %) pendant 72 heures, 3 fois à température ambiante. La solution a ensuite été filtrée et évaporée sous pression dans un évaporateur rotatif (BUCHI, R-215) à 40 °C pour obtenir l'extrait brut. Une partie du résidu obtenu a été reprise dans l'eau distillée puis subit une extraction liquide-liquide par un ensemble des solvants organiques de polarité croissante : chloroforme, acétate d'éthyle et n-butanol. Les phases organiques ont été évaporées à sec sous pression réduite. L'extrait méthanolique ainsi que les différentes fractions obtenues sont conservés à 4 °C jusqu'à l'utilisation (**Figure 12**).

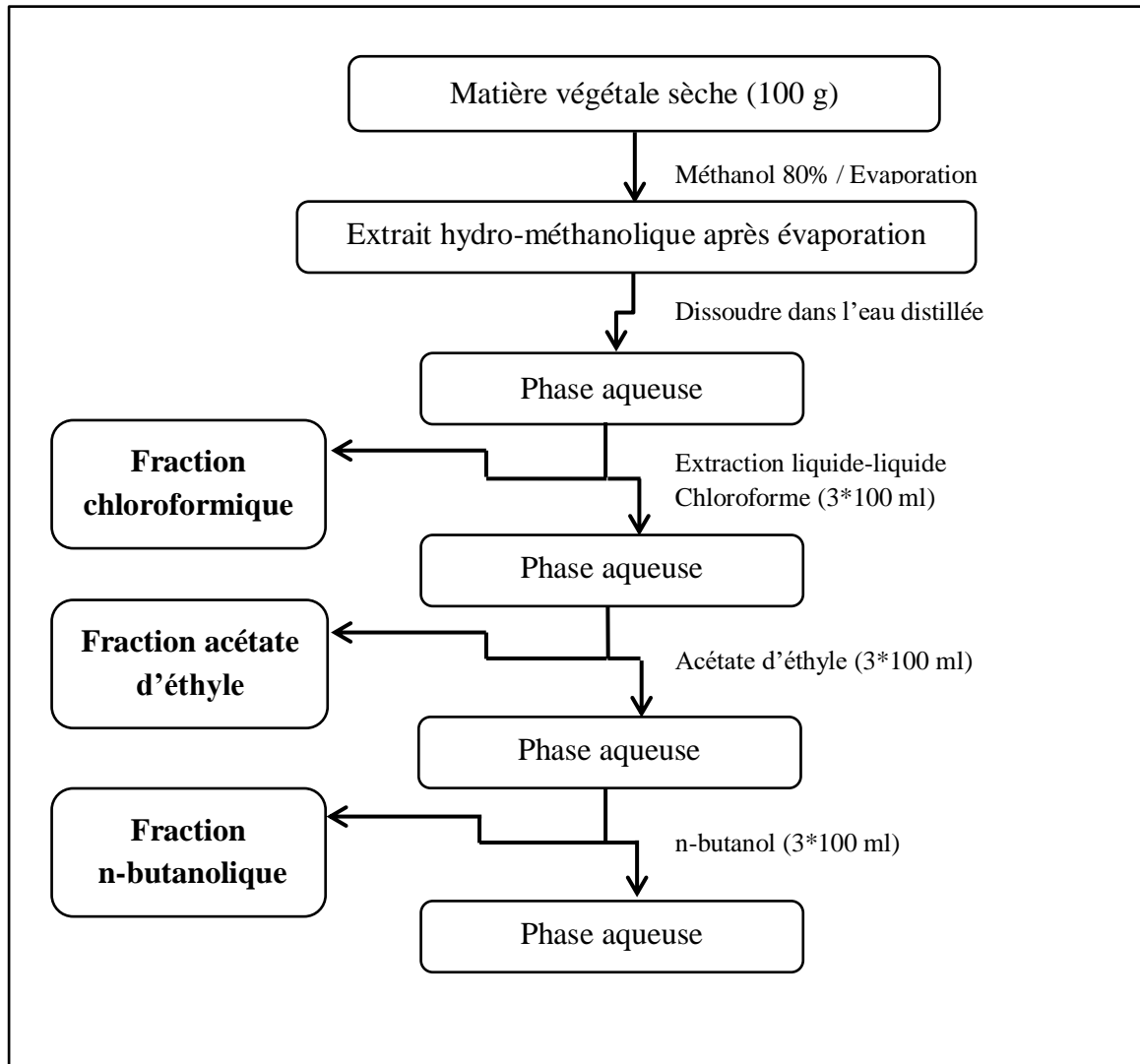


Figure 12. Protocole d'extraction de la plante *Peganum harmala* L. (Schéma personnel).

3.1. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est calculé par l'équation suivante:

$$\text{Rendement \%} = M_0/M_1 \times 100$$

- ✓ M_0 : Masse en gramme de l'extrait sec résultant
- ✓ M_1 : Masse en gramme du matériel végétal

4. Analyse quantitative des composés phénoliques

4.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux a été déterminée en utilisant le réactif de Folin-Ciocalteu selon la méthode des microplaques décrite par **Müller *et al.*, (2010)**. En bref, 100 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu (1:10) et 75 μ l de carbonate de sodium (7,5 %) ont été ajoutés à 20 μ l de chaque extrait (1 mg/ml). La microplaque a été incubée 2 heures à température ambiante dans l'obscurité, et l'absorbance a été enregistrée dans le lecteur des microplaques (Multimode Plate Reader, EnSpire) à 765 nm. L'acide gallique (25-200 μ g/ml) a été utilisé pour établir la courbe d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en μ g d'équivalents acide gallique (5-200 μ g/ml) par mg d'extrait (μ g EAG/mg).

4.2. Dosage des Flavonoïdes totaux

La teneur en flavonoïdes totaux a été déterminée en utilisant la méthode des microplaques décrite par **Topçu *et al.*, (2007)**. En bref, 130 μ l de méthanol ont été ajoutés à 50 μ l de chaque extrait (1 mg/ml) suivi par l'addition de 10 μ l d'acétate de potassium et 10 μ l de nitrate d'aluminium. Après 40 minutes d'incubation à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 415 nm. La quercétine (20-70 μ g/ml) a été utilisée pour établir la courbe d'étalonnage. Les résultats ont été exprimés en μ g d'équivalents quercétine par mg d'extrait (μ g EQ/mg).

5. Évaluation *in vitro* des activités biologiques

Pour évaluer le pouvoir antioxydant des différents extraits obtenus à partir des graines de *Peganum harmala* L., plusieurs tests ont été utilisés à savoir, le piégeage du radical libre DPPH, le piégeage de l'ABTS, la réduction du radical galvinoxyl, la méthode CUPRAC, la réduction de fer, le test de phénanthroline, le test de blanchissement de β -carotène et la chélation des ions ferreux.

5.1. Activités antioxydantes

5.1.1. Test du piégeage du radical DPPH

La méthode de **Blois, (1958)** a été utilisée pour l'étude de la capacité de l'extrait méthanolique et ses fractions à inhiber le radical DPPH, par le suivi au spectromètre à 517 nm, de sa décoloration du violet (forme radicalaire) au jaune (forme réduite). La solution de

DPPH a été préparée à 1 mM dans le méthanol. La réaction entre les extraits et le radical DPPH a été effectuée sur microplaque de 96 puits en mélangeant 160 µl de la solution DPPH et 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations. La lecture de l'absorbance a été réalisée à 517 nm après 30 minutes d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, contre un contrôle contenant la solution de DPPH et le méthanol. Le BHA, BHT et α -tocophérol (12,5-800 µg/ml) ont été utilisés comme standards.

Les résultats ont été exprimés en termes de pourcentages déterminés par la formule suivante :

$$\%I = (A_c - A_e) / A_c * 100 \quad (1)$$

%I = Pourcentage d'inhibition.

A_e : Absorbance en présence de l'échantillon (extrait ou standard).

A_c : Absorbance du contrôle en absence de l'échantillon.

5.1.2. Test du piégeage du radical ABTS

L'activité anti-radicalaire du radical ABTS a été déterminée selon la méthode de **Re et al., (1999)**. Le cation $ABTS^{+}$ est généré en mélangeant 5ml d'une solution aqueuse d'ABTS (14 mM) avec 5 ml de persulfate de potassium ($K_2S_2O_8$) à 4,9 mM. Le mélange a été ensuite stocké à l'abri de la lumière à température ambiante durant 16 heures. La solution a été diluée avec de l'éthanol jusqu'à une absorbance de $0,7 \pm 0,02$ à 734 nm.

Un volume de 40 µl de chaque extrait ainsi que les standards (BHA et BHT), à différentes concentrations (0,78125-50 µg/ml), ont été mis en contact avec 160 µl de la solution d' $ABTS^{+}$ diluée dans une microplaque à 96 puits. La lecture a été effectuée à 734 nm, après un temps de 10 minutes. Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés en appliquant la formule (1) précédente où A_c représente l'absorbance de la solution $ABTS^{+}$ en absence de l'échantillon.

5.1.3. Test du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

L'activité de piégeage du radical galvinoxyl a été déterminée selon la méthode décrite par **Shi et al., (2001)** dans des microplaques de 96 puits. 40 µl de chaque extrait à différentes concentrations ont été placés dans les puits de la microplaque. 160 µl de solution de galvinoxyl dans le méthanol (4 mg de galvinoxyl dans 100 ml de méthanol) ont été ajoutés à chaque puits. La plaque a été ensuite incubée à l'obscurité pendant 2 heures et l'absorbance a été mesurée à 428 nm. Le BHA et le BHT (12,5-800 µg/ml) ont été utilisés comme standards.

Les pourcentages d'inhibitions ont été calculés en appliquant la formule (1) précédente où A_c représente l'absorbance de la solution glavinoxyl en absence de l'échantillon.

5.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

Le test CUPRAC a été déterminé selon la méthode décrite par **Apak *et al.*, (2004)**. Le protocole consiste à faire réagir 40 μ l d'échantillon à différentes concentrations, avec 60 μ l d'acétate d'ammonium (1 M), 50 μ l de néocuproïne ($7,5 \cdot 10^{-3}$ M dans l'éthanol) et 50 μ l de CuCl_2 (0,01 M) dans une microplaque de 96 puits. Après une heure d'incubation, la lecture a été faite à température ambiante à 450 nm. Les résultats ont été exprimés en termes d'absorbances à 450 nm. Le BHA et le BHT (12,5-800 μ g/ml) ont été utilisés comme standards.

5.1.5. Test du pouvoir réducteur

Le pouvoir réducteur a été déterminé selon la méthode décrite par **Oyaizu, (1986)** avec certaines modifications. Le test a été réalisé sur une microplaque de 96 puits en mélangeant 20 μ l d'extrait, 40 μ l de tampon phosphate (0,2 M, pH 6.6), et 40 μ l de ferricyanure de potassium $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 %). Le mélange a été ensuite incubé à 50 °C pendant 20 minutes. Après cela, 40 μ l d'acide trichloracétique (TCA) (10 %), 40 μ l d'eau distillée, et 20 μ l de chlorure de fer (FeCl_3) (0.1 %) ont été ajoutés et la lecture a été faite immédiatement à 700 nm. Les résultats ont été représentés sous forme d'absorbances en fonction de la concentration. L' α -Tocophérol et l'acide ascorbique (3,125-200 μ g/ml) ont été utilisés comme standards.

5.1.6. Test du piégeage du radical phénanthroline

L'activité de phénanthroline a été déterminée selon la méthode de **Szydlowska-Czerniaka *et al.*, (2008)**. Le mélange réactionnel contient 10 μ l d'extrait à différentes concentrations, 50 μ l FeCl_3 , 30 μ l de phénanthroline et 110 μ l de méthanol qui ont été incubés dans l'obscurité pendant 20 minutes à 30 °C et l'absorbance a été mesurée à 510 nm. Les résultats ont été représentés sous forme d'absorbances en fonction de la concentration. Le BHA et le BHT (3,125-200 μ g/ml) ont été utilisés comme standards.

5.1.7. Test de blanchiment du β -carotène

La méthode décrite par **Marco, (1968)** a été utilisée pour l'évaluation de la capacité d'extrait/fractions à inhiber la peroxydation lipidique. L'émulsion β -carotène-acide linoléique

a été préparée par la dissolution de 0,5 mg de β -carotène dans 1ml de chloroforme puis 25 μ l d'acide linoléique et 200 μ l de tween 40 ont été ajoutés. Le chloroforme a été complètement éliminé dans un évaporateur rotatif, et le résidu a été repris dans 100 ml de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans une microplaque de 96 puits 40 μ l de chaque extrait à différentes concentrations ont été additionnés de 160 μ l de l'émulsion β -carotène-acide linoléique. L'absorbance à 470 nm a été mesurée immédiatement (T_0) puis la plaque a été incubée à 45 °C dans une étuve et la lecture a été faite pendant 120 minutes toutes les 30 minutes. Le BHA et le BHT (12,5-800 μ g/ml) ont été utilisés comme standards. Les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante :

$$AA (\%) = [1 - ((A_{(t=0)} - A_{(t=120)}) / (A_{0(t=0)} - A_{0(t=120)}))] * 100$$

$A_{(t=0)}$: Absorbance en présence de l'échantillon à T=0.

$A_{(t=120)}$: Absorbance en présence de l'échantillon à T=120 min.

$A_{0(t=0)}$: Absorbance du blanc à T=0.

$A_{0(t=120)}$: Absorbance du blanc à T=120 mn.

5.1.8. Test de chélation des ions ferreux

La capacité de chélation du fer a été évaluée par la méthode de **Dinis *et al.*, (1994)**. Dans une microplaque à 96 puits, 40 μ l MeOH, 40 μ l Fe^{2+} (0,2 mM) et 80 μ l ferrozine ont été ajoutés à une quantité de 40 μ l de l'extrait à différentes concentrations dans chaque puits. Après 10 minutes, l'absorbance a été mesurée à 562 nm. L'acide acétique éthylènediamine (EDTA) (12,5-800 μ g/ml) a été utilisé comme standard.

5.2. Activité anti-cholinestérase

L'activité inhibitrice d'acétylcholinestérase (AChE) et butyrylcholinestérase (BChE) a été déterminée par la méthode de **Ellman *et al.*, (1961)** avec des légères modifications. Le test consiste à mélanger dans une microplaque à 96 puits 10 μ l d'extrait ou de la galantamine (3,125-200 μ g/ml) préparés dans le méthanol à différentes concentrations avec 150 μ l de tampon phosphate (100 mM, pH 8.0) et 20 μ l de la solution AChE ($5.32 \cdot 10^{-3}$ U) ou BChE ($6.85 \cdot 10^{-3}$ U). Le mélange a été ensuite incubé à 25 °C pendant 15 minutes puis 10 μ l de la solution DTNB (0.5 mM) et 10 μ l d'acétylthiocholine iodide (0.71 mM) ou butyrylthiocholine chloride (0.2 mM) ont été ajoutés.

La lecture a été effectuée à 412 nm toutes les 5 minutes et ce pendant 20 minutes depuis t=0 (première lecture). Les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante :

$$I(\%) = (E - S)/E * 100$$

E : Activité maximale de l'enzyme sans inhibiteur.

S : Activité de l'enzyme en présence de l'extrait ou de la galantamine (inhibiteurs).

6. Analyse statistique

Les données ont été enregistrées sous forme de moyenne \pm écart type ($m \pm SD$) obtenues à partir des trois essais. Les valeurs CI_{50} et $A_{0.5}$ ont été calculées par analyse de la droite de régression. Les comparaisons multiples et la détermination des taux de signification ont été effectuées par l'analyse de la variance ANOVA suivie du test Tukey en utilisant le logiciel GraphPad prism version 9 et les valeurs ont été considérées comme statistiquement significatives à $p < 0,05$.

Chapitre 2.

Étude de l'effet de la plante
Peganum harmala L. sur la
croissance et la production de
métabolites secondaires de la souche
Streptomyces ayarii sp. S115

1. Revivification de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

La souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 utilisée dans cette étude est une nouvelle espèce découverte par Dr. AYARI Adel, et qui a été aimablement fournie par lui-même. La souche a été isolée à partir des sédiments prélevés du lac d'Oubeira, dans la région d'El-Kala (Nord-Est de l'Algérie), sur milieu gélosé caséine-amidon (**Annexe 1**), en utilisant la méthode de dilution décrite par **Shirling et Gottlieb, (1966)**. La culture a été conservée sur gélose inclinée ISP2 (**Annexe 1**) à -20 °C.

2. Préparation du milieu ISP2 modifié

La poudre végétale de *Peganum harmala* L. a été mise en suspension dans de l'eau distillée stérile, puis stérilisée par filtration sur membrane en nylon avec des pores de 0,22 µm. Le filtrat a été ajouté au milieu gélosé ISP2 préalablement stérile. Cette préparation a été réalisée suivant un protocole établie par Dr. AYARI Adel.

3. Culture et extraction de molécules bioactives de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

Streptomyces ayarius sp. S115 a été cultivée dans deux Erlenmayer de 500 ml, l'un contenant 100 ml de bouillon ISP2 et l'autre ISP2 modifié. Les cultures ont été incubées à 28 °C pendant 3 jours en agitation permanente dans un incubateur agitateur (*Edmund Bühler, Allemagne*) à 250 tours/minutes puis centrifugées à 8.000 tours pendant 20 minutes afin d'éliminer le mycélium. Le surnageant a été partagé en 4 volumes égaux et chacun a été extrait avec le même volume de solvant organique : n-hexane, acide acétique, n-butanol et acétate d'éthyle. Les extraits organiques ont été évaporés sous vides en utilisant un évaporateur rotatif (*Buchi, Switzerland*) et Les résidus secs ont été récupérés dans 1 ml de méthanol (**Ayari et al., 2016**).

4. Activité antibactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

L'activité antibactérienne de la souche *Streptomyces ayarius* S115 a été testée en utilisant la méthode de diffusion en puits décrite par **Amin et al., (2017)**. Les micro-organismes testés, à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia* sp. ATCC 39006 et *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), ont été obtenus à partir de la collection de cultures de l'Équipe de Valorisation de Biomolécules Actives du Laboratoire des Écosystèmes Aquatiques et

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Terrestres de l'Université Mohamed Cherif Messaadia, Souk Ahras, Algérie. Ces souches ont été ensemencées sur un milieu gélosé Muller Hinton, et les puits ont été réalisés à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Un volume de 150 µl des extraits bruts a été déposé dans les puits et les boîtes ont été placées à 4 °C pendant 2 heures puis incubées à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, les zones d'inhibition claires ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.

5. Détermination de la biomasse bactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

L'évolution de la biomasse au cours du processus de fermentation dans les deux milieux a été estimée selon la méthode de **Pfefferle *et al.*, (2000)**. 2 ml de culture ont été centrifugés à 5000 tours/minutes pendant 15 minutes, les surnageants obtenus ont été éliminés et les culots cellulaires ont été lavés deux fois avec de l'eau distillée et séchés à température ambiante. Les poids secs ont été pesés sur une balance analytique (*Sartorius*), pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare. Les résultats ont été exprimés en gramme de matière sèche par litre de culture (**Bouali *et al.*, 2017**).

6. Cinétique de croissance et production de métabolites secondaires dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

La cinétique de croissance et la production de métabolites secondaires dans les deux milieux de culture, ainsi que l'évolution de l'activité antibactérienne contre les bactéries pathogènes, ont été suivies quotidiennement pendant 7 jours.

6.1. Effet des sources de carbone et d'azote

Afin de tester l'influence de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la production de la souche, 3 sources de carbone (maltose, sucrose et glycérol) ainsi que 2 sources d'azote (tryptone et nitrate de potassium) ont été utilisées pour remplacer la source de carbone et d'azote des milieux ISP2 et ISP2 modifié, et tous les autres composants ont été maintenus constants. Les sources de carbones et d'azote ont été stérilisées séparément par filtration sur membrane et ajoutées juste avant l'inoculation de plus, la biomasse de la souche et la production de métabolites secondaires ont été enregistrées respectivement.

Troisième partie. Résultats et
Discussion

Chapitre 1.

Étude phytochimique et évaluation
des activités biologiques de la plante
Peganum harmala L.

1. Analyse qualitative

Cette analyse permet de générer une première estimation des données préliminaires sur les composants de l'extrait, en détectant l'absence ou la présence d'un type de métabolite par des tests rapides basés sur des réactions physicochimiques produisant des changements de couleur, de précipitation ou de turbidité. Les résultats des tests de caractérisation phytochimique, réalisés sur les différents extraits, sont illustrés dans le **Tableau 1**.

Tableau 1. Résultats du criblage phytochimique des graines de *Peganum harmala* L.

Métabolites secondaires	Graines
Alcaloïdes	+++
Flavonoïdes	++
Tanins	-
Triterpènes	++
Coumarines	+++
Quinones	+++
Saponosides	++
Glucosides	+
Anthocyanes	-
Leuco-anthocyanes	-

+++ : Forte présence de substance ; ++ : moyenne présence de substance ; + : faible présence de substance ;
- : absence de substance.

Le criblage phytochimique de la plante *Peganum harmala* L. a montré la présence de divers métabolites (des alcaloïdes, des flavonoïdes, des triterpènes, des coumarines, des quinones, des saponosides et des glucosides) qui possèdent de multiples propriétés pharmacologiques et biologiques. Les résultats de l'analyse qualitative montrent également l'absence de trois principes actifs dont l'importance en phytothérapie est non négligeable notamment, les tanins, les anthocyanes et les leuco-anthocyanes.

Les familles chimiques détectées dans cette étude viennent de confirmer les travaux de plusieurs recherches phytochimiques réalisées sur la plante *Peganum harmala L.*, en effet les alcaloïdes, les flavonoïdes, les saponosides, les triterpènes, les quinones et les coumarines ont été isolés précédemment de cette espèce (**Behidj-Benyounes et al., 2014 ; Sassoui, 2016 ; Senhaji et al., 2022 ; Bekiri et al., 2023**).

D'autre part, des chercheurs ont publié que le criblage phytochimique de l'espèce *Peganum harmala L.* révèle la présence des tanins, des anthocyanes ainsi que d'autres composés tels que les hydrates de carbone, les protéines et les résines (**Reddy et al., 2017 ; Guergour et al., 2018 ; Shaheen et al., 2022 ; Fazeli-Dinan et al., 2023**).

2. Rendement d'extraction

Le rendement de chaque extrait par rapport au poids du broyat est représenté dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Différentes caractéristiques des extraits obtenus à partir de *Peganum harmala L.*

Extrait/Fraction	Couleurs	Aspects	Rendements (%)
Méthanol	Brune	Pate	27,13 %
Chloroforme	Bleue	Visqueux	0,38 %
Acétate d'éthyle	Jaune	Solide	0,16 %
n-Butanol	Brune	Solide	7,77 %

Le rendement d'extraction a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec sous forme de poudre et les résultats ont été exprimés en pourcentage. Le rendement le plus élevé a été observé avec l'extrait méthanolique (27,13%) suivi par la fraction n-butanolique (7,77%) et la fraction chloroformique (0,38%). Cependant, le plus faible rendement a été obtenu par la fraction acétate d'éthyle (0,16%). Cette différence observée peut être expliquée du fait que le choix de la méthode, le temps d'extraction, la température, la nature de solvant et le rapport solide/liquide affectent le rendement des extraits ainsi que leur composition chimique et par conséquent affecte leurs activités biologiques (**Beldi, 2021**).

La présente étude a montré que la polarité la plus élevée de solvants comme la combinaison d'eau et de méthanol a donnée un rendement élevé significatif, indiquant que

l'efficacité d'extraction favorise les solvants les plus polaires. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par **Edziri et al., (2010)** où le rendement de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Peganum harmala* L. est meilleur par rapport à d'autres extraits. Nos résultats sont également en accord avec l'étude de **Saeedeh et al., (2022)** qui ont décrit que le rendement maximum en extrait est obtenu à partir d'une extraction aqueuse au méthanol. De même, le rendement des parties aériennes de *Peganum harmala* L. est le plus élevé en méthanol, tandis que la fraction d'acétate d'éthyle représente le rendement le plus faible (**Benarous et al., 2015**). Cependant, nos résultats sont différents de ceux trouvés par d'autres recherches où l'extrait d'acétate d'éthyle des graines de *Peganum harmala* L. est meilleur par rapport aux extraits chloroformique et méthanolique (**Baghiani et al., 2012**).

3. Analyse quantitative

Afin de caractériser quantitativement les extraits préparés à partir de la plante étudiée, un dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes a été effectué. Le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés pharmacologiques et biologiques des plantes leur sont attribuées.

3.1. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes

Les résultats des teneurs totales en polyphénols et flavonoïdes des extraits de l'espèce *Peganum harmala* L. sont représentés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Teneurs en polyphénols et flavonoïdes totaux de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L.

Extrait/Fraction	Teneurs en polyphénols totaux ($\mu\text{g EAG/mg}$ extrait)	Teneurs en flavonoïdes totaux ($\mu\text{g EQ/mg}$ extrait)
Méthanol	$144,97 \pm 0,34^c$	$43,62 \pm 0,42^c$
Chloroforme	$111,25 \pm 1,89^d$	$22,36 \pm 0,07^d$
Acétate d'éthyle	$237,23 \pm 1,06^a$	$82,58 \pm 0,03^a$
n-Butanol	$197,23 \pm 0,29^b$	$57,98 \pm 0,70^b$

Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes (Test Tukey, $p < 0,0001$).

Les valeurs ont été calculées à partir des gammes d'étalonnages établies par l'acide gallique et la quercétine (**Annexe 2,3**) et elles sont exprimées en microgrammes d'équivalent de standards par milligramme d'extrait respectivement.

Les extraits ont montré des différences dans leurs teneurs totales en fonction des polarités des solvants utilisés pour les procédures d'extraction. L'analyse statistique a montré que l'extrait méthanolique et les fractions présentent une différence significative pour tous les dosages ($p < 0,05$). Les teneurs les plus élevées en polyphénols et flavonoïdes ont été observées dans la fraction acétate d'éthyle ($237,23 \pm 1,06 \mu\text{g EAG/ mg}$, $82,58 \pm 0,03 \mu\text{g EQ/mg}$), suivis par la fraction n-butanolique ($197,23 \pm 0,29 \mu\text{g EAG/ mg}$, $57,98 \pm 0,70 \mu\text{g EQ/mg}$) et l'extrait méthanolique ($144,97 \pm 0,34 \mu\text{g EAG/ mg}$, $43,62 \pm 0,42 \mu\text{g EQ/mg}$ respectivement) tandis que la fraction chloroformique a donné des teneurs les plus faibles ($111,25 \pm 1,89 \mu\text{g EAG/ mg}$, $22,36 \pm 0,07 \mu\text{g EQ/mg}$).

Nos résultats ont montré que la fraction acétate d'éthyle est la plus riche en composés phénoliques et flavonoïdes malgré leur faible rendement d'extraction. Ces résultats sont différents de ceux obtenus par **Edziri et al., (2010)** qui ont trouvé la plus grande quantité de composés phénoliques et de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique des parties aériennes, tandis que la plus faible quantité des deux phytoconstituants a été obtenue dans la fraction d'acétate d'éthyle.

Dans une autre étude portant sur les graines de *Peganum harmala L.*, les auteurs rapportent une teneur extrêmement élevée en polyphénols et en flavonoïdes de l'extrait méthanolique par rapport aux résultats actuels (**Ait Abderrahim et al., 2019**).

En effet, d'autres recherches réalisées par **Radjah et al., (2019)** ; **Abbas et al., (2021)** ; **Saeedeh et al., (2022)** ont montré des teneurs plus faibles en polyphénols et en flavonoïdes par rapport aux résultats obtenus dans la présente étude.

La teneur totale en phénols et flavonoïdes varie d'une plante à une autre et entre les espèces du même genre. Cela peut être attribué à plusieurs facteurs notamment les conditions génotypiques, environnementales et climatiques (**Al Naser, 2018**). La méthode d'extraction et la méthode de quantification peuvent également influencer l'estimation de la teneur des polyphénols et des flavonoïdes (**Apak et al., 2007**).

En au-delà, les solvants à polarité intermédiaire tels que l'acétate d'éthyle et le n-butanol, se sont révélés plus puissants pour extraire les composés phénoliques. Dans une étude, la fraction acétate d'éthyle a présenté la teneur la plus élevée en polyphénols et flavonoïdes. Les résultats ont été confirmés par la littérature dans laquelle l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant pour une extraction sélective des polyphénols (**Mouffouk *et al.*, 2018 ; Bouchoukh *et al.*, 2019**).

4. Résultats des activités biologiques

4.1. Activités antioxydantes

Les antioxydants provenant de sources extérieures peuvent réagir de plusieurs façons afin d'inhiber les phénomènes d'oxydation en utilisant principalement trois mécanismes d'action : soit par la neutralisation des radicaux libres ou par la réduction et la chélation des métaux. De ce fait plusieurs méthodes ont été développées pour l'évaluation du pouvoir antioxydant d'un extrait vue la variété de composés qu'il peut contenir et le mécanisme de leur action tout en prenant en considération les conditions (temps, température) de réalisation de chaque test (**Ksouri *et al.*, 2009**).

4.1.1. Test du piégeage du radical DPPH

L'activité anti-radicalaire des différents extraits de *Peganum harmala* L. ainsi que les standards a été évaluée comme décrit précédemment. Les résultats d'inhibition de chaque extrait vis-à-vis le radical DPPH sont illustrés dans la **Figure 13** et les valeurs de la concentration d'inhibition de 50 % (CI₅₀) des extraits sont représentées dans le **Tableau 4**.

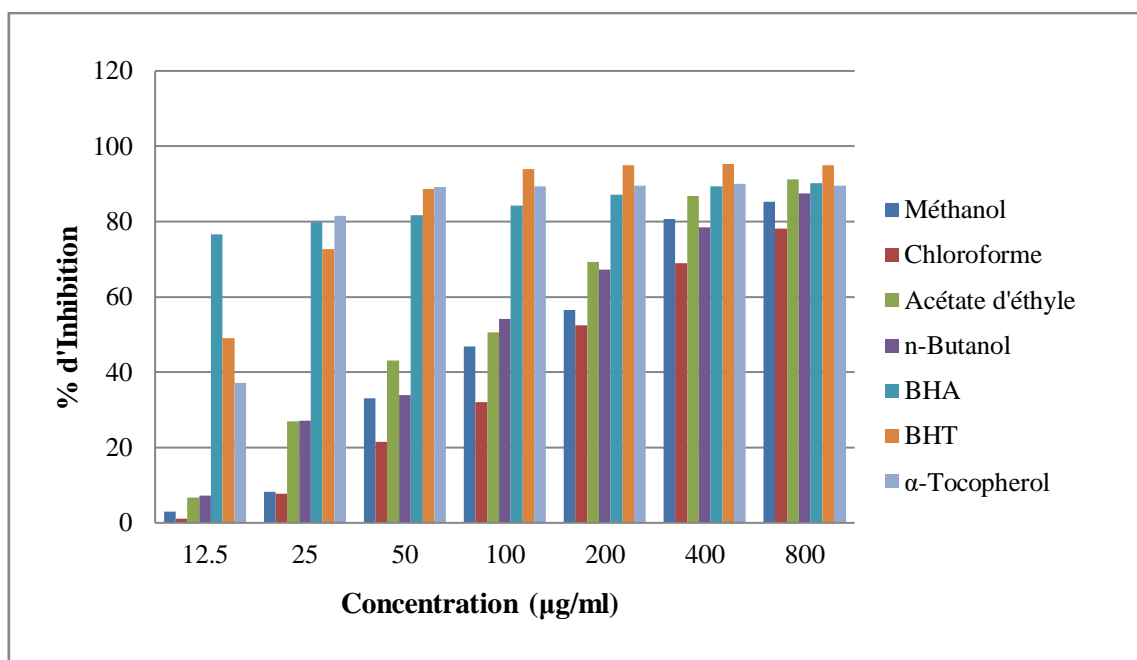


Figure 13. Pourcentages d'inhibitions du test DPPH pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 4. Valeurs de CI_{50} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test DPPH.

Extraits/Standards	$CI_{50}^{(1)}$ (µg/ml)
Méthanol	133,18 ± 1,22 ^e
Chloroforme	187,57 ± 0,87 ^f
Acétate d'éthyle	92,02 ± 1,30 ^c
n-Butanol	108,36 ± 0,83 ^d
BHA*	6,14 ± 0,41 ^a
BHT*	12,99 ± 0,41 ^b
α-Tocophérol*	13,02 ± 5,1 ^b

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composés de référence.

D'après ces résultats, on constate que le pourcentage d'inhibition du radical libre augmente avec l'augmentation de la concentration. La fraction acétate d'éthyle présente

l'activité la plus élevée contre le DPPH (CI_{50} : $92,02 \pm 1,30$ $\mu\text{g/ml}$), mais inférieure à celle des standards BHA, BHT et α -Tocophérol (CI_{50} : $6,14 \pm 0,41$, $12,99 \pm 0,41$ et $13,02 \pm 5,17$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement), suivis par la fraction n-butanolique et l'extrait méthanolique (CI_{50} : $108,36 \pm 0,83$ $\mu\text{g/ml}$, $133,18 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement). Tandis que la fraction chloroformique a montré l'effet antioxydant le plus faible (CI_{50} : $187,57 \pm 0,87$ $\mu\text{g/ml}$).

4.1.2. Test du piégeage du radical ABTS

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical ABTS est illustré dans la figure ci-dessous (**Figure 14**) et les valeurs des CI_{50} sont représentées dans le **Tableau 5**.

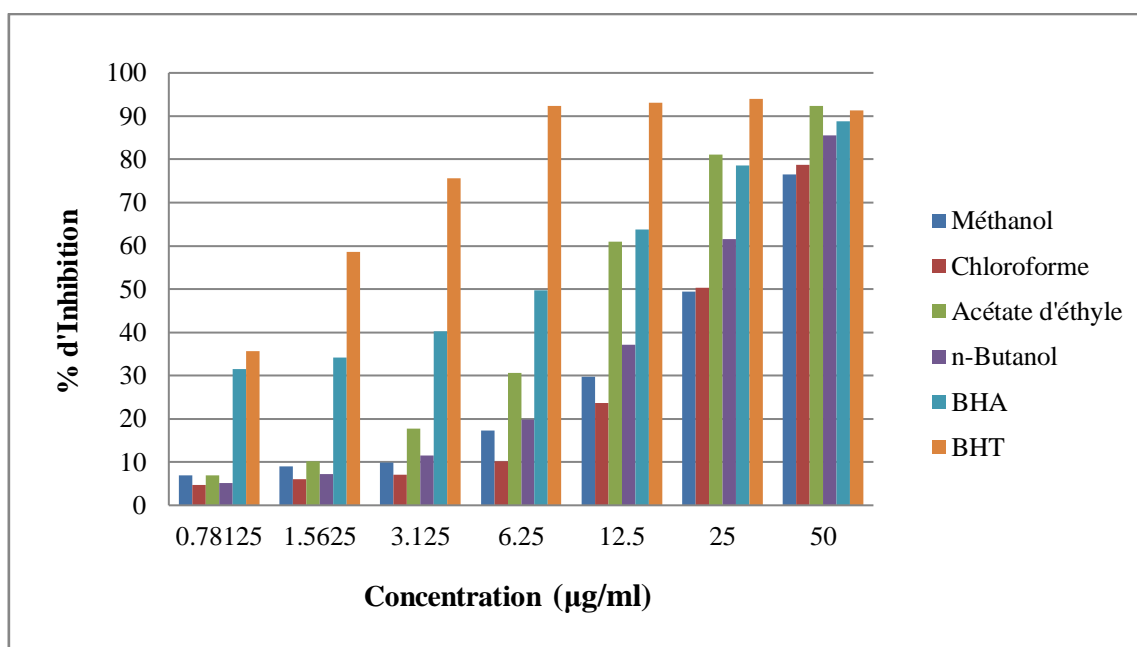


Figure 14. Pourcentages d'inhibitions du test ABTS pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 5. Valeurs de CI_{50} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test ABTS.

Extraits/Standards	$CI_{50}^{(1)}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Méthanol	$27,32 \pm 0,79^c$
Chloroforme	$35,02 \pm 0,57^f$
Acétate d'éthyle	$10,22 \pm 0,26^c$
n-Butanol	$19,91 \pm 0,96^d$
BHA*	$1,55 \pm 0,26^a$
BHT*	$7,54 \pm 0,67^b$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composés de référence.

D'après les résultats obtenus, on remarque que tous les extraits possèdent une activité antioxydante qui varie d'une manière dose dépendante. La fraction acétate d'éthyle possède la meilleure activité par rapport aux autres extrait/fractions avec une CI_{50} de ($10,22 \pm 0,26 \mu\text{g/ml}$), proche de celle des standards BHA et BHT (CI_{50} : $1,55 \pm 0,26$, $7,54 \pm 0,67 \mu\text{g/ml}$ respectivement), suivie par la fraction n-butanolique (CI_{50} : $19,91 \pm 0,96 \mu\text{g/ml}$), puis de l'extrait méthanolique (CI_{50} : $27,32 \pm 0,79 \mu\text{g/ml}$) et enfin de la fraction chloroformique (CI_{50} : $35,02 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$).

4.1.3. Test du piégeage du radical galvinoxyl (GOR)

Le profil d'activité anti-radicalaire de chaque extrait testé vis-à-vis du radical galvinoxyl est illustré dans la **Figure 15** et les valeurs des CI_{50} sont représentées dans le **Tableau 6**.

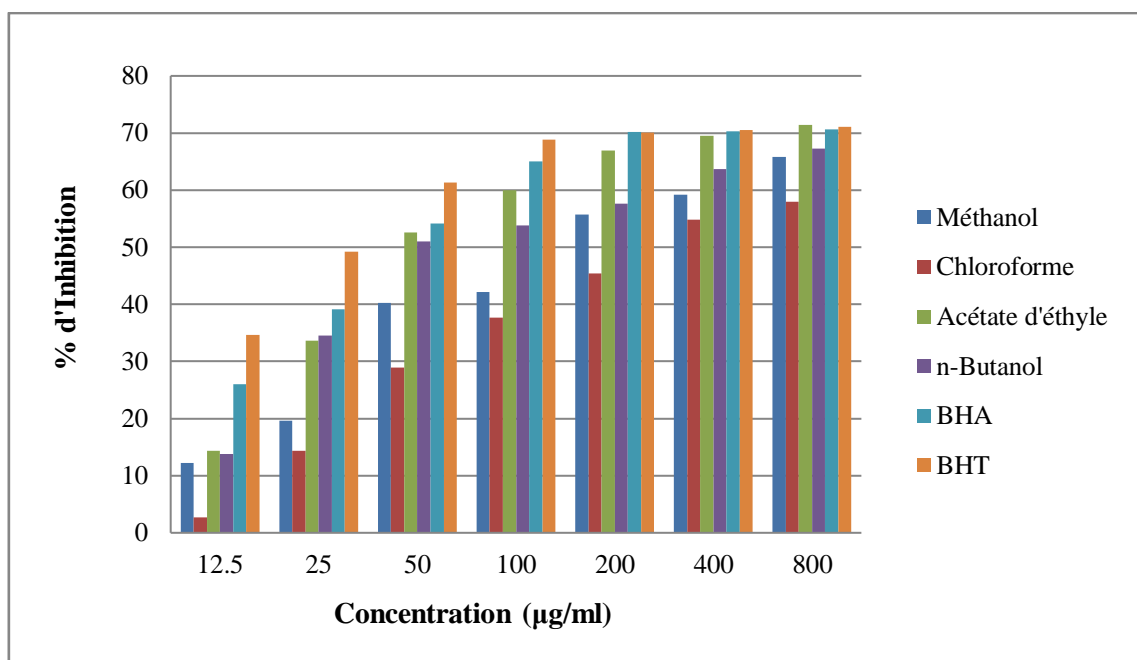


Figure 15. Pourcentages d'inhibitions du test galvinoxyl pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 6. Valeurs de CI_{50} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test GOR.

Extraits/Standards	$CI_{50}^{(1)}$ (µg/ml)
Méthanol	$153,40 \pm 0,55^d$
Chloroforme	$305,59 \pm 0,41^e$
Acétate d'éthyle	$45,93 \pm 0,75^c$
n-Butanol	$47,03 \pm 0,93^c$
BHA*	$3,32 \pm 0,18^a$
BHT*	$5,38 \pm 0,06^b$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composés de référence.

Les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique ont présenté une activité antioxydante importante sans différence significative (CI_{50} : $45,93 \pm 0,75$, $47,03 \pm 0,93$ µg/ml) et plus élevée par rapport aux autres fractions/extrait, mais elle reste inférieure à celle des standards BHA et BHT (CI_{50} : $3,32 \pm 0,18$, $5,38 \pm 0,06$ µg/ml), suivi par l'extrait méthanolique (CI_{50} :

153,40 ± 0,55 µg/ml). Tandis que la fraction chloroformique montrait la plus faible activité (CI₅₀: 305,59 ± 0,41 µg/ml).

4.1.4. Test de la capacité antioxydante par réduction du cuivre (CUPRAC)

La capacité des différents extraits issus de la plante *Peganum harmala* L. à réduire le cuivre a été testée et les valeurs des absorbances A_{0,5} ont été déterminées (**Figure 16 et Tableau 7**).

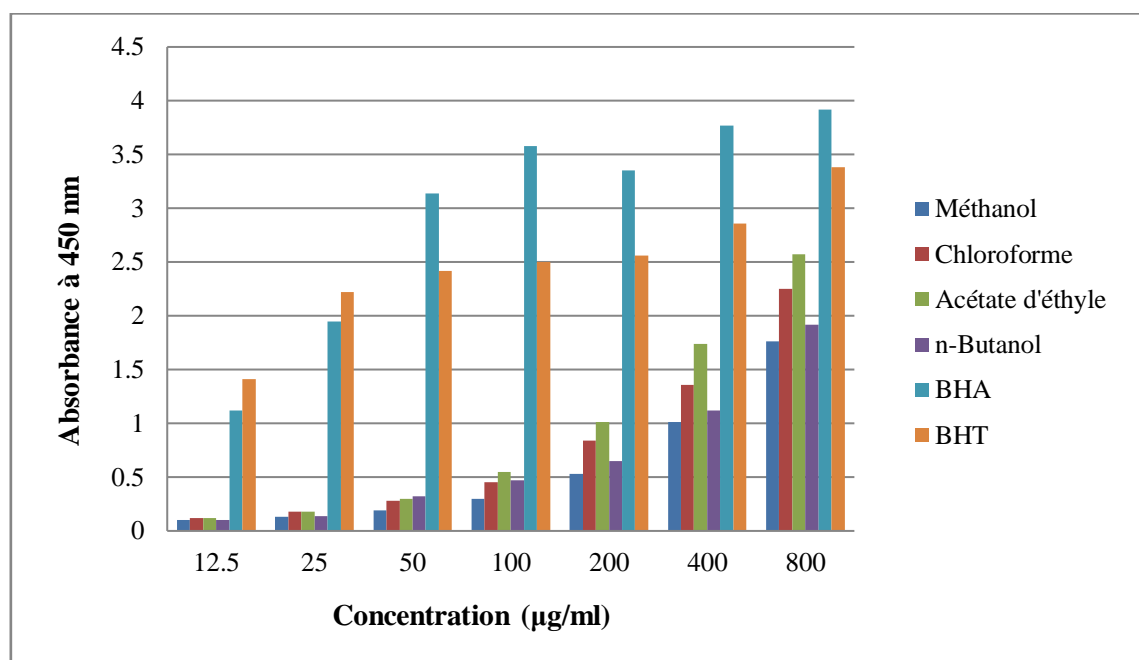


Figure 16. Réduction des ions Cu²⁺ par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 7. Valeurs de $A_{0,5}$ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test CUPRAC.

Extraits/Standards	$A_{0,5}^{(1)}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Méthanol	$187,39 \pm 0,58^c$
Chloroforme	$110,49 \pm 0,51^c$
Acétate d'éthyle	$90,57 \pm 0,84^b$
n-Butanol	$123,03 \pm 0,35^d$
BHA*	$5,35 \pm 0,71^a$
BHT*	$8,97 \pm 3,94^a$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composés de référence.

Parmi les extraits étudiés, la fraction acétate d'éthyle présente l'activité la plus élevée avec une valeur de $A_{0,5}$: $90,57 \pm 0,84 \mu\text{g/ml}$, suivie par la fraction chloroformique ($A_{0,5}$: $110,49 \pm 0,51 \mu\text{g/ml}$), puis la fraction n-butanolique ($A_{0,5}$: $123,03 \pm 0,35 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait méthanolique ($A_{0,5}$: $187,39 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$). En revanche, aucun des extraits n'exhibait une activité supérieure à celle des standards BHA et BHT ($A_{0,5}$: $5,35 \pm 0,71$, $8,97 \pm 3,94 \mu\text{g/ml}$).

4.1.5. Test du pouvoir réducteur

Les résultats de la capacité des différents extraits ainsi que les standards sont illustrés dans la **Figure 17** et les valeurs des absorbances $A_{0,5}$ sont mentionnés dans le **Tableau 8**.

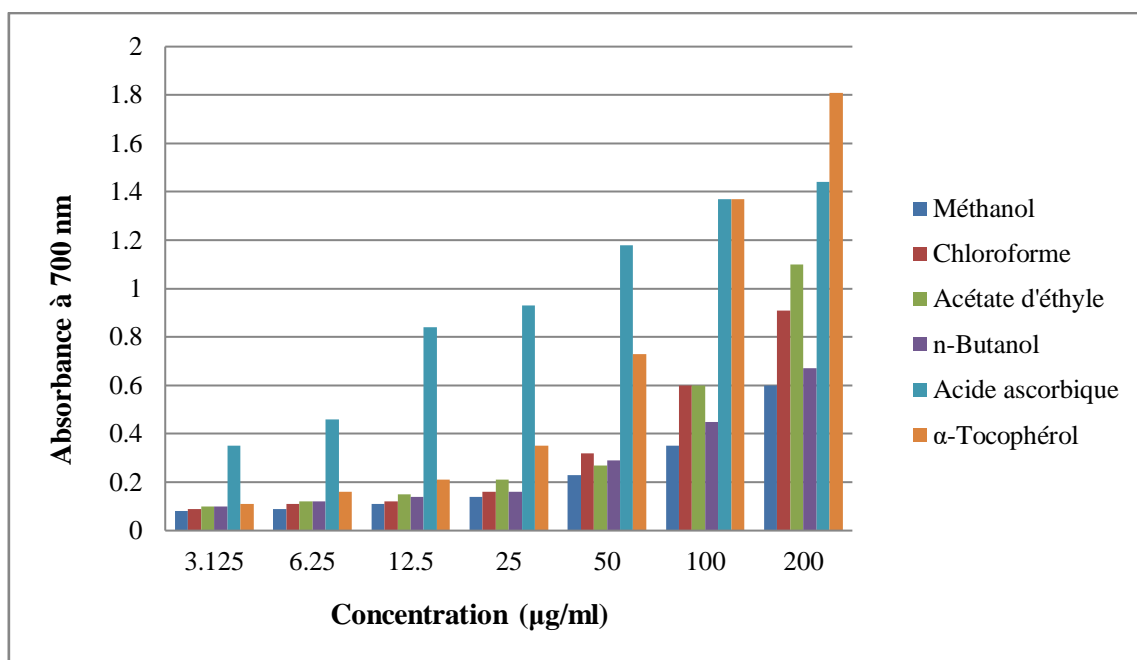


Figure 17. Capacité de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à réduire le fer (pouvoir réducteur) à différentes concentrations.

Tableau 8. Valeurs de $A_{0,5}$ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test FRAP.

Extraits/Standards	$A_{0,5}^{(1)}$ (µg/ml)
Méthanol	158,07 ± 0,12 ^c
Chloroforme	89,61 ± 0,90 ^c
Acétate d'éthyle	87,83 ± 0,56 ^c
n-Butanol	129,58 ± 0,62 ^d
α-Tocophérol*	34,93 ± 2,38 ^b
Acide ascorbique*	6,77 ± 1,15 ^a

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composés de référence.

Les fractions acétate d'éthyle et chloroformique ont présenté une activité antioxydante importante sans différence significative ($A_{0,5}$: 87,83 ± 0,56, 89,61 ± 0,90 µg/ml) et plus élevée par rapport aux autres fractions/extrait, mais elle reste inférieure à celle des standards α-Tocophérol et acide ascorbique ($A_{0,5}$: 34,93 ± 2,38, 6,77 ± 1,15 µg/ml), suivie par la

fraction n-butanolique ($A_{0,5}$: $129,58 \pm 0,62$ $\mu\text{g/ml}$). Tandis que l'extrait méthanolique montrait la plus faible activité ($A_{0,5}$: $158,07 \pm 0,12$ $\mu\text{g/ml}$).

4.1.6. Test du piégeage du radical phénanthroline

La **Figure 18** représente l'absorbance en fonction de la concentration et les valeurs des absorbances $A_{0,5}$ ont été déterminées (**Tableau 9**).

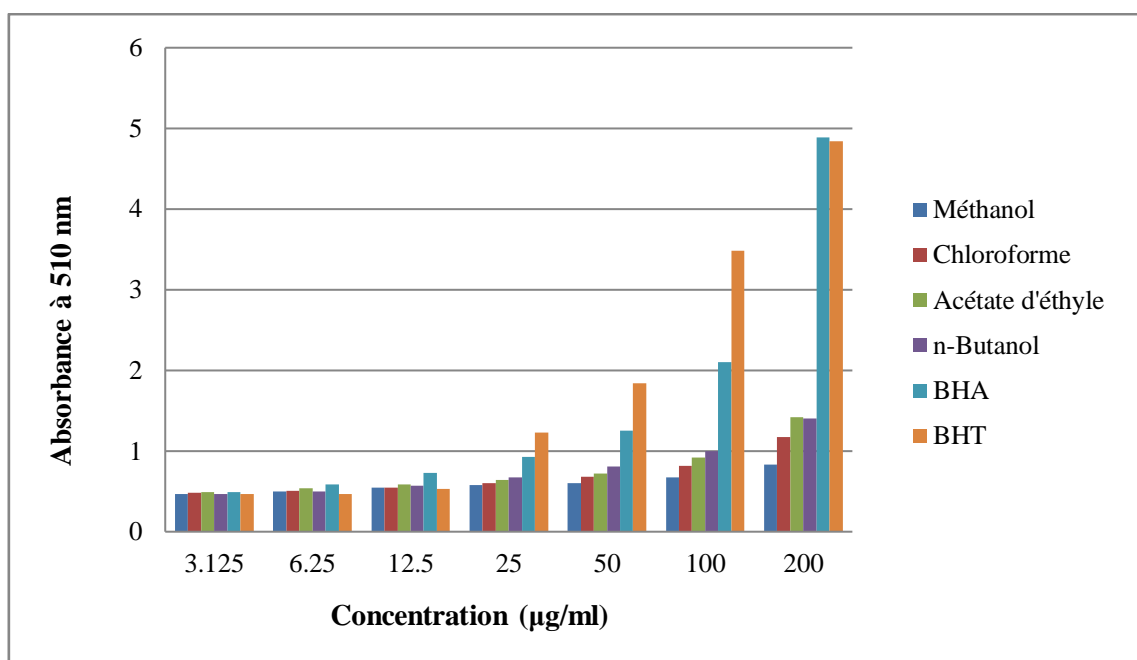


Figure 18. Test phénanthroline de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L.

Tableau 9. Valeurs de $A_{0,5}$ de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test phénanthroline.

Extraits/Standards	$A_{0,5}^{(1)}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Méthanol	$6,45 \pm 0,54^c$
Chloroforme	$5,73 \pm 0,95^c$
Acétate d'éthyle	$3,78 \pm 0,64^b$
n-Butanol	$5,95 \pm 0,82^c$
BHA*	$0,93 \pm 0,07^a$
BHT*	$2,24 \pm 0,17^{ab}$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). * Composés de référence.

Dans ce test, on constate que toutes les fractions (acétate d'éthyle, chloroformique et n-butanolique) ainsi que l'extrait méthanolique présentent des $A_{0,5}$ élevées ($3,78 \pm 0,64$, $5,73 \pm 0,95$, $5,95 \pm 0,82$, $6,45 \pm 0,54$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement) et très proches de celles des standards BHA et BHT ($A_{0,5}$: $0,93 \pm 0,07$, $2,24 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$).

4.1.7. Test de blanchiment du β -carotène

L'activité antioxydante des extraits a été comparée aux standards et les résultats sont résumés dans la **Figure 19** et le **Tableau 10**.

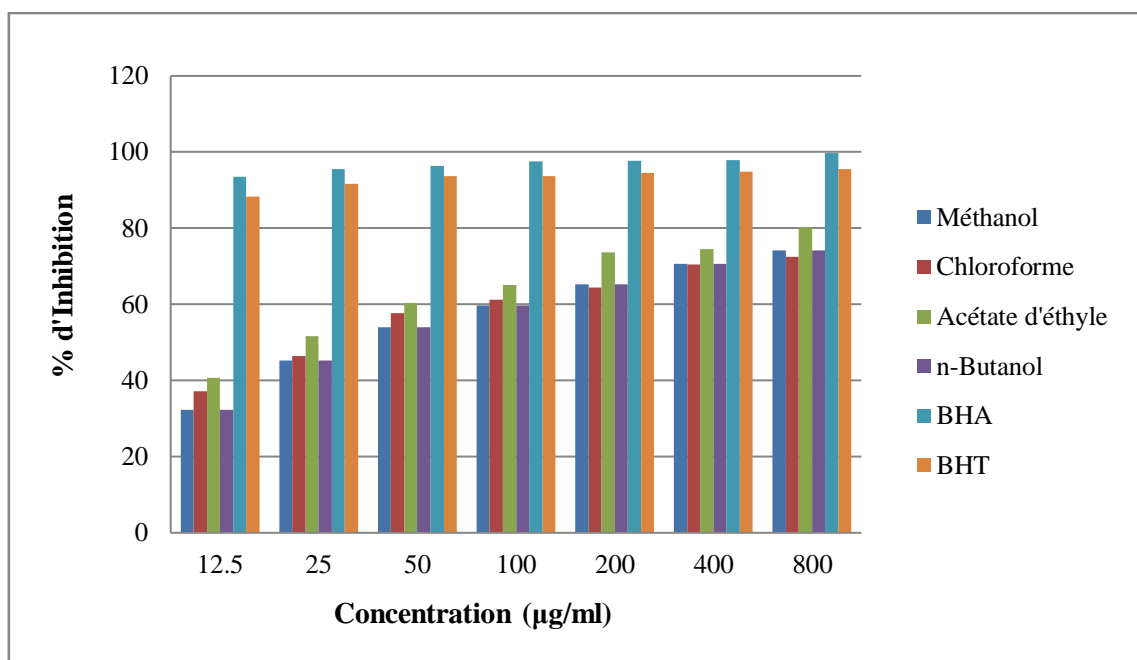


Figure 19. Pourcentages d'inhibitions du test β -carotène pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 10. Valeurs de CI_{50} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test β -carotène.

Extraits/Standards	$CI_{50}^{(1)}$ ($\mu\text{g/ml}$)
Méthanol	$70,93 \pm 0,69^e$
Chloroforme	$34,45 \pm 1,52^c$
Acétate d'éthyle	$27,21 \pm 0,99^b$
n-Butanol	$40,32 \pm 0,56^d$
BHA*	$1,05 \pm 0,03^a$
BHT*	$0,91 \pm 0,01^a$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). * Composés de référence.

La fraction acétate d'éthyle montre la plus grande activité inhibitrice avec une CI_{50} de ($27,21 \pm 0,99 \mu\text{g/ml}$), suivie par la fraction chloroformique (CI_{50} : $34,45 \pm 1,52 \mu\text{g/ml}$), puis la fraction n-butanolique (CI_{50} : $40,32 \pm 0,56 \mu\text{g/ml}$) et l'extrait méthanolique (CI_{50} : $70,93 \pm$

0,69 µg/ml) mais cette activité reste inférieure à celle des standards BHA et BHT qui ont montré une forte activité antioxydante avec des CI_{50} de $(0,91 \pm 0,01, 1,05 \pm 0,03 \mu\text{g/ml})$.

4.1.8. Test de chélation des ions ferreux

Les résultats de l'activité de chélation des ions ferreux sont représentés dans la **Figure 20** et le **Tableau 11**.

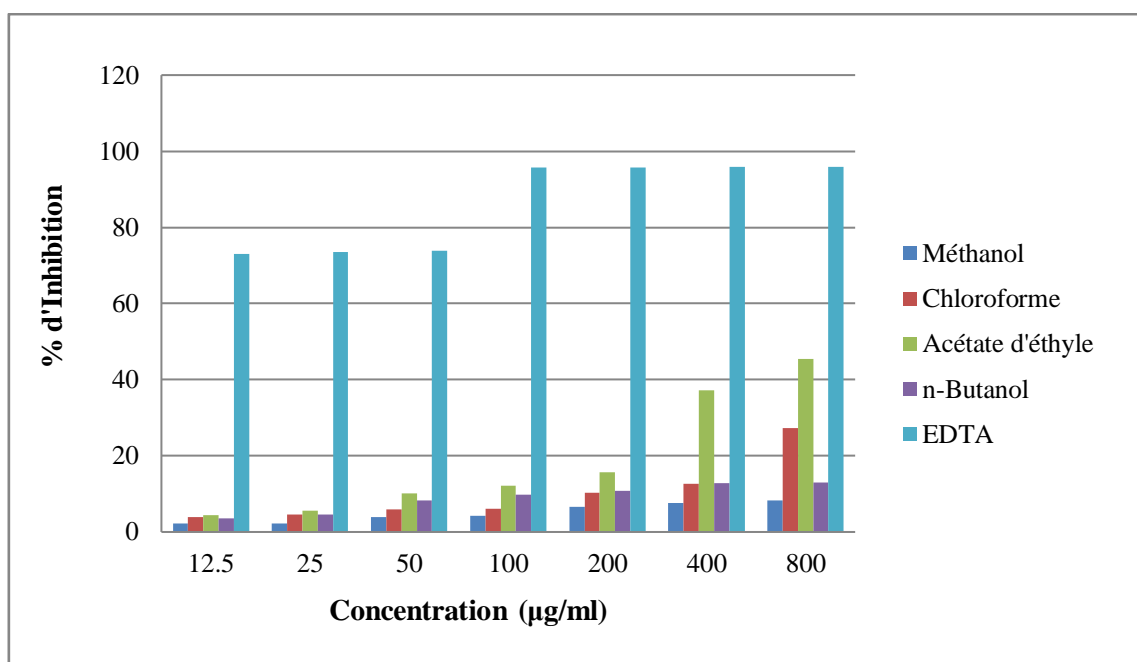


Figure 20. Pourcentages d'inhibitions du test de chélation des ions ferreux pour l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. à différentes concentrations.

Tableau 11. Valeurs de CI_{50} de l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L. par le test de chélation des ions ferreux.

Extraits/Standards	$CI_{50}^{(1)}$ (µg/ml)
Méthanol	>800
Chloroforme	>800
Acétate d'éthyle	>800
n-Butanol	>800
EDTA*	$8,80 \pm 0,47$

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes \pm écart-type de trois mesures. *Composés de référence.

Dans le test de chélation des ions ferreux, on note que l'extrait méthanolique et ses fractions possèdent un pouvoir réducteur faible ($CI_{50} > 800 \mu\text{g/ml}$) par rapport au standard EDTA ($CI_{50} : 8.80 \pm 0.47 \mu\text{g/ml}$).

Les résultats de cette étude démontrent la richesse des différents extraits issus de la plante *Peganum harmala* L. en molécules capables d'inhiber les agents oxydants par divers mécanismes, avec un pouvoir antioxydant modéré en comparaison avec les standards testés en appliquant huit méthodes différentes.

D'après les résultats obtenus, on a pu mettre en évidence une variabilité dans le comportement des extraits dans les tests de piégeage des radicaux libres. La variabilité des résultats est liée à la structure des composants, la nature chimique des extraits et la méthode utilisée (Tlili, 2021).

Globalement, les résultats obtenus de l'activité antioxydante par : DPPH, ABTS, galvinoxyle, CUPRAC, FRAP, phénanthroline et β -carotène révèlent que la fraction acétate d'éthyle est la plus puissante, cela est probablement lié à la complexité de la fraction en substances polyphénoliques et la synergie entre eux pour une meilleure activité antioxydante (Aissani, 2021).

Nos résultats indiquent que la fraction acétate d'éthyle présente une activité remarquable envers le piégeage du radical DPPH. Ceci est en parfaite concordance avec les résultats de Senhaji *et al.*, (2022), obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle des graines de *Peganum harmala* L. du Maroc, qui a montré l'activité de DPPH la plus élevée.

Contrairement, les travaux réalisés par Baghiani *et al.*, (2012), affirment que l'extrait méthanolique des graines de *Peganum harmala* L. avait la capacité la plus élevée par rapport aux autres extraits. Nos résultats montrent également que l'activité la plus faible a été obtenue par l'extrait méthanolique avec une CI_{50} de ($133,18 \pm 1,22 \mu\text{g/ml}$), cette valeur est proche à celles obtenues par Benarous *et al.*, (2015) et Saeedeh *et al.*, (2022). Par ailleurs, certaines études (Khelifi *et al.*, 2013 ; Abbas *et al.*, 2021) ont montré un effet antioxydant élevé de l'extrait méthanolique avec des CI_{50} de ($70,16 \pm 3,30 \mu\text{g/ml}$, $69 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$). Alors que d'autres (Atrooz *et al.*, 2018 ; Radjah *et al.*, 2019), ont démontré un effet plus faible que notre extrait méthanolique avec des CI_{50} de (1,1 mg/ml, 1,949 mg/ml).

Selon **Indiarito et al., (2019)**, la capacité de neutralisation des radicaux était fortement affectée par la présence du groupe hydroxyle en position C-3. La fraction la plus puissante peut donc contenir de nombreux composés phénoliques structurellement efficaces pour piéger le radical DPPH.

Dans un second temps nous avons évalué l'activité antioxydante en appliquant la méthode du piégeage de l'ABTS. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait méthanolique présente une activité antioxydante élevée avec une CI_{50} de $(27,32 \pm 0,79 \mu\text{g/ml})$, cette valeur est supérieure à celle obtenue par **Benarous et al., (2015)**. À l'opposé un faible effet de piégeage estimé à partir de CI_{50} de $(90,7 \pm 1,83 \mu\text{g/ml})$ de l'extrait méthanolique des graines de *Peganum harmala* L. de Tunisie a été retrouvé à partir du piégeage du DPPH lors des travaux réalisés par **Khelifi et al., (2013)**.

Dans cette activité, les extraits ont montré une meilleure capacité de piégeage des radicaux libres que celle de l'activité anti-radicalaire (DPPH), et ceci peut être expliqué par la capacité du radical cation (ABTS) à être plus polyvalent que (DPPH) puisqu'il est soluble dans les solvants organiques et dans l'eau, ce qui permet d'évaluer l'activité de piégeage des radicaux libres pour les composés lipophiles et hydrophiles (**Gülçin, 2010**).

Le pouvoir réducteur des composés peut servir comme un indicateur significatif de leur potentiel antioxydant. Plusieurs études ont indiqué qu'il y a une forte corrélation entre les activités antioxydantes et le pouvoir réducteur des extraits des plantes (**Weidner et al., 2018**).

Les résultats du pouvoir réducteur de l'extrait méthanolique et ses fractions ont montré des activités réductrices remarquables via le fer, ce qui est conforme avec des études précédemment rapportées par **Khadhr et al., (2017)** et **Guergour, (2018)** qui ont indiqué qu'elles ont un pouvoir réducteur (FRAP) significatif.

Concernant la méthode CUPRAC, les résultats obtenus ont montré que la fraction acétate d'éthyle réduit fortement les ions cuivriques (Cu^{2+}), ce qui est en accord avec une étude récemment rapportée par **Taştekin, (2022)** qui a indiqué que la fraction acétate d'éthyle des graines de *Peganum harmala* L. de la Turquie présente la meilleure activité réductrice via le test CUPRAC.

Le test de blanchiment du β -carotène repose sur un système d'émulsion des lipides dans l'eau. Après l'ajout d'extraits, les antioxydants apolaires se regroupent à l'interface lipide-eau pour empêcher la formation de radicaux lipidiques et l'oxydation du β -carotène, présentant ainsi des propriétés antioxydantes significatives. Tandis que les antioxydants polaires sont moins efficaces pour inhiber la peroxydation lipidique car ils demeurent dans la phase aqueuse, ce qui est confirmé dans nos résultats (**Perez Gutierrez et al., 2012**). D'autres chercheurs ont également montré que les différences de solubilité des flavonoïdes et leur répartition entre les deux phases influencent leur activité (**Djeridane et al., 2010**). Les résultats obtenus par le dosage du β -carotène indiquent que les fractions acétate d'éthyle, chloroformique et n-butanolique inhibent l'oxydation d'une manière plus efficace que l'extrait méthanolique. De plus, la fraction acétate d'éthyle a montré une forte activité antioxydante avec une CI_{50} de $(27,21 \pm 0,99 \mu\text{g/ml})$, ce qui est en accordance avec une étude précédemment rapportée par **Baghiani et al., (2012)** qui ont indiqué que l'extrait acétate d'éthyle exerce une activité protectrice remarquable dans le test du β -carotène. Au contraire, les travaux réalisés par **Elansary et al., (2020)** ont montré une activité antioxydante très puissante dans l'extrait méthanolique des feuilles de *Peganum harmala L.* d'Arabie saoudite par le test du β -carotène. Plusieurs phénomènes sont impliqués dans l'inhibition de la peroxydation des lipides parmi lesquels ; piégeage des radicaux et/ou la chélation des ions, c'est pour cela le test de chélation du fer ferreux a été effectué.

Le fer est un minéral essentiel à la vie, car il joue un rôle important dans le transport de l'oxygène, la respiration cellulaire et l'activité enzymatique (**Vigani et Murgia, 2018**). Néanmoins, les métaux sont bien connus pour leur capacité à initier des réactions oxydatives indésirables dans les protéines, les lipides et d'autres composants cellulaires. De plus, le fer est capable de générer des radicaux libres à partir de peroxydes par le biais des réactions de Fenton, et la réduction de la concentration de Fe^{2+} dans cette réaction offre une protection contre les dommages oxydatifs (**Gulcin, 2020**).

La présente étude montre que l'extrait méthanolique et toutes ses fractions possèdent une faible activité chélatrice par le test de férène, ce qui concorde avec les travaux antérieurs réalisés par **Baghiani et al., (2012)**.

En ce qui concerne les tests galvinoxyle et phénantroline, la fraction acétate d'éthyle a montré l'activité antioxydante la plus élevée dans ces tests, ce qui est signalé pour la première fois pour cette espèce. Ces extraits ont démontré la capacité la plus élevée à inhiber le radical hydroxyle, comme mesuré dans le test de la phénanthroline.

À l'issue de ces résultats, il est opportun de signaler que la plante étudiée constitue une bonne source d'antioxydants naturels en raison de sa richesse en substances bioactives, ce qui explique son exploration en médecine traditionnelle dans le traitement des lésions pathologiques liées aux radicaux.

4.2. Activité anti-cholinestérase

L'activité anticholinestérase de l'extrait méthanolique et ses fractions par la méthode d'Ellman en utilisant deux enzymes, à savoir l'acétylcholinestérase (AChE) et la butyrylcholinestérase (BChE). Les résultats de l'inhibition de l'AChE et de la BChE, exprimés en pourcentage d'inhibition et en termes de CI_{50} , sont représentés dans les **Tableaux 12 et 13**.

Tableau 12. Inhibition de l'acétylcholinestérase par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L.

Extrait/Fraction	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	CI_{50} (µg/ml)
Méthanol	3,35±0,61	5,16±0,46	22,48±0,80	28,19±0,89	50,83±1,66	62,20±1,93	71,14±2,03	65,38±1,47
Chloroforme	37,05±1,82	42,45±0,81	49,24±0,66	75,19±0,89	83,98±1,69	88,25±0,46	91,90±0,57	14,69±0,10
Acétate d'éthyle	25,14±0,51	32,19±0,06	43,39±0,25	53,11±0,56	72,66±0,94	81,33±0,51	86,15±0,64	24,57±0,78
n-Butanol	20,96±1,45	25,34±1,95	38,33±0,43	45,24±0,18	75,73±0,30	83,47±0,11	86,02±0,66	36,01±0,18
Galantamine*	35,93±2,28	43,77±0,00	68,50±0,31	80,69±0,41	85,78 ± 1.63	91,80 ± 0,20	94,77± 0,34	6,27±1,15

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composé de référence.

D'après ces résultats, il apparaît que l'extrait méthanolique et ses fractions ont montré une activité inhibitrice de l'acétylcholinestérase intéressante. Parmi les fractions actives, la fraction chloroformique a enregistré l'activité la plus prononcée avec une CI_{50} de ($14,69 \pm 0,10$ µg/ml), comparable à celle du standard utilisé, la galantamine (CI_{50} : $6,27 \pm 1,15$ µg/ml), suivie par la fraction acétate d'éthyle (CI_{50} : $24,57 \pm 0,78$ µg/ml), puis la fraction n-butanolique (CI_{50} : $36,01 \pm 0,18$) et l'extrait méthanolique (CI_{50} : $65,38 \pm 1,47$ µg/ml).

Tableau 13. Inhibition de la butyrylcholinestérase par l'extrait méthanolique et ses fractions de la plante *Peganum harmala* L.

Extrait/Fraction	% d'inhibition							
	3.125 µg	6.25 µg	12.5 µg	25 µg	50 µg	100 µg	200 µg	CI ₅₀ (µg/ml)
Méthanol	22,53±0,76	39,60±0,47	45,80±0,96	62,60±0,38	74,53±0,19	76,14±0,38	78,82±1,64	24,76±0,86
Chloroforme	30,84±0,25	47,16±0,47	69,56±0,40	81,39±0,26	91,61±0,20	94,95±0,78	95,75±0,11	7,36±0,77
Acétate d'éthyle	32,91±0,80	41,26±0,93	53,01±1,93	72,01±0,15	80,39±0,95	88,54±0,18	93,84±0,40	12,14±1,10
n-Butanol	23,91±0,66	40,01±0,21	47,03±0,55	63,13±0,36	78,13±0,57	85,15±1,75	89,92±1,46	17,60±0,31
Galantamine*	3,26±0,62	6,93±0,62	24,03±2,94	45,13±2,60	63,87±2,85	73,57±0,77	78,95±0,58	34,75±1,99

⁽¹⁾Les valeurs sont exprimées en moyennes ± écart-type de trois mesures. Les valeurs portant des lettres différentes sont significativement différentes ($p < 0,05$). *Composé de référence.

L'inhibition de la butyrylcholinestérase, par la fraction chloroformique, est la plus puissante (CI₅₀ : 7,36 ± 0,77 µg/ml), suivie par la fraction acétate d'éthyle (CI₅₀ : 12,14 ± 1,10 µg/ml), butanolique (CI₅₀ : 17,60 ± 0,31 µg/ml), et l'extrait méthanolique (CI₅₀ : 24,76 ± 0,86 µg/ml). Cet effet est même plus important que celui exercé par la galantamine (CI₅₀ : 34,75 ± 1,99 µg/ml).

Selon la littérature, l'activité anti-cholinestérase de *Peganum harmala* L. est peu étudiée. Dans ce travail, les extraits testés ont révélé une activité inhibitrice très élevée contre l'AChE et la BChE, en raison de la présence de phytomolécules inhibitrices bioactives. La fraction chloroformique a montré l'effet le plus puissant contre l'AChE et la BChE, malgré sa faible teneur en composés phénoliques et flavonoïdes. Ces résultats suggèrent l'implication de d'autres composés bioactifs tels que les alcaloïdes et les coumarines dans l'inhibition de ces enzymes. Un résultat similaire a été trouvé dans les fractions acétate d'éthyle et n-butanolique, suggérant le rôle de la teneur en flavonoïdes contre l'activité de la cholinestérase. En outre, les extraits ont inhibé plus efficacement la BChE que l'AChE, et leur activité explique donc la spécificité de la BChE par rapport à l'AChE.

Les résultats ont également montré une bonne activité inhibitrice de l'extrait méthanolique contre l'AChE (CI₅₀ : 65,38 ± 1,47 µg/ml) ce qui est similaire à celle rapportée dans l'étude d'Ali *et al.*, (2013) menée sur l'extrait méthanolique de *Peganum harmala* L. d'Egypte, qui a montré une activité inhibitrice importante de l'AChE (CI₅₀ : 68 µg/ml). L'effet de la BChE de l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Peganum harmala* L. de Tunisie a été récemment rapporté par Edziri *et al.*, (2018).

Conformément aux études réalisées, la plante renferme des alcaloïdes de type β -carboline, qui ont démontré une activité puissante contre l'AChE (Cao *et al.*, 2007). Parmi ces molécules, l'harmaline qui est un alcaloïde commun de type dihydro β -carboline, il possède des activités pharmacologiques intéressantes et peut interagir avec plusieurs enzymes et neurotransmetteurs, notamment la topoisomérase I et la monoamine oxydase-A (Herraiz *et al.*, 2010).

Selon d'autres recherches, nous ne pouvons pas encore commenter l'agent actif qui produit l'inhibition de l'AChE (Nwidu *et al.*, 2017), ce qui est nécessaire d'identifier les fractions appropriées pour une purification et une identification des agents actifs, qui pourraient être utiles pour soulager les symptômes associés à la maladie d'Alzheimer.

Chapitre 2.

Étude de l'effet de la plante
Peganum harmala L. sur la
croissance et la production de
métabolites secondaires de la souche
Streptomyces ayarii sp. S115

1. Description de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Streptomyces ayarius sp. S115, est un Actinomycète Gram-positive, aérobie, immobile, formant un mycélium de substrat ramifié et un mycélium aérien qui se différencie en chaînes de spores enroulées en spirale. Elle se développe sur tous les milieux ISP avec formation de pigments mélanoides sur les géloses ISP6 et ISP7. Sa croissance se produit à un pH de 6 à 12 (pH optimal 8), à une température de 20 à 40 °C (optimum à 28 °C) et avec une tolérance de 0 à 10 % au NaCl (optimum à 4 % de NaCl). Elle peut utiliser l'amidon, D-glucose, fructose, saccharose, L-arabinose, D-galactose, inositol, lactose, maltose, mannitol, sorbitol comme seule source de sucre et métaboliser faiblement L-rhamnose, mais elle est incapable d'utiliser la cellulose et le D-xylose. L'adénine, glycine, L-arginine, L-alanine, L-asparagine, L-leucine, L-lysine, L-phénylalanine, L-valine et L-tyrosine sont utilisées comme seule source d'azote, mais pas l'hypoxanthine et le L-tryptophane. Cette espèce est résistante au chloramphénicol, à l'acide nalidixique, à la gentamicine, à la novobiocine, à la pénicilline G et au sulfaméthoxazole, mais sensible à la rifampine, à la kanamycine, à la streptomycine, à la tétracycline et à la tobramycine (**Tableau 14**). La souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 a été isolée des sédiments aquatiques collectée dans le lac Oubeira, dans la région d'El-Kala, au Nord-Est Algérien. La séquence complète du gène de l'ARNr 16S de la souche a été déposée dans GenBank (numéro d'accèsion MH095989). Le génome complet comprend 7 289 495 pb et la teneur en ADN G+C est de 72,46 % en moles.

Tableau 14. Caractérisations biochimiques et physiologiques de *Streptomyces ayarius* sp. S115.

pH optimal	6-12 (8 opt)	Cellulose	-
Température optimale	20-40 °C (28 °C)	Saccharose	+
Résistance à NaCl	0-10 % (4 % opt)	Xylose	-
Oxydase	-	Galactose	+
Catalase	+	Sorbitol	+
Hydrolyse de l'amidon	+	Arabinose	+
Hydrolyse de la gélatine	+	Lactose	+
Production de l'indole	+	Inositol	+
Uréase	+	Leucine arylamidase	+
Utilisation de Citrate	+	Valine arylamidase	+
Production de H ₂ S	-	Adénine déshydrogénase	+
Production de Nitrate	+	Arginine dihydrolase	+
Production de Mélanine	-	Alanine	+
Hydrolyse de la Caséine	+	Asparagine	+
Fructose	+	Lysine décarboxylase	+
Glucose	+	Phénylalanine	+
Maltose	+	Tyrosine	+
Mannitol	+	Hypoxanthine	-
Rhamnose	+	Tryptophane	-

2. Caractérisations morphologiques de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

Après une période d'incubation de 14 jours dans la gélose ISP2 et le milieu gélosé ISP2 modifié, les colonies de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 ont été bien développées dans les deux milieux et sont apparues avec une texture poudreuse, il est intéressant de noter que le mycélium aérien présente une couleur grise dans ISP2 (**Figure 21A**), tandis que la couleur du milieu gélosé ISP2 modifié a été changée en blanche (**Figure 21B**), alors que la couleur du mycélium de substrat est resté colorée en brun.



Figure 21. Caractéristiques morphologiques de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).

Dans cette étude, le milieu ISP2 favorisant la sporulation des Actinomycètes (**Shirling et Gottlieb, 1966**) a été choisi pour évaluer l'effet de la poudre végétale sur la croissance de la souche. Ce milieu est composé d'une source de carbone, de glucose, d'une source d'azote, d'extrait de malt et d'extrait de levure. La supplémentation en poudre végétale conserve la capacité de ce milieu à favoriser la sporulation bactérienne et modifie la couleur du mycélium aérien qui passe du gris au blanc. Ce changement de couleur est probablement lié à la poudre végétale riche en composés phénoliques et en flavonoïdes.

3. Activité antibactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

Les résultats de la méthode de diffusion sur puits ont montré une forte activité antibactérienne des extraits bruts du bouillon ISP2 modifié de la souche *S. ayarius* sp. S115 vis-à-vis toutes les espèces cibles Gram-positives et Gram-négatives : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 et *Serratia* sp. ATCC 39006 par rapport au bouillon ISP2 (**Tableau 15 et Figure 22**).

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Tableau 15. Activité antibactérienne de la souche *Streptomyces ayarius* S115 sp. dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Extrait de souche	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	MRSA ATCC 43300	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)					
SA-Hx.	47	34	28	29	37,5
SA-n-But.	17,5	16,5	16,5	17	16
SA-A.A.	28	21,5	20	30,5	18
SA-A.E.	13,5	16	15,5	14,5	15
SA ⁺ -Hx.	44,5	30	36	26	34,5
SA ⁺ -n-But.	51,5	37,5	19,5	26	36
SA ⁺ -A.A.	48	29	39	47	40
SA ⁺ -A.E.	46	42	43	42	60,5

Hx.: Hexane, n-But. : n-Butanol, A.A. : Acide Acétique, A.E. : Acétate d'éthyle, SA : *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans le milieu ISP2, SA⁺ : *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans le milieu ISP2 modifié.

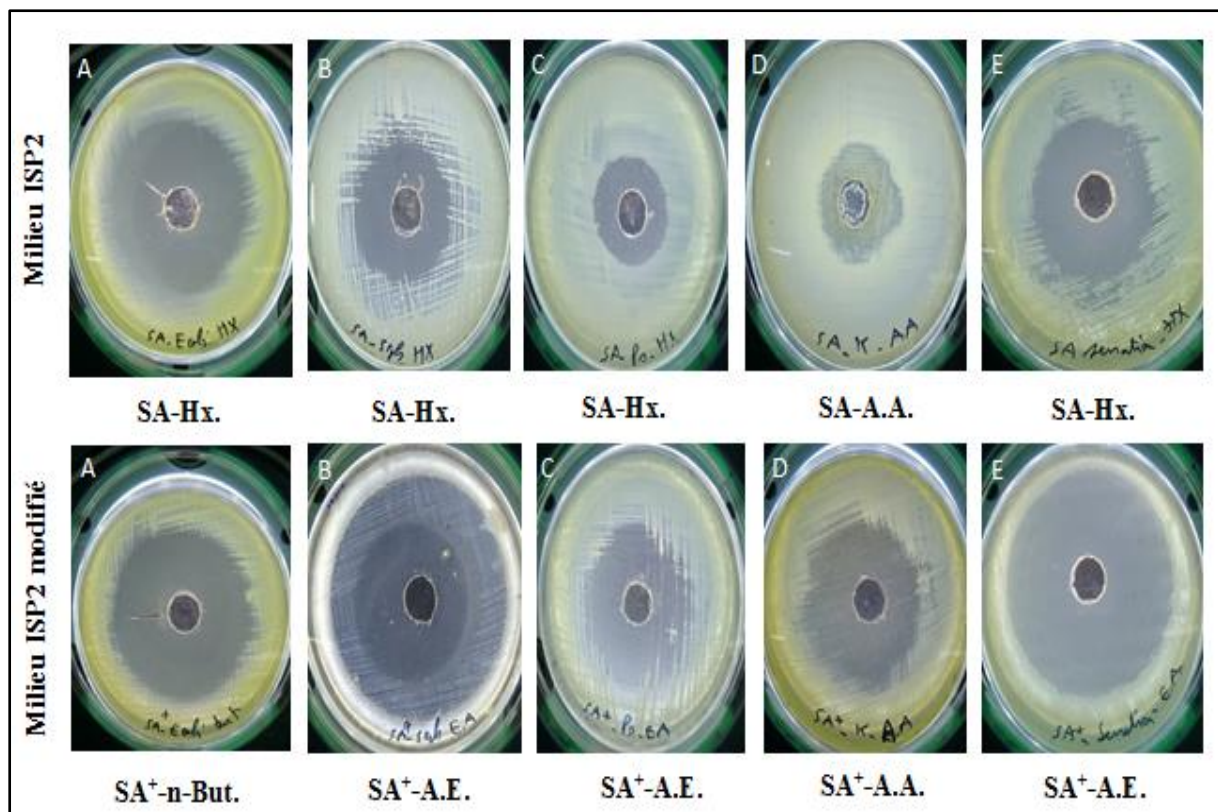


Figure 22. Meilleurs solvants dans l'activité antibactérienne de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

A : *E. coli* ATCC 25922 ; B : MRSA ATCC 43300 ; C : *P. aeruginosa* ATCC 27853 ; D : *K. pneumoniae* ATCC 4381 ; E : *Serratia* sp. ATCC 39006.

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Le diamètre de la zone d'inhibition de l'activité antibactérienne vis-à-vis aux bactéries Gram-négatives était significativement plus élevé que celui des bactéries Gram-positives, les valeurs variant de 13,5 mm à 60,5 mm. Comme indiqué, les actinomycètes sont des bactéries riches en métabolites secondaires, en enzymes extracellulaires et en inhibiteurs d'enzymes. Cette étude a donc montré la capacité des Actinomycètes à assimiler les composés phénoliques des végétaux du milieu ISP2 modifié pour synthétiser des molécules bioactives à forte activité antibactérienne. En ce qui concerne l'optimisation du solvant d'extraction, l'acétate d'éthyle était le meilleur solvant pour extraire tous les agents antibactériens du bouillon ISP2 modifié contre MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Serratia* sp. ATCC 39006. Par ailleurs, le n-butanol et l'acide acétique étaient respectivement les meilleurs solvants d'extraction pour *E. coli* ATCC 25922 et *K. pneumoniae* ATCC 4381. Dans le bouillon ISP2 dépourvu de la poudre de plante, l'hexane était le solvant adéquat pour une extraction efficace des molécules bioactives contre *E. coli* ATCC 25922, MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853 et *Serratia* sp. ATCC 39006, mais l'acide acétique s'est avéré être un solvant efficace pour l'extraction d'agents antibactériens contre *K. pneumoniae* ATCC 43816.

Une étude précédente utilisant différents solvants, dont l'acétate d'éthyle, le méthanol et le chloroforme, pour extraire les composés bioactifs et comparer les zones d'inhibition des extraits a montré que l'acétate d'éthyle était le meilleur des solvants testés (Ayari *et al.*, 2012 ; Ayari *et al.*, 2016 ; El-Shanshoury *et al.*, 2022). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de la croissance bactérienne par les filtrats de culture est probablement liée à la production d'enzymes hydrolytiques extracellulaires et de composés antibactériens secondaires activés par le milieu ISP2 supplémenté en polyphénols de plante. La plupart des métabolites secondaires bioactifs de *Streptomyces* sont des agents antimicrobiens, anticancéreux et immunosuppresseurs (Salwan et Sharma, 2020). En outre, ces bactéries contribuent à produire près des deux tiers des antibiotiques commerciaux (Ayari *et al.*, 2016). Il convient de noter que certains des antibiotiques utilisés en thérapie, tels que la streptomycine, la kanamycine, la tétracycline, le chloramphénicol et la néomycine, sont dérivés de *S. griseus*, *S. kanamyceticus*, *S. venezuelae* et *S. fradiae* (Quinn *et al.*, 2020 ; Pandey *et al.*, 2021).

4. Détermination de la biomasse bactérienne dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

La quantité de biomasse était deux fois plus élevée que celle trouvée dans le milieu (ISP2) (Tableau 16 et Figure 23).

Tableau 16. Cinétique de la biomasse de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Jours	Milieu ISP2	Milieu ISP2 modifié
0	0	0
1	0,0011945	0,00084
2	0,01489	0,0164
3	0,01653	0,02235
4	0,02479	0,0411
5	0,0271	0,06001
6	0,01329	0,0231
7	0,01319	0,02237

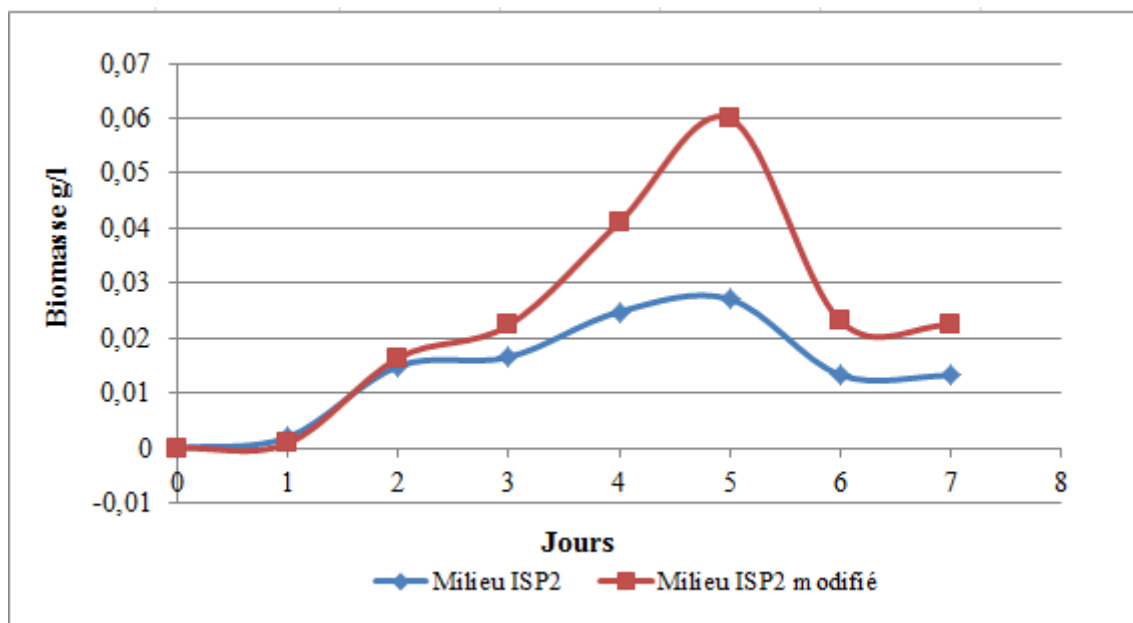


Figure 23. Cinétique de la biomasse de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

La valeur maximale de la biomasse a été observée au 5^{ème} jour dans les deux milieux, où elle a atteint 0,0271 dans le milieu ISP2, et 0,06001 dans le milieu ISP2 modifié. Comme la composition du milieu peut influencer la production de biomasse, la production de métabolites secondaires est supposée se produire lorsque la croissance est limitée par l'un des substrats du milieu (**Demain et Dijkhuizen, 2006**). Les trois principaux facteurs provoquant cette limitation sont notamment les sources de carbone, d'azote et de phosphate. Globalement, lorsque l'un de ces éléments devient limitant, la croissance ralentit et par conséquent, la production de métabolites secondaires tels que les antibiotiques a lieu pendant l'idiophase.

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Dans certaines conditions expérimentales, une forte production de biomasse peut avoir lieu pendant la phase de croissance sans limitations nutritionnelles mais avec des substrats lentement métabolisables, ce qui est similaire au cas des composés phénoliques des végétaux. En conséquence, **Voelker et Altaba, (2001)** ont signalé la production de pristinamycines pendant la phase de croissance dans le milieu de culture de *Streptomyces pristinaespiralis* contenant du nitrate de sodium comme seule source d'azote.

5. Cinétique et optimisation de la croissance et de la production de métabolites secondaires dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié

Le milieu ISP2 a été considéré comme le meilleur milieu de culture parmi ceux testés dans plusieurs études antérieures, montrant une production optimale d'agents antimicrobiens. L'ISP2 supplémenté en poudre de plante a montré une biomasse plus élevée que celle trouvée dans l'ISP2 seul. Dans le milieu ISP2 contenant différentes sources de carbone, y compris le glycérol, le maltose et le sucrose au lieu du glucose comme source de carbone a montré que le glycérol était la source optimale de carbone dans l'ISP2 (**Tableau 17** et **Figure 24**) alors que le glucose était la source optimale de carbone dans le milieu modifié ISP2 en 3^{ème} jour de culture.

Tableau 17. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources de carbone) de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Jours	Glycérol		Maltose		Sucrose		Glucose	
	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
0	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
1	0,211	0,311 ⁺	0,078	0,348 ⁺	0,101	0,221 ⁺	0,094	0,405 ⁺
2	0,24	0,325 ⁺	0,09	0,366 ⁺	0,12	0,25 ⁺	0,12	0,422 ⁺
3	0,25	0,399 ⁺	0,119	0,41 ⁺	0,133	0,33 ⁺	0,165	0,456 ^{*+}
4	0,277*	0,374 ⁺	0,206	0,388 ⁺	0,154	0,298 ⁺	0,235	0,432 ⁺
5	0,26	0,358 ⁺	0,196	0,374 ⁺	0,137	0,28 ⁺	0,221	0,421 ⁺
6	0,241	0,34 ⁺	0,174	0,355 ⁺	0,125	0,266 ⁺	0,21	0,413 ⁺
7	0,222	0,322 ⁺	0,09	0,347 ⁺	0,113	0,241 ⁺	0,098	0,356 ⁺

⁺ : Milieu ISP2 modifié.

* : Taux élevé.

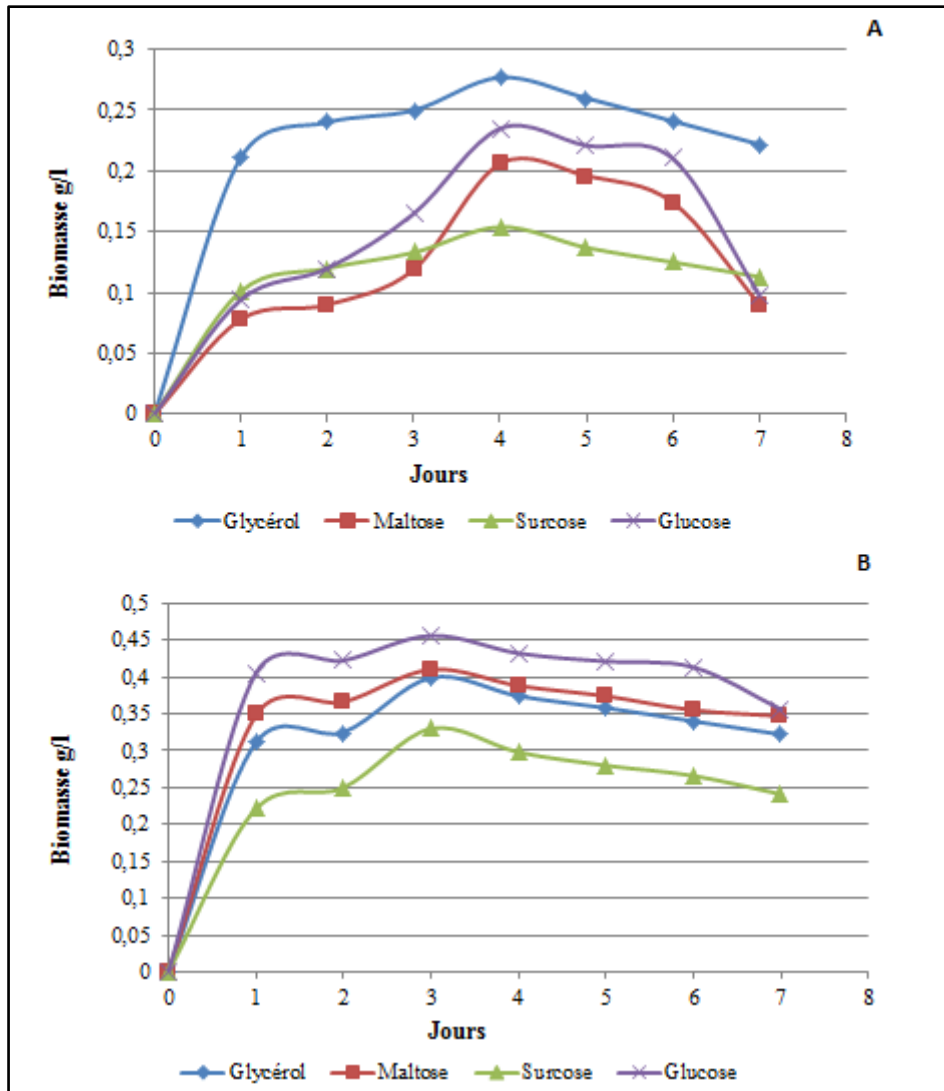


Figure 24. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources de carbone) de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).

En outre, le glycérol a été identifié comme la source de carbone optimale parmi les sources de carbone testées pour remplacer le glucose dans le milieu ISP2, présentant la plus grande zone d'inhibition contre *E. coli* ATCC 25922, MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia* sp. ATCC 39006 au 4^{ème} jour de la culture (**Tableau 18**). Une étude précédente a rapporté que la production maximale de certains antibiotiques était obtenue en utilisant le glucose et le lactose comme sources de carbone (Ilić *et al.*, 2010 ; Sebak *et al.*, 2021).

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Tableau 18. Optimisation de la production de métabolites secondaires (effet des sources de carbone) de *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Souche Jours	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922								MRSA ATCC 43300								<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853							
	GY		M		S		GL		GY		M		S		GL		GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	0	17 ⁺	0	15,5 ⁺	0	13,5 ⁺	0	16,8 ⁺	21	22 ⁺	0	17 ⁺	0	14 ⁺	18	20 ⁺	18	19,5 ⁺	15,5	16 ⁺	13	14,5 ⁺	17,2	18,5 ⁺
3	19	24,8 ⁺	16	17 ⁺	12	15,8 ⁺	17	23 ⁺	24	26 ⁺	18	20 ⁺	14	18 ⁺	19	22,5 ⁺	21,5	22 ⁺	17	18,5 ⁺	14	16 ⁺	19	21 ⁺
4	28	30 ⁺	22	24 ⁺	22	21 ⁺	23	28 ⁺	27,5	30 ⁺	20	24 ⁺	15,5	22 ⁺	23,5	26 ⁺	24	25,5 ⁺	19	20,5 ⁺	15,5	18 ⁺	22	24 ⁺
5	24	27 ⁺	20,5	22 ⁺	20	20 ⁺	21	26,2 ⁺	24,5	28 ⁺	19	20,5 ⁺	13,5	16,5 ⁺	22	25 ⁺	23	23 ⁺	18,5	19,5 ⁺	13,5	17 ⁺	21	22,5 ⁺
6	23	25,5 ⁺	19	20,2 ⁺	18	18,2 ⁺	20,5	24 ⁺	22	25 ⁺	18	18,5 ⁺	12	14,5 ⁺	20	21,5 ⁺	20	21,5 ⁺	17	18 ⁺	13	14,5 ⁺	18	19,5 ⁺
7	21	23 ⁺	19	19 ⁺	16	17 ⁺	19	20 ⁺	20	21 ⁺	17	17 ⁺	11	13,5 ⁺	19	19 ⁺	19	19 ⁺	16	17 ⁺	12	13 ⁺	17	18 ⁺

Souche Jours	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816								<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006							
	GY		M		S		GL		GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	19	20,5 ⁺	15,5	17 ⁺	14	15,5 ⁺	17,5	19,8 ⁺	18	19,2 ⁺	13	15 ⁺	13	17 ⁺	17	18 ⁺
3	19,8	22 ⁺	17,8	18 ⁺	16,5	17,8 ⁺	19	21 ⁺	19,5	20,5 ⁺	16	17,5 ⁺	17	18,5 ⁺	19,5	20 ⁺
4	23	25 ⁺	20	21 ⁺	18,5	19,4 ⁺	22	24 ⁺	23	24,8 ⁺	18,5	20,5 ⁺	20	21,2 ⁺	22	22,5 ⁺
5	22,5	21 ⁺	18	19 ⁺	17	18 ⁺	21,2	20 ⁺	22,5	23 ⁺	16,8	17 ⁺	18	19 ⁺	19	21 ⁺
6	20,9	19 ⁺	16	17,5 ⁺	15,2	16,2 ⁺	19	19 ⁺	22	22,2 ⁺	15	14 ⁺	16	17 ⁺	17,5	19,8 ⁺
7	18,5	18 ⁺	15,5	16 ⁺	14,5	15,5 ⁺	18	17 ⁺	20	19 ⁺	13	13 ⁺	13,8	15,8 ⁺	15,5	17 ⁺

GY : Glycérol ; M : Maltose ; S: Sucrose ; GL : Glucose.

+ : Milieu ISP2 modifié.

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Le tryptone s'est révélé la meilleure source d'azote pour *S. ayarius* sp. S115 dans le milieu ISP2 modifié alors que l'extrait de levure est resté le bon substrat azoté dans l'ISP2 (**Tableau 19** et **Figure 25**). Le tryptone aboutit à une bonne croissance au 4^{ème} jour (0.159 g/l) avec un maximum de production (31 mm) le même jour. L'utilisation de l'extrait de levure a montré un maximum de croissance (0.134 g/l) au 3^{ème} jour et d'activité antibactérienne (27 mm) au 4^{ème} jour (**Tableau 20**).

La production est meilleure lorsque la source d'azote est organique. Les acides aminés et les substrats complexes d'azote sont les plus favorables, permettant une croissance rapide et une assimilation progressive.

Tableau 19. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources d'azote) de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Jours	Extrait de Levure		Tryptone		Nitrate de potassium	
	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
1	0,089	0,074 ⁺	0,074	0,088 ⁺	0,069	0,059 ⁺
2	0,107	0,084 ⁺	0,085	0,099 ⁺	0,084	0,072 ⁺
3	0,134*	0,095 ⁺	0,094	0,135 ⁺	0,09	0,081 ⁺
4	0,112	0,073 ⁺	0,102	0,159 ⁺ *	0,099	0,094 ⁺
5	0,092	0,059 ⁺	0,089	0,122 ⁺	0,087	0,08 ⁺
6	0,081	0,049 ⁺	0,075	0,101 ⁺	0,065	0,072 ⁺
7	0,067	0,04 ⁺	0,055	0,091 ⁺	0,053	0,067 ⁺

⁺ : Milieu ISP2 modifié.

* : Taux élevé.

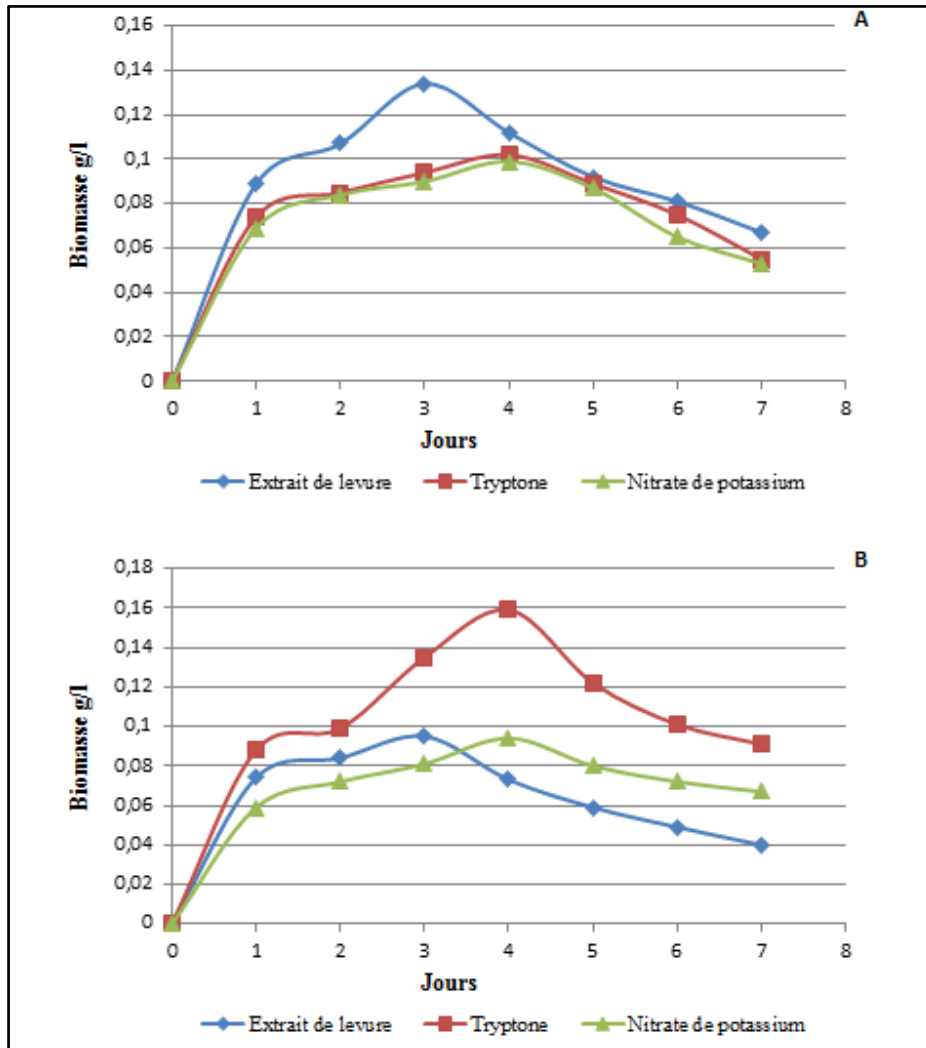


Figure 25. Cinétique et optimisation de la croissance (effet des sources d'azote) de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 (A) et ISP2 modifié (B).

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

Tableau 20. Optimisation de la production de métabolites secondaires (effet des sources d'azote) de *Streptomyces ayarius* sp. S115 dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié.

Souche Jours	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						MRSA ATCC 43300						<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853					
	EL		T		NP		EL		T		NP		EL		T		NP	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	10	16 ⁺	12	17.5 ⁺	0	14 ⁺	0	16 ⁺	0	18 ⁺	0	13.5 ⁺	17	19 ⁺	19.5	21 ⁺	0	13 ⁺
3	17	22 ⁺	16	24.5 ⁺	10	17 ⁺	19	22 ⁺	19	24 ⁺	14	19 ⁺	20.5	22 ⁺	21	23.5 ⁺	13	17 ⁺
4	21	29 ⁺	22	31 ⁺	15	22 ⁺	23.5	29.5 ⁺	24	28 ⁺	19.5	26 ⁺	22	24 ⁺	25	27.5 ⁺	17	19 ⁺
5	20	25.5 ⁺	20.5	27 ⁺	14	20 ⁺	20.5	26 ⁺	22	24.5 ⁺	15	21.5 ⁺	21	22 ⁺	21	23 ⁺	15.5	17 ⁺
6	18.5	23.5 ⁺	17	24 ⁺	12	18 ⁺	17.5	20 ⁺	18	21.5 ⁺	13	18.5 ⁺	18	19.5 ⁺	19	20 ⁺	14	15 ⁺
7	17	21 ⁺	16	22 ⁺	0	15 ⁺	14	16 ⁺	16	18 ⁺	11	13 ⁺	16.5	19 ⁺	17.5	19 ⁺	11	13 ⁺

Souche Jours	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816						<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006					
	EL		T		NP		EL		T		NP	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	20	22.5 ⁺	19	21.5 ⁺	0	16 ⁺	17	18.8 ⁺	15	19 ⁺	0	14 ⁺
3	24	26.5 ⁺	22	24 ⁺	16	18.5 ⁺	19	22 ⁺	16.5	23.8 ⁺	15	19 ⁺
4	27	29 ⁺	24	26.5 ⁺	19	23 ⁺	21	25 ⁺	18.5	26 ⁺	19	22 ⁺
5	24	27 ⁺	21	23 ⁺	18	20 ⁺	19.5	23 ⁺	17.5	23 ⁺	17	19 ⁺
6	22	25 ⁺	19	20 ⁺	16.5	18 ⁺	17	20 ⁺	15	21.2 ⁺	15	16.2 ⁺
7	19	22 ⁺	17	18 ⁺	13	17 ⁺	15	18 ⁺	12.8	19.5 ⁺	13	14 ⁺

EL : Extrait de Levure ; T : Tryptone ; NP : Nitrate de Potassium.

+ : Milieu ISP2 modifié.

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

La souche *S. ayarius* sp. S115 cultivée dans le milieu ISP2 a montré une bonne production de métabolites secondaires, et une croissance bactérienne importante commençant par une phase de croissance exponentielle d'une durée de 1 jour (0-1 jour), suivie d'une deuxième phase exponentielle entre le 2^{ème} et le 4^{ème} jour pour le milieu ISP2 et entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jour pour le milieu ISP2 modifié. Ceci suggère la présence d'un phénomène diauxique. De plus, une phase de déclin commence le 4^{ème} jour pour l'ISP2 et le 3^{ème} jour pour le milieu ISP2 modifié. La production d'antibiotiques commence le 3^{ème} jour dans l'ISP2 et le 2^{ème} jour dans le milieu ISP2 modifié pendant la phase exponentielle, tandis que la production maximale est observée le 4^{ème} jour pour toutes les bactéries pathogènes testées dans les deux milieux, c'est-à-dire pendant la phase de déclin. Les antibiotiques produits par la souche bactérienne cultivée dans le milieu ISP2 modifié étaient différents et plus importants que ceux du milieu ISP2 jusqu'au dernier jour de la culture, montrant une production régulière et continue d'antibiotiques. De plus, la cinétique de croissance et la production de métabolites secondaires ont été étudiées en conditions liquides et sous agitation en utilisant les deux milieux (ISP2 et ISP2 modifié). Ce choix a été fait sur la base des résultats des études précédemment menées, indiquant que le milieu ISP2 composé d'extrait de malt (10 g/l), d'extrait de levure (4 g/l) et de glucose (4 g/l) est l'un des milieux les plus favorables à la production d'antibiotiques chez les Actinomycètes (**Bouali et al., 2017**). La différence entre les deux milieux utilisés est liée à l'ajout d'une quantité de poudre végétale. Pour la cinétique de croissance, certains points communs entre les deux milieux ont été constatés, notamment l'absence de phase de latence où les pré-cultures peuvent être réalisées dans les mêmes conditions que les cultures et être prélevées dans la phase exponentielle de croissance. L'autre point commun est celui de la production d'antibiotiques pendant la phase exponentielle. En revanche, la production de métabolites secondaires par les micro-organismes peut généralement avoir lieu pendant la phase de ralentissement et la phase stationnaire (idiophase), tandis que la période de production est variable, et peut avoir lieu pendant la phase exponentielle chez les Actinomycètes (**Bouali et al., 2017**).

Des travaux ont montré que le glucose était la meilleure source de carbone pour la production de l'érythromycine (**El-Enshasy et al., 2008**) et pour la production de l'antibiotique par *S. griseocarneus* (**Cruz et al., 1999**). Par ailleurs, **Yu et al., (2008)** ont démontré que *Streptomyces* MY02 présentait une activité antimicrobienne élevée en présence d'amidon. De plus, **Oskay et al., (2010)** ont montré qu'une bonne croissance et production de métabolites ont été observées en présence de glycérol et glucose. De même, *Streptomyces*

Chapitre 2. Étude de l'effet de la plante *Peganum harmala* L. sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115

US80 et *Streptomyces* sp. TN 97 ont produit un maximum de métabolites secondaires dans un milieu supplémenté en glycérol et glucose (Fourati-Ben Fguira *et al.*, 2005 ; Mehdi *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que la production de métabolites dépend des composants du milieu de culture. En effet, la production d'antibiotiques chez divers micro-organismes est fortement influencée par la nature des sources de carbone et d'azote utilisées. Il est fréquent que les substrats rapidement métabolisés comme le glucose aient des taux de croissance cellulaire maximale, mais ils sont également connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Les intermédiaires, qui sont des produits du catabolisme rapide du glucose, semblent être responsables de cette répression du catabolite, en perturbant les enzymes dans le métabolisme secondaire. Ce dernier est régulé par la source d'azote, tout comme la source de carbone. La production d'antibiotiques est réprimée par des niveaux élevés d'azote pendant l'idiophase. De plus, Les acides aminés peuvent avoir un effet inhibiteur ou améliorateur sur la biosynthèse de certains métabolites secondaires. Trois conditions permettent de produire les métabolites secondaires. Tout d'abord, il est essentiel d'avoir une biomasse pour produire la molécule, ensuite il faut avoir des précurseurs et enfin des enzymes capables de les transformer, qui doivent également être présentes et actives (Voelker et Altaba, 2001). La diversité et la complexité sont deux des caractéristiques les plus significatives de la régulation du métabolisme secondaire chez *Streptomyces*. Les actinomycètes produisent des antimicrobiens qui se distinguent par leur production spécifique, leur diversité structurale, leur résistance à l'auto-dégradation et leur productivité instable.

Conclusion et

perspectives

Conclusion et perspectives

Dans le but de rechercher de nouvelles molécules à intérêt thérapeutique, nous nous sommes intéressés à valoriser les vertus d'une plante médicinale de la famille des *Zygophyllaceae* : *Peganum harmala* L. par l'évaluation des activités biologiques *in-vitro*. Ainsi, cette étude a rapporté pour la première fois l'effet de cette plante sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115.

Les inductions thérapeutiques pourraient se justifier par la richesse des espèces étudiées en métabolites secondaires, qui constituent la base scientifique de l'utilisation traditionnelle de cette plante. Dans ce sens, le criblage phytochimique de la poudre issue des graines de *Peganum harmala* L. a révélé la présence de plusieurs classes de métabolites secondaires à savoir les alcaloïdes, les flavonoïdes, les triterpènes, les coumarines, les quinones, les saponosides et les glucosides et une absence totale des tanins, des anthocyanes et des leuco-anthocyanes.

Des quantités importantes en composés phénoliques, y compris des flavonoïdes ont été enregistrées dans l'extrait méthanolique et ses fractions. Les résultats obtenus, montrent l'efficacité de la fraction acétate d'éthyle comme antioxydant, exerçant une activité très puissante liée à leur richesse en composés phénoliques, tout en montrant un effet inhibiteur très important de l'acétylcholinestérase et de la butyrylcholinestérase. L'efficacité de la fraction chloroformique, à inhiber les deux enzymes, pourrait être due à la présence des alcaloïdes qui constituent les inhibiteurs les plus puissants.

D'autre part, la culture sur le milieu ISP2 modifié supplémenté de la poudre végétale a montré une croissance importante de la souche *S. ayarius* S115 avec un changement de couleur du mycélium aérien de gris à blanc. Concernant l'effet antibactérien, l'analyse a révélé une forte activité inhibitrice de l'ISP2 modifié de la souche *S. ayarius* sp. S115 vis-à-vis de toutes les souches testées à Gram-positives et à Gram-négatives par rapport à celle de l'ISP2, avec des zones d'inhibition allant de 13,5 mm à 60,5 mm. Ainsi, la quantité de biomasse était deux fois plus élevée dans l'ISP2 modifié. L'effet des différentes sources de carbone et d'azote sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *S. ayarius* sp. S115 a révélé la biomasse et les activités antibactériennes les plus élevées lors de l'utilisation du glucose et du tryptone dans l'ISP2 modifié alors que, le glycérol et l'extrait de levure ont été trouvés comme des sources de carbone et d'azote optimales dans l'ISP2.

Les résultats obtenus constituent une justification scientifique de l'usage traditionnel de la plante étudiée et confirment la pertinence des remèdes traditionnels dans le traitement de nombreuses maladies. Ils sont encourageants mais ne constituent qu'une première étape dans la recherche de substances biologiquement actives. Il serait par conséquent intéressant de continuer cette étude dans le but :

- Réaliser une caractérisation par LC-MS/MS des extraits des graines de *Peganum harmala* L. ;
- Isoler les molécules responsables des différentes activités biologiques de cette plante, afin de détecter leurs modes d'action et les interactions éventuelles entre elles et de confirmer ou d'infirmer les activités attribuées à cette plante ;
- Étudier la toxicité des molécules purifiées sur différents modèles biologiques, afin de prévenir tout effet secondaire indésirable ;
- Élargir le panel des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* afin de mettre en évidence d'autres activités anticancéreuse, antidiabétique, anti-inflammatoire ou autres ;
- Étudier le mécanisme d'activité antibactérienne d'un composé peut être intéressante pour surmonter le problème de la résistance par l'association avec les antibiotiques d'actinomycètes ;
- Étudier l'ajout de la poudre végétale dans la composition d'autres milieux de culture pour favoriser la production de métabolites secondaires.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

Abbas, M.W., Hussain, M., Qamar M., Ali, S., Shafiq, Z., Wilairatana, P., and Mubarak M.S. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Peganum harmala* extracts: an *in vitro* and *in vivo* study. *Molecules*, 26(19), 1-21.

Abdel-Razek, A.S., El-Naggar, M.E., Allam, A., Morsy, O.M., and Othman, S.I. (2020). Microbial natural products in drug discovery. *Processes*, 8(4), 1-19.

Adnan, M., Bibi, R., Mussarat, S., Tariq, A., and Shinwari, Z.K. (2014). Ethnomedicinal and phytochemical review of Pakistani medicinal plants used as antibacterial agents against *Escherichia coli*. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 13(1), 1-18.

Aissani, F. (2021). Caractérisation phytochimique, valorisation biologique et toxicologique des différents extraits d'une espèce Algérienne *Sonchus oleraceus* L. Thèse de Doctorat. Université 8 Mai 1945, Guelma-Algérie, 195 p.

Ait Abderrahim L., Taïbi K., and Ait Abderrahim C. (2019). Assessment of the antimicrobial and antioxidant activities of *Ziziphus lotus* and *Peganum harmala*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 43(2), 409-414.

Al Naser, O. (2018). Effet des conditions environnementales sur les caractéristiques morpho-physiologiques et la teneur en métabolites secondaires chez *Inula montana*. Thèse de Doctorat. Université d'Avignon, Marseille, France, 179 p.

Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y. M., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., and Li, A. (2022). *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1-21.

Al-Harrasi, A., Behl, T., Upadhyay, T., Chigurupati, S., Bhatt, S., Sehgal, A., Singh, S., Sharma, N., Vijayabala, S., Palanimuthu, R.V., Das, S., Kaur, R., Aleya, L., and Bungau, S. (2022). Targeting natural products against SARS-CoV-2. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(28), 42404-42432.

Ali, S.K., Hamed, A.R., Soltan, M.M., Hegazy, U.M., Elgorashi, E.E., El-Garf, I.A., and Hussein, A.A. (2013). *In-vitro* evaluation of selected Egyptian traditional herbal medicines for treatment of Alzheimer disease. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 1-10.

Al-shaibani, M.M., Radin Mohamed, R.M.S., Sidik, N.M., Ali El Enshasy, H., Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlaf, N.A., and Mohamad Zin, N. (2021). Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from Phylum Actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules*, 26(15), 1-22.

Amin, D.H., Tolba, S., Abolmaaty, A., Abdallah, N.A., and Wellington, E.M. (2017). Phylogenetic and antimicrobial characteristics of a novel *Streptomyces* sp. Ru87 isolated from Egyptian soil. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 2524-2541.

Aniszewski, T. (2007). Definition, Typology and Occurrence of Alkaloids. In *Alkaloids - Secrets of Life*. Ed. Elsevier, Amsterdam, pp. 1-59.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I., and Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12(7), 1496-1547.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., and Karademir, S.E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(26), 7970-7981.

Arshad, N., Zitterl-Eglseer, K., Hasnain, S., and Hess, M. (2008). Effect of *Peganum harmala* or its β -carboline alkaloids on certain antibiotic resistant strains of bacteria and protozoa from poultry. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(11), 1533-1538.

Aryal, S., Neupane, L., Adhikari, R., Regmi, B., Koirala, N., and Joshi, D.R. (2021). Novel *Streptomyces* Sp. reported in 2018: a meta-analysis. *Anti-Infective Agents*, 19(5), 2-13.

Asgarpanah, J., and Ramezanloo, F. (2012). Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *African. Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 6(22), 1573-1580.

Astulla, A., Zaima, K., Matsuno, Y., Hirasawa, Y., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Zaini, N.C., and Morita, H. (2008). Alkaloids from the seeds of *Peganum harmala* showing antiplasmodial and vasorelaxant activities. *Journal of Natural Medicines*, 62, 470-472.

Atrooz, O.M., Wietrzyk, J., Filip-Psurska, B., Al- Rawashdeh I., Soub M., and Abukhalil M.H. (2018). Antiproliferative, Antioxidant, and Antibacterial activities of crude plant extracts of *Asphodeline Lutea* L. and *Peganum harmala* L. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(11), 148-167.

Atta, E. M., Mohamed, N.H., and Abdelgawad, A.A.M. (2017). Antioxidants: an Overview on the Natural and Synthetic Types. *European Chemical Bulletin*, 6(8), 365-375.

Ayari, A., Morakchi, H., and Kirane, G.D. (2012). Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. *African Journal of Biotechnology*, 11(2), 305–311.

Ayari, A., Morakchi, H., and Kirane-Gacemi D. (2016). Evaluation of antifungal activity of novel marine actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. *African Journal of Microbiology Research*, 10(6), 156–171.

Baghiani, A., Djarmouni, M., Boumerfeg, S., Trabsa, H., Charef, N., Khennouf, S., and Arrar, L. (2012). Xanthine oxidase inhibition and antioxidant effects of *Peganum harmala* seed extracts. *European Journal of Medicinal Plants*, 2(1), 42-56.

Bahmani, M., Rafieian-Kopaei, M., Eftekhari, Z., Banihabib, E. K., Hajigholizadeh, G. H., Bahmani, F., Azadzadeh, J., Abdollahi, R., Kheyri, A., Sotoudeh, A., Karamati, S.A., and Jelodari, M. (2013). Evaluating the anti-leech effects of methanolic extracts of *Peganum harmala* L. and *Olea europaea* L. on *Limnatis nilotica*. *World's Veterinary Journal*, 3(2), 33-37.

Bammou, M., Bouhlali, E.D.T., Sellam, K., El-Rhaffari, L., Ibijbijen, J., and Nassiri, L. (2022). Évaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits aqueux des feuilles et des fleurs de *Bituminaria bituminosa* (L.) Stirton. *Phytothérapie*, 20(1), 1-8.

Behidj-Benyounes, N., Dahmene, T., Allouche, N., and Laddad, A. (2014). Phytochemical, antibacterial and antifungal activities of alkaloids extracted from *Peganum harmala* (Linn.) seeds of south of Algeria. *Asian Journal of Chemistry*, 26(10), 2960-2964.

Bekdash, R.A. (2021). The cholinergic system, the adrenergic system and the neuropathology of Alzheimer's disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1-18.

- Bekiri, S., Idder-Ighili, H., and Omar Guezoul, M.A. (2023). Ovicidal Activity and Phytochemical Analysis of some Spontaneous Plants Extracts Against *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) Lepidoptera: *Pyralidae*. *Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences*, 13(1), 113-122.
- Beldi, H. (2021). Influence des facteurs écologiques sur l'accumulation des métabolites secondaires chez *Aristolochia longa* L. et *Capparis spinosa* L. Thèse de Doctorat. Université Abdelhafid Boussouf, Mila-Algérie, 188 p.
- Benarous, K., Bombarda, I., Iriepa, I., Moraleda, I., Gaetan, H., Linani, A., Tahri, D., Sebaa, M., and Yousfi, M. (2015). Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *In silico* and *in vitro* studies. *Bioorganic chemistry*, 62, 1-7.
- Bhakyashree, K., and Kannabiran, K. (2020). Actinomycetes mediated targeting of drug resistant *MRSA* pathogens. *Journal of King Saud University – Science*, 32(1), 260–264.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Bouali, H., Hamza, K., Bouras, N., Aouiche, A., Meklat, A., Mokrane, S., Hamza, K., and Sabaou, N. (2017). Effet de milieux de culture sur la croissance et la production de chloramphenicol chez deux souches de *Saccharothrix* sp. PAL 54 ET PAL 42 isolées d'un sol de la palmeraie de ghardaïa. *Algerian Journal of Arid Environment*, 7(1), 71-83.
- Bouchoukh, I., Hazmoune, T., Boudelaa, M., Bensouici, C., and Zellagui, A. (2019). Anticholinesterase and antioxidant activities of foliar extract from a tropical species: *Psidium guajava* L. (*Myrtaceae*) grown in Algeria. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 32(3), 160-167.
- Boullard, B. (2001). *Plantes médicinales du monde : réalités et croyances*. Ed. ESTEM, Paris, 636 p.
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N.S., Sanoudou, D., Bezard, E., Dehay, B., and Tsarbopoulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progress in neurobiology*, 155, 171-193.

- Bournine, L., Bensalem, S., Fatmi, S., Bedjou, F., Mathieu, V., Iguer-Ouada, M., Kiss, R., and Duez, P. (2016). Evaluation of the cytotoxic and cytostatic activities of alkaloid extracts from different parts of *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae). *European Journal of Integrative Medicine*, 9, 91-96.
- Bouziane, N. (2012). Toxicité comparée des extraits d'Euphorbia guyoniana Boiss. & Reut. (Euphorbiaceae) et de *Peganum harmala* L. (Zygophyllaceae) récoltés au Sahara Septentrional Est algérien sur les larves et les adultes de *Schistocerca gregaria* (Forskål, 1775). Mémoire de Magister, Université Kasdi Merbah, Ouregla-Algérie, 72 p.
- Brejyeh, Z., and Karaman, R. (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: Causes and treatment. *Molecules*, 25(24), 1-28.
- Bukhari, N., Choi, J.H., Jeon, C.W., Park, H.W., Kim, W.H., Khan, M.A., and Leet, S.H. (2008). Phytochemical studies of the alkaloids from *Peganum harmala*. *Applied Chemistry*, 12(1), 101-104.
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z. and Xu, A. (2007). β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Current Medicinal Chemistry*, 14(4), 479-500.
- Chater, K.F. (2016). Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research*, 5, 1-16.
- Chen, Z.R., Huang, J.B., Yang, S.L., and Hong, F. F. (2022). Role of cholinergic signaling in Alzheimer's disease. *Molecules*, 27(6), 1-23.
- Cruz, R., Arias, M.E., and Soliveri, J. (1999). Nutritional requirements for the production of pyrazoloisoquinolinone antibiotics by *Streptomyces griseocarneus* NCIMB 40447. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(1), 115-119.
- Darabpour, E., Bavi, A.P., Motamedi, H., and Nejad, S.M.S. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI journal*, 10, 252-263.
- De Boer, D., Nguyen, N., Mao, J., Moore, J., and Sorin, E.J. (2021). A comprehensive review of cholinesterase modeling and simulation. *Biomolecules*, 11(4), 1-35.
- Dehmlow, E. V., Guntenhöner, M., and Van Ree, T. (1999). A novel alkaloid from *Fluggea virosa*: 14, 15-epoxynorsecurinine. *Phytochemistry*, 52(8), 1715-1716.

Demain, A.L., and Dijkhuizen L. (2006). Ecology and industrial microbiology. *Current Opinion Microbiology*, 9(3), 237–239.

Dhawan, V. (2014). Reactive Oxygen and Nitrogen Species: General Considerations. In *Studies on Respiratory Disorders*. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice. Ed. Humana Press, New York, NY, USA, pp. 27–47.

Dinis, T.C., Madeira, V.M., and Almeida, L.M. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(1), 161-169.

Djeridane, A., Yousfi, M., Brunel, J.M., Stocker, P. (2010). Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the *in vitro* antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606.

Dube, A., Misra, P., Khaliq, T., Tiwari, S., Kumar, N., and Narender, T. (2011). Therapeutic potential of Harmala (*Peganum harmala* L.) seeds with an array of pharmacological activities. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention*. Ed. Elsevier, USA, pp. 601-609.

Edziri, H., Marzouk, B., Mabrouk, H., Garreb, M., Douki, W., Mahjoub, A., Verschaeve, L., Najjar, F., and Mastouri M. (2018). Phytochemical screening, butyrylcholinesterase inhibitory activity and anti-inflammatory effect of some Tunisian medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 114, 84-88.

Edziri, H., Mastouri, M., Mahjoub, M. A., Patrich, G., Matieu, M., Ammar, S., Ali, S.M., Laurent, G., Zin, M., and Aouni, M. (2010). Antibacterial, antiviral and antioxidant activities of aerial part extracts of *Peganum harmala* L. grown in Tunisia. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 92(7), 1283-1292.

Elansary, H.O., Szopa, A., Kubica, P., Ekiert, H., Al-Mana, F.A., and El-Shafei A.A. (2020). Polyphenols of *Frangula alnus* and *Peganum harmala* leaves and associated biological activities. *Plants*, 9(9), 1-15.

El-Enshasy, H.A., Mohamed, N.A., Farid; M.A., and El-Diwany, A.I. (2008). Improvement of erythromycin production by *Saccharopolyspora erythraea* in molasses based medium through cultivation medium optimization. *Bioresource Technology*, 99(10), 4263-4268.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., and Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.

El-Shanshoury, A.E.R., Metwally, A.M., Sabha, M.E., and Saba, H.A. (2022). Biocontrol of *Aspergillus flavus* producing Aflatoxin B1 by *Streptomyces exfoliatus*. *Egyptian Journal of Botany*, 62(2), 457–473.

Farouk, L., Laroubi, A., Aboufatima, R., Benharref, A., and Chait, A. (2008). Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: possible mechanisms involved. *Journal of ethnopharmacology*, 115(3), 449-454.

Fathiazad, F., Azarmi, Y., and Khodaie, L. (2006). Pharmacological effects of *Peganum harmala* seeds extract on isolated rat uterus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(2), 81-86.

Favier, A. (2003). Le stress oxydant. Intérêt conceptuel et expérimental dans la compréhension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. *L'actualité chimique*, 108–115.

Fazeli-Dinan, M., Osia-Laghab, S.H., Amini, M., Davoodi, A., Nikookar, S.H., Yazdani Charati, J., Azadbakht, M., and Enayati, A. (2023). Phytochemical composition, toxicity, and repellent effects of medicinal plants *Peganum harmala*, *Pterocarya fraxinifolia*, and *Tanacetum parthenium* extracts against *Sitophilus oryzae* L. *Toxin Reviews*, 42(2), 548-558.

Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Mehdi, R.B.A., Mellouli, L., and Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Research in Microbiology*, 156(3), 341-347.

Gazel, M., Hemmati, C., Bhat, A.I., and Rao, G.P. (2023). Update on phytoplasma diseases associated with medicinal plants and spices in Asian Countries. In *Phytoplasma Diseases of Major Crops, Trees, and Weeds*. Ed. Academic Press, New Delhi, pp. 233-263.

Gregory, J., Vengalasetti, Y.V., Bredesen, D.E., and Rao, R.V. (2021). Neuroprotective herbs for the management of Alzheimer's disease. *Biomolecules*, 11(4), 1-19.

- Guergour, H. (2018). Etude des aspects morphologiques, phytochimiques et pharmacotoxicologiques de la plante *Peganum harmala*. Thèse de Doctorat. Université Ferhat Abbas, Sétif-Algérie, 144 p.
- Guergour, H., Allouni, R.R., and Bouzidi, A. (2018). A: phytochemical screening, antioxidant activity of the various extracts from *Peganum harmala* (Zygophyllaceae). *Journal for Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Chemistry, Pharmaceutical Sciences And Computational Chemistry*, 10(3), 146-150.
- Gülçin, İ. (2010). Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innovative food science and emerging technologies*, 11(1), 210-218.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of toxicology*, 94(3), 651-715.
- Hamden, K., Masmoudi, H., Ellouz, F., ElFeki, A., and Carreau, S. (2007). Protective effects of *Peganum harmala* extracts on thiourea-induced diseases in adult male rat. *Journal of environmental biology*, 29(1), 73-77.
- Hammiche, V., and Merad, R., (1997). *Peganum harmala* L., International Programme on Chemical Safety Poinsons Information Monograph 402. Ed. MO Rambourg Schepens.
- Harborne, J.B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. *In Methods in Plant Biochemistry: Volume 1 Plant Phenolics*. Ed. Academic Press, London, pp. 1-28.
- Hassani, L.I., and Hermas, J. (2008). Effets de l'alimentation en *Peganum harmala* L.(Zygophyllaceae) sur le tube digestif du criquet pèlerin *Schistocerca gregaria* Forsk.(Orthoptera, Acrididae). *Zoologica baetica*, 19, 71-84.
- Herraiz, T., González, D., Ancín-Azpilicueta, C., Arán, V.J., and Guillén, H. (2010). β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food and Chemical Toxicology*, 48(3), 839-845.
- Hopwood, D.A. (2019). Highlights of *Streptomyces* genetics. *Heredity*, 123(1), 23-32.
- Ilic', S.B., Konstantinovic', S.S., Savic', D.Š.S., Veljkovic, V.B., and Gojgic'-Cvijovic, V. (2010). The impact of Schiff bases on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. *Medicinal Chemistry Research*, 19 (7), 690–697.

- Indiarto, R., Pranoto, Y., and Santoso, U. (2019). *In vitro* Antioxidant Activity and Profile of Polyphenol Compounds Extracts and their Fractions on Cacao Beans. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 22(1), 34-44.
- Irato, P., and Santovito, G. (2021). Enzymatic and non-enzymatic molecules with antioxidant function. *Antioxidants*, 10(4), 1-4.
- Jasiecki, J., Targońska, M., and Wasąg, B. (2021). The role of butyrylcholinesterase and iron in the regulation of cholinergic network and cognitive dysfunction in Alzheimer's disease pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1-14.
- Jbilou, R., Amri, H., Bouayad, N., Ghailani, N., Ennabili, A., and Sayah, F. (2008). Insecticidal effects of extracts of seven plant species on larval development, α -amylase activity and offspring production of *Tribolium castaneum* (Herbst)(Insecta: *Coleoptera: Tenebrionidae*). *Bioresource technology*, 99(5), 959-964.
- Júnior, S.D.C., de Oliveira Santos, J.V., and de Almeida Campos, L.A. (2018). Antibacterial and antibiofilm activities of quercetin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus* with resistance profile. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(5), 1948-1958.
- Kannaiyan, M., Manuel, V.N., Raja, V., Thambidurai, P., Mickymaray, S., and Thajuddin, N. (2012). Antimicrobial activity of the ethanolic and aqueous extracts of *Salacia chinensis* Linn. against human pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(1), 416-420.
- Karimi, A., Majlesi, M., and Rafieian-Kopaei, M. (2015). Herbal versus synthetic drugs; beliefs and facts. *Journal of nephro pharmacology*, 4(1), 27-30.
- Kartal, M., Altun, M.L., and Kurucu, S. (2003). HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31(2), 263-269.
- Kemassi, A., Boual, Z., Bouziane, N., Ould El Hadj-Khelil, A., and Ould El Hadj M.D. (2013). Biological activity of essential oils leaves from one Sahara plant : *Peganum harmala* L.(*Zygophyllaceae*) on the desert locust. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(8), 389-395.

- Kemel, H., Benguedouar, L., Boudjerda, D., Menadi, S., Cacan, E., and Sifour, M. (2024). Phytochemical profiling, cytotoxic, anti-migration, and anti-angiogenic potential of phenolic-rich fraction from *Peganum harmala*: *in vitro* and *in ovo* studies. *Medical Oncology*, 41(6), 1-12.
- Khadhr, M., Bousta, D., El-Hajaji, H., Lachkar, M., Barkai, H., Ibsouda Koraichi, S., and Boukhchina, S. (2017). Phytochemical screening, total phenolics and biological activities of Tunisian *Peganum harmala* seed extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 9(2), 32-39.
- Khan, N. A., Raina, A., Wagay, N.A., and Tantray, Y.R. (2017). Distribution, status, pharmacological, and traditional importance of *Peganum harmala* L. *International Journal of Advanced Research in Science, Engineering*, 6(8), 1887-1893.
- Khashimov, K.N., Telezhenetskaya, M.V., and Yunusov, S.Y. (1969). Desoxypeganine—A new alkaloid from *Peganum harmala*. *Chemistry of Natural Compounds*, 5, 381-382.
- Khlifi, D., Sghaier, R.M., Amouri, S., Laouini, D., Hamdi, M., and Bouajila, J. (2013). Composition and anti-oxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalpensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food and chemical toxicology*, 55, 202-208.
- Lamchouri, F., Zenzami, M., Jossang, A., Abdellatif, A., Israili, Z.H., and Lyoussi, B. (2013). Cytotoxicity of alkaloids isolated from *Peganum harmala* seeds. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 699-706.
- Lee, N., Hwang, S., Kim, J., Cho, S., Palsson, B., and Cho, B.K. (2020). Mini review : Genome mining approaches for the identification of secondary metabolite biosynthetic gene clusters in *Streptomyces*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 1548-1556.
- Leporatti, M.L., and Ghedira, K. (2009). Comparative analysis of medicinal plants used in traditional medicine in Italy and Tunisia. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 5(1), 1-8.
- Mahajna, S., Azab, M., Zaid, H., Farich, B., Battah, F., Mashner, S., and Saad, B. (2015). *In vitro* evaluations of cytotoxicity and anti-inflammatory effects of *Peganum harmala* seed

extracts in THP-1-derived macrophages. *European Journal of Medicinal Plants*, 5(2), 165-175.

Mahmoudian, M., Jalipour, H., and Salehian, P. (2002). Toxicity of *Peganum harmala*: review and a case report. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 1(1), 1-4.

Malik, M.N., Haq, I.U., Fatima, H., Ahmad, M., Naz, I., Mirza, B., and Kanwal, N. (2022). Bioprospecting *Dodonaea viscosa* Jacq.; a traditional medicinal plant for antioxidant, cytotoxic, antidiabetic and antimicrobial potential. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(3), 1-20.

Mamadalieva, N.Z., Ashour, M.L., and Mamedov, N.A. (2022). *Peganum harmala*: Phytochemistry, traditional uses, and biological activities. In *Biodiversity, Conservation and Sustainability in Asia*. Ed. Springer, Cham, Switzerland, pp. 721-744.

Marco, G.J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45(9), 594-598.

Mars, B. (2009). *The Desktop Guide to Herbal Medicine*. Publisher Read How You Want, 492 p.

Martemucci, G., Costagliola, C., Mariano, M., D'andrea, L., Napolitano, P., and D'Alessandro, A.G. (2022). Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2(2), 48-78.

Mayad, E., Hassani, L.M.I., Ferji, Z., Chebli, B., and El-Hadek, M. (2013). Quantitative and qualitative analysis by HPLC of major *Peganum harmala* alkaloids at different stages of development. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(11), 104-111.

McGirr, S., Venegas, C., and Swaminathan, A. (2020). Alzheimer's disease: A brief review. *Journal of Experimental Neurology*, 1(3), 89-98.

Mehdi, R.B.A., Sioud, S., Ben-Fguira, L.F., Bejar, S., and Melloulli, L. (2006). Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochemistry*, 41(7), 1506-1513.

Mirzaie, M., Nosratabadi, S.J., Derakhshanfar, A., and Sharifi, I. (2007). Antileishmanial activity of *Peganum harmala* extract on the *in vitro* growth of *Leishmania major* promastigotes in comparison to a trivalent antimony drug. *Veterinarski arhiv*, 77(4), 365-375.

Moradi, M.T., Karimi, A., Rafieian-Kopaei, M., and Fotouhi, F. (2017). *In vitro* antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microbial pathogenesis*, 110, 42-49.

Morsy, M.H.E., Nabil, Z.I., Darwish, S.T., Al-Eisa, R.A., and Mehana, A.E. (2023). Anti-Diabetic and Anti-Adipogenic Effect of Harmine in High-Fat-Diet-Induced Diabetes in Mice. *Life*, 13(8), 1-28.

Moshiri, M., Etemad, L., Javidi, S., and Alizadeh, A. (2013). *Peganum harmala* intoxication, a case report. *Avicenna journal of phytomedicine*, 3(3), 288-292.

Müller, L., Gnoyke, S., Popken, A.M., and Böhm, V. (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Science and Technology*, 43(6), 992-999.

Nenaah, G. (2010). Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. *Fitoterapia*, 81(7), 779-782.

Nicault, M., Zaiter, A., Dumarcay, S., Chaimbault, P., Gelhaye, E., Leblond, P., and Bontemps, C. (2021). Elicitation of antimicrobial active compounds by *Streptomyces*-fungus co-cultures. *Microorganisms*, 9(1), 1-13.

Nwidu, L.L., Elmorsy, E., Thornton, J., Wijamunige, B., Wijesekara, A., Tarbox, R., Warren, A., and Carter, W.G. (2017). Anti-acetylcholinesterase activity and antioxidant properties of extracts and fractions of *Carpolobia lutea*. *Pharmaceutical biology*, 55(1), 1875-1883.

Oskay, M., Tamer, A.U., and Karaboz, I. (2010). Isolation and screening for antimicrobial activities of culturable mesophilic *Streptomyces* strains from North Cyprus soils. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19(2), 154-163.

Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, 44(6), 307-315.

Ozenda, P. (1977). Flore du Sahara. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), 322 p.

Pacios-Michelena, S., Aguilar Gonzalez, C.N., Alvarez-Perez, O.B., Rodriguez-Herrera, R., Chávez-González, M., Arredondo Valdes, R., Ascasio Valdés, J.A., Govia Salas, M., and

Ilyina, A. (2021). Application of *Streptomyces* antimicrobial compounds for the control of phytopathogens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5, 1-13.

Pandey, B.P., Pradhan, S.P., Adhikari, K., and Shrestha, R.K. (2021). Screening and molecular identification of *Streptomyces* species isolated from high altitude soil of Nepal. *Korean Journal of Microbiology*, 57(3), 174–182.

Paris, R.R et Moyse. H. (1976). Précis de matière médicale-Tome1. Ed. Masson, Paris, 419 p.

Parsons, W.T., and Cuthbertson, E.G. (1992). Noxious Weeds of Australia. Ed. Inkata Press, Melbourne, 692 p.

Perez Gutierrez, R.M., Flores Cotera, L.B., and Gonzalez, A.M.N. (2012). Evaluation of the antioxidant and anti-glycation effects of the hexane extract from *Piper auritum* leaves *in vitro* and beneficial activity on oxidative stress and advanced glycation end-product-mediated renal injury in streptozotocin-treated diabetic rats. *Molecules*, 17(10), 11897-11919.

Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., and Fiedler, H.P. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *Journal of biotechnology*, 80(2), 135-142.

Poprac, P., Jomova, K., Simunkova, M., Kollar, V., Rhodes, C.J., and Valko, M. (2017). Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends in pharmacological sciences*, 38(7), 592-607.

Preedy, V.R., Watson, R.R., and Patel, V.B. (2011). Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention. Ed. Academic Press, 1226 p.

Quézel, P., and Santa, S. (1963). Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales. Ed. Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), 600 p.

Quinn, G.A., Banat, A.M., Abdelhameed, A.M., and Banat, M.I. (2020). *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *Journal of Medical Microbiology*, 69(8), 1040–1048.

Radjah, A., Chorfi, H., and Bouatrous Y. (2019). STAGE OF DEVELOPMENT AND SOLVENT EFFECTS ON PHYTOCHEMISTRY AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THREE ALGERIAN PLANTS. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*, 26(2), 91-99.

- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*, 2(2), 219-236.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- Reddy, S.H., Al-Weheibi, A., Al-Shekaili, H., and Al-Naabi, R. (2017). Phytochemical evaluation and antioxidant assay of ethanolic extracts of traditional medicinal plants (*Ferula assafoetida*, *Saussurea costus*, *Peganum harmala*) in Oman. *International Journal of Phytomedicine*, 9(1), 132-137.
- Roché, C. (1991). African rue (*Peganum harmala* L.). In *Weeds*, A Pacific Northwest Extension Publication, Washington State University Cooperative Extension, Oregon State University Extension Service, University of Idaho Cooperative Extension System, USDA, PNW369.
- Saeedeh, F., Oryan, S., Ahmadi, R., and Eidi, A. (2022). Evaluation of chemical components, anti-oxidant properties, and lethal toxicity of alkaloids extracted from espond (*Peganum harmala*). *Journal of Applied Biological Sciences*, 16(2), 257-265.
- Salwan, R., and Sharma, V. (2020). Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, 231, 1-18.
- Sassoui, D. (2016). Etude ethnobotanique, phytochimique, histologique et activité antidépressive de *Portulaca oleracea* L. et *Peganum harmala* L. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar, Annaba-Algérie, 134 p.
- Sassoui, D., Seridi, R., Azin, K., and Usai, M. (2015). Evaluation of phytochemical constituents by GC-MS and antidepressant activity of *Peganum harmala* L. seeds extract. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5(12), 971-974.
- Schlimpert, S., and Elliot, M.A. (2023). The Best of Both Worlds—*Streptomyces coelicolor* and *Streptomyces venezuelae* as Model Species for Studying Antibiotic Production and Bacterial Multicellular Development. *Journal of Bacteriology*, 205(7), 1-16.
- Sebak, M., Saafan, A.E., Abdelghani, S., Bakir, W., Moawad, A.S., and El-Gendy, A.O. (2021). Isolation and optimized production of putative antimicrobial compounds from

Egyptian soil isolate *Streptomyces* sp. MS. 10. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(8),1–12.

Senhaji, S., Lamchouri, F., Boulfia, M., Lachkar, N., Bouabid, K., and Toufik, H. (2022). Mineral composition, content of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant and antibacterial activities of aqueous and organic extracts of the seeds of *Peganum harmala* L. *South African Journal of Botany*, 147, 697-712.

Shaheen, G., Ashfaq, A., Shamim, T., Asif, H.M., Ali, A., Rehman, S. U., and Sumreen, L. (2022). Antioxidant, Antimicrobial, Phytochemical and FTIR Analysis of *Peganum harmala* (Fruit) Ethanolic Extract From Cholistan Desert, Pakistan. *Dose-Response*, 20(3), 1-7.

Sharma, A., Sharma, A., Wahengbam, S., Cooper, R., Singh, H., and Bhardwaj, G. (2022). Overview of Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacology of *Peganum Harmala* L. *Frontiers in Natural Product Chemistry*, 9, 95-124.

Sharma, V., Kaur, R., and Salwan, R. (2021). *Streptomyces* : host for refactoring of diverse bioactive secondary metabolites. *3 Biotech*, 11(7), 1-32.

Sheahan, M.C., and Chase, M.W. (1996). A phylogenetic analysis of *Zygophyllaceae* R.Br. based on morphological, anatomical and rbc L DNA sequence data. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 122(4), 279-300.

Shi, H., Noguchi, N., and Niki, E. (2001). Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods in enzymology*, 335, 157-166.

Shirling, E.B., and Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 16(3), 313–340.

Sies, H. (2020). Oxidative stress: Concept and some practical aspects. *Antioxidants*, 9(9), 1-6.

Singh, A.B., Chaturvedi, J.P., Narender, T., and Srivastava, A.K. (2008). Preliminary studies on the hypoglycemic effect of *Peganum harmala* L. seeds ethanol extract on normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Indian Journal of clinical biochemistry*, 23, 391-393.

Smaoui, S. (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, France, 251 p.

Solfo, R.R. (1973). Etude d'une Plante Médicinale Malgache *Buxusma dagascarica* Bail et ses variétés. Ed. O.R.S.T.O.M.

Sujatha, P., Bapi Raju, K.V.V.S.N., and Ramana T. (2005). Studies on a new marine *streptomycete* BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against *methicillin resistant Staphylococcus aureus*. *Microbiology Research*, 160(2), 119-126.

Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., and Szlyk, E. (2008). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, 76(4), 899-905.

Taştekin, N.H. (2022). halk ilacı olarak kullanılan *peganum harmala* l. (üzerlik) tohumları üzerinde ilaç hammaddesi yönünden araştırmalar. PhD Thesis. Hacettepe University, Ankara, Turkey, 215 p.

Tlili, M.L. (2021). Contribution à la caractérisation structurale et biologique de quelques principes actifs extraits de deux plantes médicinales du Sahara Algérien *Salvia chudaiei* (Lamiaceae) et *Pergularia tomentosa* (Asclepiadeceae). Thèse de Doctorat. Université Kasdi Merbah, Ouargla-Algérie, 146 p.

Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., and Ulubelen, A. (2007). A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food chemistry*, 103(3), 816-822.

Toure, D. (2015). Etudes chimique et biologique des huiles essentielles de quatre plantes aromatiques médicinales de côte d'ivoire., Thèse de Doctorat, Université Felix Houphoet, Boigny, Abidjan-Côte d'Ivoire, 116 p.

Vigani, G., and Murgia, I. (2018). Iron-requiring enzymes in the spotlight of oxygen. *Trends in plant science*, 23(10), 874-882.

Vijayakumar, R., Selvam, K.P., Muthukumar, C., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., and Saravanamuthu, R. (2021). Antimicrobial potentiality of a halophilic strain of *Streptomyces* sp. VPTSA18 isolated from the saltpan environment of Vedaranyam, India. *Annals of Microbiology*, 62, 1039–1047.

Voelker, F., and Altaba, S. (2001). Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, 147 (9), 2447–2459.

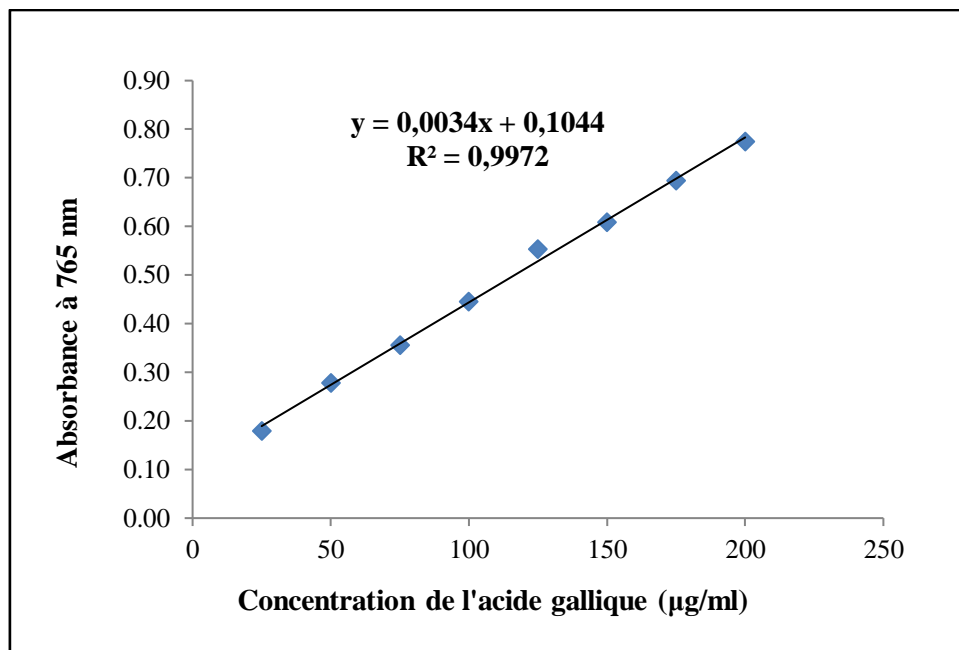
- Vona, R., Pallotta, L., Cappelletti, M., Severi, C., and Matarrese, P. (2021). The impact of oxidative stress in human pathology: Focus on gastrointestinal disorders. *Antioxidants*, 10(2), 1-26.
- Wang, C., Zhang, Z., Wang, Y., and He, X. (2016). Cytotoxic constituents and mechanism from *Peganum harmala*. *Chemistry and Biodiversity*, 13(7), 961-968.
- Wang, H., and Zhang, H. (2018). Reconsideration of anticholinesterase therapeutic strategies against Alzheimer's disease. *ACS chemical neuroscience*, 10(2), 852-862.
- Wang, K.B., Li, D.H., Bao, Y., Cao, F., Wang, W.J., Lin, C., Bin, W., Bai, J., Hupei, Y., Jing, Y.K., Yang, D., Linli, Z., and Hua, H.M. (2017). Structurally diverse alkaloids from the seeds of *Peganum harmala*. *Journal of natural products*, 80(2), 551-559.
- Wang, L., Ravichandran, V., Yin, Y., Yin, J., and Zhang, Y. (2019). Natural products from mammalian gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 37(5), 492-504.
- Watson, R.R., Patel V.B., and Preedy, V.R. (2011). Nuts and seeds in health and disease prevention. Ed. Elsevier, Burlington, 597 p.
- Weidner, S., Król, A., Karamać M. and Amarowicz, R. (2018). Phenolic compounds and the antioxidant properties in seeds of green-and yellow-podded bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *CYTA Journal of Food*, 16(1), 373-380.
- Yang, H.D., Kim, D.H., Lee, S.B., and Young, L.D. (2016). History of Alzheimer's disease. *Dementia and Neurocognitive Disorders*. 15(4):115-121.
- Yang, Y., Cheng, X., Liu, W., Chou, G., Wang, Z., and Wang, C. (2015). Potent AChE and BChE inhibitors isolated from seeds of *Peganum harmala* Linn by a bioassay-guided fractionation. *Journal of ethnopharmacology*, 168, 279-286.
- Yu, J., Liu, Q., Liu, Q., Liu, X., Sun, Q., Yan, J., Qi, X., and Fan, S. (2008). Effect of liquid culture requirements on antifungal antibiotic production by *Streptomyces rimosus* MY02. *Bioresource Technology*, 99(6), 2087-2091.
- Zargoosh, Z., Ghavam, M., Bacchetta, G., and Tavili, A. (2019). Effects of ecological factors on the antioxidant potential and total phenol content of *Scrophularia striata* Boiss. *Scientific Reports*, 9(1), 1-15.

Annexes

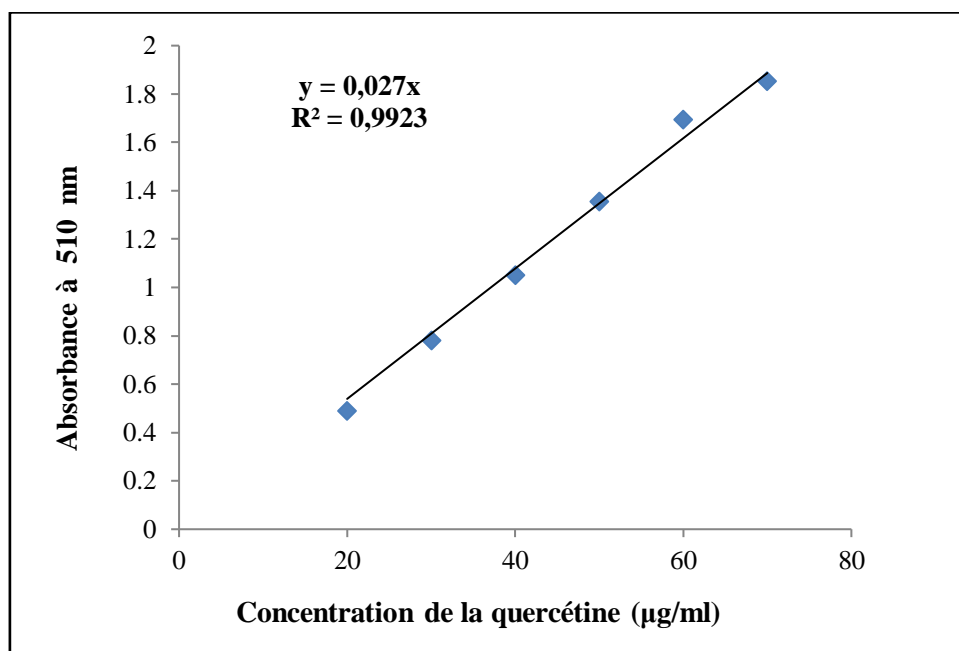
Annexes

Milieu ISP2	
Extrait de levure	4 g
Extrait de malt	10 g
Glucose	4 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2
Milieu caséine-amidon	
Amidon	10 g
Caséine	0,3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
KNO ₃	2 g
CaCO ₃	0,02 g
FeSO ₄ 7H ₂ O	0,01 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7,2

Annexe 1. Composition des milieux de culture.



Annexe 2. Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.



Annexe 3. Courbe d'étalonnage de la quercétine.

Productions

scientifiques



Antioxidant and Anticholinesterase Effects of Methanol Extract, And Consecutive Fractions of *Peganum harmala* L.

Amel Nait Marzoug^{a,b*}, Fadila Khaldi^{a,b}, Adel Ayari^{a,c}, Lynda Gali^d, Abdelhak Gheid^{b,e}

^aDepartment of Biology, Faculty of Sciences and Nature, University Mohamed Cherif Messaadia. B.P. 1553 Souk-Ahras 41000, Algeria

^bLaboratory of Sciences and Technology of Water and Environment, University Mohamed Cherif Messaadia. B.P. 1553 Souk-Ahras 41000, Algeria

^cLaboratory of Aquatic and Terrestrial Ecosystems, University Mohamed Cherif Messaadia. Souk-Ahras 41000, Algeria

^dBiotechnology Research Center, Constantine 25000, Algeria

^eDepartment of Matter Sciences, Faculty of Science and Technology, University Mohamed Cherif Messaadia. Souk-Ahras 41000, Algeria.



CrossMark

Abstract

Peganum harmala L. is a medicinal plant growing in the region of Sidi Fredj of Souk Ahras city (Northeastern of Algeria), whose native populations commonly used this plant to treat various health conditions and illnesses. Up to now, no previous study on the beneficial effects of *P. harmala* in the Souk Ahras region has been conducted. Therefore, the present study aimed to investigate the phenolic and flavonoid composition, as well as the antioxidant activities of the methanol extract and its three fractions: chloroform, ethyl acetate and butanol from seeds of *P. harmala* using eight different methods. The inhibitory effect of the extracts against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) was also determined. The results showed that the ethyl acetate fraction contained the highest amounts of total phenolic and total flavonoid ($237.23 \pm 1.06 \mu\text{g GAE/mg}$ and $82.58 \pm 0.03 \mu\text{g QE/mg}$, respectively). Important antioxidant activity was exerted by the extracts, especially the ethyl acetate fraction, which was the most effective. However, a weak antioxidant activity in Ferrous ions chelation was observed for all extracts with $>800 \mu\text{g/mL}$. The samples showed also a strong inhibitory effect against AChE and BChE, the chloroform fraction was the most potent with IC_{50} values of $14.69 \pm 0.10 \mu\text{g/mL}$ against AChE and $7.36 \pm 0.77 \mu\text{g/mL}$ against BChE comparable to that of galantamine. Conclusively, the obtained results proved the beneficial antioxidant and anticholinesterase activities of *P. harmala*-derived bioactive molecules.

Keywords: *Peganum harmala* L.; antioxidant & anticholinesterase effects; phenolic compounds; flavonoids.

1-Introduction

Oxidative stress associated with excessive production of reactive oxygen species (ROS) results mainly in the induction of various pathogenesis and diseases as evidenced by severe oxidative injuries to numerous biological functions of the body [1]. In addition, the progression of oxidative stress underlies neurodegenerative disorders, including Alzheimer's disease (AD) which is likely due to the aberrant deposition of accumulated amyloid β ($\text{A}\beta$) peptides and intracellular neurofibrillary tangle [2].

Aerobic organisms possess powerful enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems able to act effectively against ROS-inducing the damaging effects. Further, the exogenous antioxidants, like vitamins and the major bioactive molecules (e.g,

polyphenols, flavonoids, and carotenoids) derived from vegetables, cereals, and medicinal plants have been widely used by humans to enhance their immunity against pathogens [3]. Hence, many researchers have recently drawn great attention to the use of natural antioxidants as essential healthy alternatives instead of the commonly used synthetic antioxidants in food industries [4].

As reported, the bioactive substances (e.g, phenols, and flavonoids) derived mainly from plants exhibit a wide range of pharmacological effects and therapeutic benefits [5] against cancers, inflammation, and neurodegenerative pathology [6]. Indeed, most of the beneficial effects of these compounds are ascribed to their antioxidant properties [7]. Moreover, the cholinesterase

*Corresponding author e-mail: a.naitmarzoug@univ-soukahras.dz ; (Amel Nait Marzoug).

Receive Date: 02 August 2022, Revise Date: 09 October 2022, Accept Date: 29 October 2022

DOI: 10.21608/EJCHEM.2022.151986.6663

©2023 National Information and Documentation Center (NIDOC)

(Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase) inhibitors, including only donepezil, rivastigmine and galantamine leading to increase brain levels of acetylcholine (a neurotransmitter involved in cholinergic activity and cognitive function) have been recently approved for the treatment of Alzheimer's disease [8,9], while their side effects limit their use [10]. Consequently, the use of new promising drugs originating from natural plant products becomes of the highest priority. In this context, the biological effects of plants usually used for traditional medicine have been well-documented as memory enhancers [11].

The natural plant extracts containing bioactive compounds have proved to effectively inhibit the enzymatic activity of AChE and BChE [12]. The natural plant compounds can, on one hand, interact with the active site and, as a result, lead to inhibit the activity of the specific enzyme [13]. *Peganum harmala* L. known as Harmal, Syrian rue, or wild rue is an herbaceous plant of the family *Zygophyllaceae* [14], and a widely distributed plant in North Africa, and Central Asia, the Middle East, Pakistan, and India [15].

Its seeds and the aerial parts have been used in traditional medicine as an emmenagogue, abortifacient, analgesic, and anti-inflammatory agent

[16]. A previous study investigating the phytochemical composition of its seeds reported the presence of alkaloids, flavonoids, polysaccharides, and anthraquinones [17]. The plant exhibit a wide spectrum of pharmacological effects, including antifungal, antibacterial, antioxidant, antiviral, antidiabetic, insecticidal, antineoplastic, hepatoprotective, and cytotoxic properties [18].

Since there are no previous studies in this study area, the present study is, therefore, the first aimed to investigate the total bioactive components and the antioxidant and anticholinesterase activities of methanol extract/fractions from the seeds of *P. harmala* collected from the Sidi Fredj region of Souk Ahras city (Northeastern of Algeria).

2. Material and methods

2.1. Plant material

The seeds of *P. harmala* were collected in July 2019 during the flowering period from the region of Sidi Fredj located in the South-Eastern part of Souk Ahras city (North-East Algeria): 36° 0'58.94"N 8° 13'54.03"E and 544 m (latitude N/longitude E/altitude) (Figure 1). The samples were air-dried in the shade and transformed to a fine powder by an electric blender.

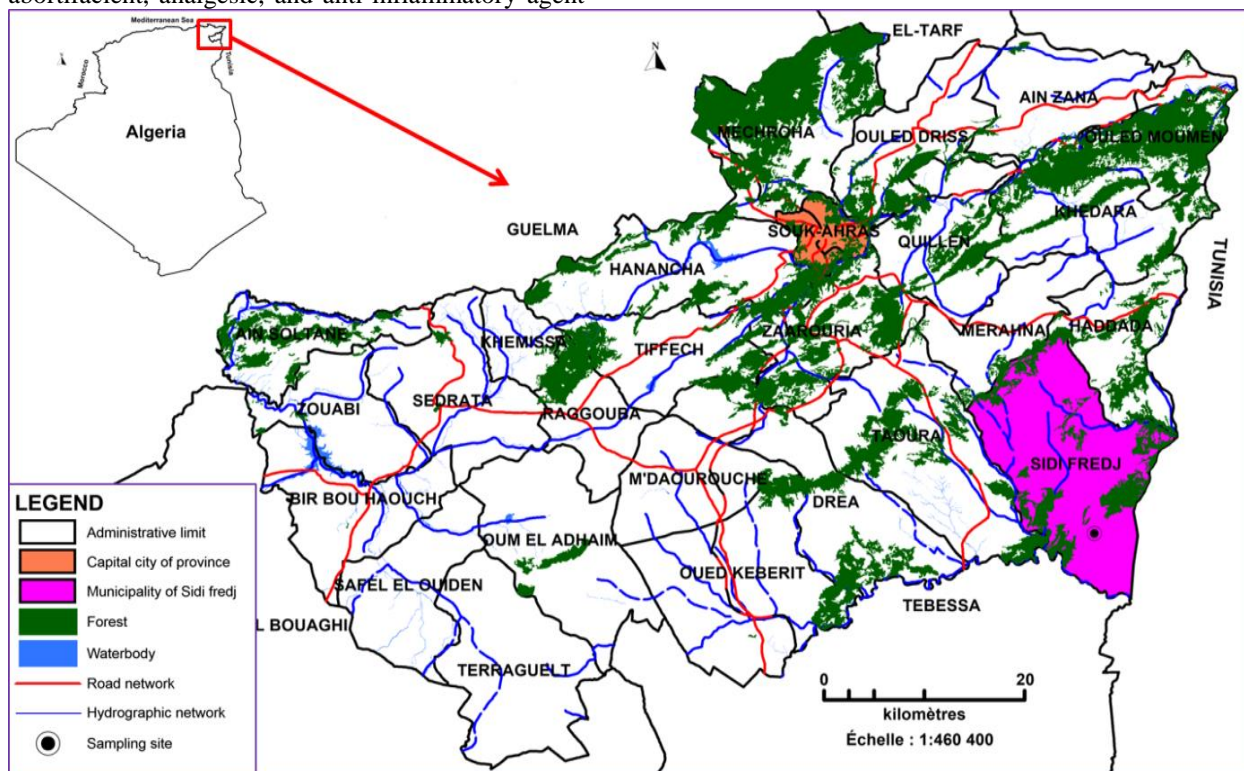


Figure 1. Geographical location of the study area (realized with Mapinfo Pro 12.0.2)

2.2. Preparation of extract/fractions

100 g of seeds powder were extracted in 500 ml of methanol /water (80:20, v/v) by maceration for 72h at room temperature under magnetic agitation. This experiment was performed three times with the renewal of the solvent. After filtration, the methanol was evaporated at 35 °C by a rotary evaporator to get the crude extract. The dried extract was afterward dissolved in distilled water and subjected to a liquid-liquid fractionation using increasing polarity solvents (chloroform, ethyl acetate and n-butanol). All fractions were concentrated under pressure in a rotary evaporator and kept at 4 °C until use. The yield of dried extracts was expressed as the ratio between the weights of obtained extract, and the plant powder and was determined using the following equation:

$$\% \text{ Yield: } (\text{Weight of dry extract} / \text{Weight of dry plant material}) \times 100$$

2.3. Quantification of total phenolic and total flavonoid contents

2.3.1. Total phenolic contents (TPC)

The content of total phenolic was determined in a 96-well microplate using Folin-Ciocalteu method as described by Müller et al. [19]. In brief, 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (1:10) and 75 µL of sodium carbonate (7.5%) were added to 20 µL of each extract (1 mg/ml). The microplate was incubated 2 h at room temperature in the obscurity. The absorbance was recorded at 765 nm. The results were expressed as µg of gallic acid equivalent per mg of extract (µg GAE/mg).

2.3.2. Total flavonoid contents (TFC)

The content of total flavonoid was estimated in a 96-well microplate using the aluminium nitrate method adopted from Topçu et al. [20]. In brief, 130 µL of methanol was added to 50 µL of each extract (1 mg/ml). After 40 min at room temperature, the absorbance was read at 415 nm. The results were expressed as µg quercetin equivalents per mg of extract (µg QE/mg).

2.4. Antioxidant activities

2.4.1. DPPH (Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical trapping activity

The free radical scavenging ability was established according to the method recorded by Aissani et al. [21]. In a 96-well microplate, 160 µL of the DPPH solution (0.1 mM) was added to 40 µL of each sample at various concentrations. After 30 min of incubation at room temperature in the obscurity, the absorbance was read at 517 nm using a multimode plate reader (EnSpire). Butylhydroxyanisole (BHA), butylhydroxytoluene (BHT) and α -Tocopherol were considered as

antioxidant standards. The inhibition percent was calculated as follows:

$$\text{Inhibition (\%)} = [(\text{Abs control} - \text{Abs sample}) / \text{Abs control}] \times 100 \quad (1)$$

The results were represented as IC₅₀ values (µg/mL) which corresponds to the concentration of 50% inhibition

2.4.2. ABTS (2,2'-azinobis (3-thylbenzothiazoline)-6-sulfonic) radical trapping activity

The anti-radical activity of extract/fractions against ABTS^{•+} radical was realised by the method of Khalfallah et al. [22]. The ABTS^{•+} solution was obtained by combining 7 mM of ABTS in water with 2.45 mM of potassium persulfate, stored in the obscurity at room temperature for 16h. The ABTS^{•+} solution was diluted in water to an absorbance of 0.7 at 734 nm. 160 µL of this solution was added to 40 µL of each sample in methanol at various concentrations. After 10 min of incubation, the absorbance was recorded at 734 nm. The inhibition percent was calculated by applying above formula (1). BHA and BHT were used as antioxidant standards.

2.4.3. Galvinoxyl radical (GOR) trapping activity

GOR scavenging assay was done according to the method of Shi et al. [23]. In brief, 160 µL of galvinoxyl (0.1 mM in methanol) was mixed with 40 µL of each sample at various concentrations. After 120 min of incubation at room temperature in the obscurity, the absorbance was read at 517 nm. The inhibition percent was calculated by applying above formula (1). BHA and BHT were used as standards.

2.4.4. Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC)

The cupric reducing antioxidant capacity was established according to the method reported by Apak et al. [24]. In a 96-well microplate, 50 µL of CuCl₂ (10 mM), 50 µL of 7.5 mM neocuproine, and 60 µL of ammonium acetate (1 M) were mixed with 40 µL of extract/fractions. After 1 h of incubation, the absorbance was recorded at 450 nm. BHA and BHT were used as standards. The results were represented as A_{0.5} values (µg/ml) referring to the concentration indicating 0.5 absorbances.

2.4.5. Reducing power activity

The reducing power of P. harmala extracts was assessed as indicated by Mamache et al. [25]. In brief, 40 µL of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6), and 50 µL of potassium ferricyanide (1%) were mixed with 10 µL of extract/fractions at various concentrations in the microplate. The mixture was incubated at 50°C for 20 min. Subsequently, 50 µL of trichloroacetic acid (10%), 40µL distilled water, and

10 μ L of ferric chloride solution (0.1%) were added. The absorbance was read at 700 nm. Ascorbic acid and α -tocopherol were used as antioxidant standards.

2.4.6. Phenanthroline activity

The phenanthroline assay was evaluated by the method of Szydłowska-Czerniak et al. [26]. In brief, 30 μ L O-phenanthroline (0.5% in methanol), 50 μ L FeCl₃ (0.2%), and 110 μ L of methanol were added to 10 μ L of extract/fractions at various concentrations. After 20 min of incubation at 30°C in the obscurity, the absorbance was read at 510 nm. BHA and BHT were used as antioxidant standards.

2.4.7. β -carotene bleaching activity

The antioxidant capacity of the plant extracts to inhibit lipid peroxidation by the system β -carotene/linoleic acid was issued using the method of Mouffouk et al. [27]. To prepare the solution 0.5 mg of β -carotene was dissolved in 1 ml of chloroform. This mixture was combined with 25 μ L of linoleic acid and 200 μ L of Tween 40 and the solvent was extracted under vacuum using a rotary evaporator then, 50 ml of H₂O₂ was added and the absorbance of the solution was adjusted to 0.8-0.9 at 470 nm. 160 μ L of this solution was added to 40 μ L of each sample at various concentrations in the microplate. The absorbance was read at 470 nm before and after incubation for 2 h at 50°C. BHA and BHT were used as antioxidant standards. The inhibition percent was calculated using the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = 1 - (A_{t=0} - A_{t=120} / A_{0t=0} - A_{0t=120}) \times 100$$

Where, A_{t=0} and A_{t=120} are the absorbances (470 nm) of the sample at 0 min and 120 min respectively. A_{0t=0} and A_{0t=120} represent the absorbances (470 nm) in the presence of positive control at 0 min and 120 min respectively.

2.4.8. Ferrous iron chelating activity

The metal chelating capacity of the extract/fractions was estimated as described by Saci et al. [28]. In a 96-well microplate, 40 μ L of methanol, 40 μ L of FeCl₂ (0.2 mM), and 40 μ L of each sample at various concentrations were mixed. Then, 80 μ L of Ferene (0.5 mM) was added. The mixture was incubated for 10 min at room temperature.

The absorbance was recorded at 593 nm. The inhibition percent was obtained using preceding equation (1). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was used as standard.

2.5. Anticholinesterase activity

The inhibition of AChE and BChE by the crude extract/fractions was established by the method developed by Gali and Bedjou [29] in a 96-well

microplate. In brief, 150 μ L of sodium phosphate buffer (100 mM, pH 8.0) was mixed with 10 μ L of the extract/fractions in methanol at different concentrations or galantamine (positive standard) and 20 μ L of AChE (5.32×10^{-3} U) or BChE (6.85×10^{-3} U) solution. After 15 min of incubation at 25°C, 10 μ L of 0.5 Mm DTNB [5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)] and 10 μ L of acetylthiocholine iodide (0.71 mM) or 10 μ L of butyrylthiocholine chloride (0.2 mM) were added to the mixture. The absorbance was measured at 412 nm in every 5 min for 15 min. The inhibition percent of AChE or BChE was measured against a blank (phosphate buffer and methanol) using the following equation:

$$\text{Inhibition (\%)} = (E - S) / E \times 100$$

Where, E is the activity of the enzyme without extract, and S is the activity of the enzyme in the presence of the extract.

2.6. Statistical analysis

The data were displayed as mean \pm standard deviation, with three replicates. The results were statistically tested by one-way ANOVA with Tukey's test using GraphPad Prism software (version 9), where *p* values < 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1. Extraction yield

As shown in Table 1, the methanol extract produced the highest yield, followed by the butanol fraction and the chloroform fraction, however the lowest yield was observed in the ethyl acetate fraction.

3.2. Total phenolic and total flavonoid contents

The contents of phenolic and flavonoid compounds were quantified in *P. harmala* crude extract and its fractions (Figure 2 & 3). The ethyl acetate fraction recorded the highest amount of total phenolic and total flavonoid (237.23 \pm 1.06 μ g GAE/mg and 82.58 \pm 0.03 μ g QE/mg, respectively), followed by the butanol fraction (197.23 \pm 0.29 μ g GAE/mg and 57.98 \pm 0.70 μ g QE/mg, respectively), and methanolic extract (144.97 \pm 0.34 μ g GAE/mg and 43.62 \pm 0.42 μ g QE/mg, respectively). The lowest amount (111.25 \pm 1.89 μ g GAE/mg and 22.36 \pm 0.07 μ g QE/mg, respectively) were found in chloroform fraction.

3.3. Antioxidant capacity

The antioxidant potential of the crude extract and the different fractions of *P. harmala* seeds was reported using eight different methods and the results are depicted in Table 2 as IC₅₀ and A_{0.5} values.

Table 1. Different characteristics of the crude extract and the different fractions of *P. harmala*

Extract/Fraction	Yield (%)	Aspect	Color
Methanol	27.13	Paste	Brownish
Chloroform	0.38	Viscous	Blueish

Ethyl acetate	0.16	Solid	Yellowish
Butanol	7.77	Solid	Brownish

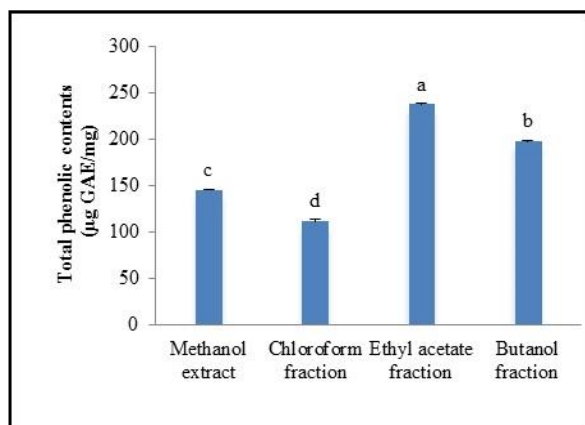


Figure 2. Total phenolic contents in the crude extract and the different fractions of *P. harmala*

a-d: Different superscript letters represent significant variation

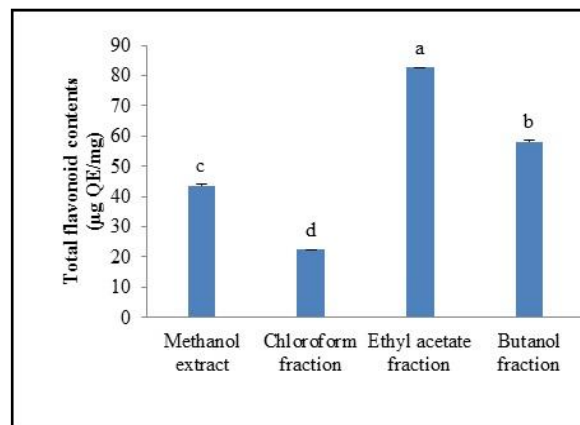


Figure 3. Total flavonoid contents in the crude extract and the different fractions of *P. harmala*

a-d: Different superscript letters represent significant variation

Table 2. Antioxidant activity of the crude extract and the different fractions of *P. harmala*

Extract/ Fraction	DPPH IC ₅₀ µg/mL	ABTS IC ₅₀ µg/mL	GOR IC ₅₀ µg/mL	Cuprac A _{0.5} µg/mL	Reducing Power A _{0.5} µg/mL	Phénanthro- line A _{0.5} µg/mL	β-carotene Bleaching IC ₅₀ µg/mL	Ferrous ion chelating IC ₅₀ µg/mL
Methanol	133.18±1.22 ^c	27.32±0.79 ^e	153.40±0.55 ^d	187.39±0.58 ^e	158.07±0.12 ^c	6.45±0.54 ^c	70.93±0.69 ^e	>800
Chloroform	187.57±0.87 ^f	35.02±0.57 ^f	305.59±0.41 ^e	110.49±0.51 ^c	89.61±0.90 ^c	5.73±0.95 ^c	34.45±1.52 ^c	>800
Ethyl acetate	92.02±1.30 ^c	10.22±0.26 ^c	45.93±0.75 ^c	90.57±0.84 ^b	87.83±0.56 ^c	3.78±0.64 ^b	27.21±0.99 ^b	>800
Butanol	108.36±0.83 ^d	19.91±0.96 ^d	47.03±0.93 ^c	123.03±0.35 ^d	129.58±0.62 ^d	5.95±0.82 ^c	40.32±0.56 ^d	>800
BHA	6.14±0.41 ^a	1.55±0.26 ^a	3.32±0.18 ^a	5.35±0.71 ^a	-	0.93±0.07 ^a	1.05±0.03 ^a	-
BHT	12.99±0.41 ^b	7.54±0.67 ^b	5.38±0.06 ^b	8.97.03±3.94 ^a	-	2.24±0.17 ^{ab}	0.91±0.01 ^a	-
α-Tocopherol	13.02±5.17 ^b	-	-	-	34.93±2.38 ^b	-	-	-
Ascorbic acid	-	-	-	-	6.77±1.15 ^a	-	-	-
EDTA	-	-	-	-	-	-	-	8.80±0.47

Data are expressed as means ± standard deviation of three measurements; Analysis of variance (ANOVA) revealed significant effect ($p < 0.05$); Different superscript letters represent significant variations

The scavenging potential measured by DPPH assay showed that the ethyl acetate fraction exhibited the highest activity (IC₅₀: 92.02±1.30 µg/mL), compared with the other extracts but lesser activity than that in BHA, BHT and α-Tocopherol (IC₅₀: 6.14±0.41, 12.99±0.41 and 13.02±5.17 µg/mL, respectively), followed by butanol fraction and methanolic extract (IC₅₀: 108.36±0.83 and 133.18±1.22 µg/mL, respectively), however the

Moreover, the results of Galvinoxyl radical (GOR) scavenging activity showed that the ethyl acetate and butanol fractions gives the highest activity with close IC₅₀ values (45.93±0.75 and 47.03±0.93 µg/mL, respectively) compared with the other extracts but lesser activity than that in BHA and BHT (IC₅₀: 3.32±0.18 and 5.38±0.06 µg/mL, respectively), followed by methanolic extract (IC₅₀: 153.40±0.55 µg/mL), however the chloroform

chloroform fraction showed a weak activity (IC₅₀: 187.57±0.87 µg/mL).

The scavenging capacity of ABTS also showed that the ethyl acetate fraction exhibited the greatest activity (IC₅₀: 10.22±0.26 µg/mL) among the extracts and closer to that in BHA and BHT (IC₅₀: 1.55±0.26 and 7.54±0.67 µg/mL, respectively), followed by butanol fraction (IC₅₀: 19.91±0.96 µg/mL), methanolic extract (IC₅₀: 27.32±0.79 µg/mL) and chloroform fraction (IC₅₀: 35.02±0.57 µg/mL). fraction exhibited a weak activity (IC₅₀: 305.59±0.41 µg/mL).

The antioxidant activity using CUPRAC assay of the extract and different fractions was investigated as shown in Table 2, among the extracts the greatest activity was observed in the ethyl acetate fraction (A_{0.5}: 90.57±0.84 µg/mL) but lesser activity than that in BHA and BHT (A_{0.5}: 5.35±0.71 and 8.97±3.94 µg/mL, respectively), followed by chloroform and

butanol fractions ($A_{0.5}$: 110.49±0.51 and 123.03±0.35 µg/mL, respectively), however the methanolic extract exhibited a weak activity ($A_{0.5}$: 187.39±0.58 µg/mL).

The results for reducing power assay showed that the ethyl acetate and chloroform fractions gives the highest activity with close $A_{0.5}$ values (87.83±0.56 and 89.61±0.90 µg/mL, respectively) compared with the other extracts and further to the ascorbic acid and α -Tocopherol ($A_{0.5}$: 6.77±1.15 and 34.93±2.38 µg/mL, respectively), followed by butanol fraction ($A_{0.5}$: 129.58±0.62 µg/mL), while the methanolic extract exhibited the low activity ($A_{0.5}$: 158.07±0.12 µg/mL).

The antioxidant potential employing phenanthroline assay of the tested extracts and positive standards are as follows: BHA (0.93±0.07 µg/mL), BHT (2.24±0.17 µg/mL), ethyl acetate extract (3.78±0.64 µg/mL), chloroform (5.73±0.95 µg/mL), butanol extract (5.95±0.82 µg/mL) and methanolic extract (6.45±0.54 µg/mL).

The obtained results in Table 3 for β -carotene bleaching assay showed that among the extracts the ethyl acetate fraction was the most effective (IC_{50} : 27.21±0.99 µg/mL), followed by chloroform fraction (IC_{50} : 34.45±1.52 µg/mL), butanol fraction (IC_{50} : 40.32±0.56 µg/mL) and methanolic extract (IC_{50} : 70.93±0.69 µg/mL), however none of the extracts exhibited higher activity than those of BHA or BHT.

Concerning the Ferrous ions chelating assay all extracts exhibited a weak activity at 800 µg/mL, compared with EDTA (IC_{50} : 8.80±0.47 µg/mL).

3.4. Anticholinesterase activity

The inhibitory effect of the methanol extract/fractions of *P. harmala* on AChE and BChE was tested *in vitro* and the results were reported in Table 3 as percentages of inhibition at two final concentrations and IC_{50} values.

Table 3. Anticholinesterase activity of the crude extract and the different fractions of *P. harmala*

Samples	AChE (% Inhibition)			BChE (% Inhibition)		
	100 µg/ml	200 µg/ml	IC_{50} (µg/ml)	100 µg/ml	200 µg/ml	IC_{50} (µg/ml)
Methanol	62.20±1.93	71.14±2.03	65.38±1.47 ^e	76.14±0.38	78.82±1.64	24.76±0.86 ^d
Chloroform	88.25±0.46	91.90±0.57	14.69±0.10 ^b	94.95±0.11	95.75±0.78	7.36±0.77 ^a
Ethyl acetate	81.31±0.51	86.15±0.64	24.57±0.78 ^c	88.94±1.18	93.84±0.40	12.14±1.10 ^b
Butanol	83.47±0.11	86.02±0.66	36.01±0.18 ^d	85.15±1.75	89.92±1.46	17.60±0.31 ^c
Galantamine	91.80±0.20	94.77±0.34	6.27±1.15 ^a	73.57±0.77	78.95±0.58	34.75±1.99 ^e

Data are expressed as means ± standard deviation of three measurements; Different superscript letters represent significant variations (Tukey test, $p < 0.05$)

The crude extract and all fractions showed a high potential for inhibiting AChE. The chloroform fraction was the most active against AChE with an IC_{50} of 14.69±0.10 µg/mL, and a similar value to the galantamine (IC_{50} : 6.27±1.15 µg/mL), followed by ethyl acetate fraction (IC_{50} : 24.57±0.78 µg/mL), butanol fractions (IC_{50} : 36.01±0.18 µg/mL) and methanolic extract (IC_{50} : 65.38±1.47 µg/mL). We can observe that the inhibition of BChE by methanol extract and its fractions was generally more effective than that for AChE. Further, the chloroform fraction exhibited the most significant activity against BChE with an IC_{50} of 7.36±0.77, followed by ethyl acetate fraction (IC_{50} : 12.14±1.10 µg/mL), butanol fraction (IC_{50} : 17.60±0.31 µg/mL) and methanolic extract

(IC_{50} : 24.76±0.86 µg/mL) showing better effect than the galanthamine (IC_{50} : 34.75±1.99 µg/mL).

4. Discussion

In this study, the extraction yields varied significantly depending on the parameters of liquid-liquid fractionation of polyphenols, the extraction solvent as well as the extraction method. These parameters directly influence the biological activities

of the final extracts [30]. A yield of 27.13% of the methanolic extract was close to that obtained by Atrooz et al. [15] and Rezzagui et al. [31] reporting an extraction yield equal to 19.9% and 20.18% respectively. Several previous studies have reported that the combination of water and organic solvent (methanol) provides relatively higher percentages of extractable compounds as compared to other solvents [32].

Furthermore, the bioactive phenolic compounds quantified in the methanolic extract and its subsequent fractions were better extracted by polar solvents, ethyl acetate, and butanol than solvents with low polarity, like chloroform. Our findings are in line with those of Bouchoukh et al. [33] who found the highest amounts of total phenolic and total flavonoid in the ethyl acetate fraction followed by the butanol fraction since the lowest value was obtained with the chloroform fraction. Additionally, the content of phenolic compounds in *P. harmala* has been reported in several preceding studies, including that of Abbas et al. [34] reporting a content of 142.03±0.1 mg GAE /g for total phenolic and 0.81±0.02 mg of QE /g for total flavonoid. Another study has also reported high amounts of TPC and TFC in methanol extract with a value of 650.38±30.3 mg GAE /g and 70.49±0.56 mg

QE /g respectively [35], and accordingly, a value of total phenolics content of 0.89 GAE mg /g was previously found in the methanolic extract [15]. Similarly, Radjah et al. [36] have found the content of TPC and TFC as 72.454 ± 0.214 mg GAE/g DW and 1.706 mg QE/g DW respectively in the methanolic extract, suggesting thus that such variability can be related to several factors, like geographical location and various environmental conditions.

In this study, the antioxidant activity of the plant extract/fractions was evaluated by eight complementary methods instead of a single technique to provide more conclusive results on the antioxidant properties, and this coincides with the previously performed studies [37]. Consequently, the methanolic extract and its subsequent fractions displayed a potent antioxidant activity by trapping free radicals, preventing β -carotene bleaching, and acted as reductants.

Here, the methanolic extract revealed remarkable antioxidant activity against the DPPH trapping with an IC_{50} of 133.18 ± 1.22 μ g/mL. This result was lower than that obtained with the methanolic extract of *P. harmala* by Khlifi et al. [38] and Abbas et al. [34], but close to that of El Abed et al. [39] and Benarous et al. [40] and higher than that of Atrooz et al. [15] and Radjah et al. [36]. In contrast, the work performed by Baghiani et al. [41] claimed that the methanolic extract is more effective than the ethyl acetate fraction of the same plant.

The obtained results of the antioxidant activity of the plant extract/fractions evaluated by the ABTS assay are similar to those found by Benarous et al. [40]. Accordingly, the methanolic extract of *P. harmala* showed a potent antioxidant activity ($IC_{50} = 44.63 \pm 1.08$ μ g/mL), and unlike, the study of Khlifi et al. [38] recorded a weak antioxidant activity of the methanolic extract with an IC_{50} of 90.7 ± 1.83 μ g/mL.

Moreover, the reducing power activity of the plant compounds, a valuable antioxidant marker, [42] determined in the crude extract and all fractions showed remarkable reducing properties via iron, and this coincides with study results reported by Guergour [43] and Mazandarani et al. [44]. However, the ferrous ions chelating assay revealed a weak antioxidant activity in the crude extract and all fractions, and this agrees with the findings of Baghiani et al. [41].

On the other hand, the results obtained by the β -carotene assay indicated that the ethyl acetate, chloroform, and butanol fractions are more active than the methanolic extract. Also, the ethyl acetate fraction exhibited a strong antioxidant activity with IC_{50} of 27.21 ± 0.99 μ g/mL, and this is alike to that reported by Baghiani et al. [41], and unlike that of Elansary et al. [45] reporting a highly potent antioxidant activity in the methanolic extract of

P. harmala leaves as determined by the β -carotene assay.

On top of that, the CUPRAC, GOR, and Phenanthroline assays showed an interesting antioxidant activity in the crude extract and all its fractions, in particular, the ethyl acetate fraction displaying the best activity ($A_{0.5}$: 90.57 ± 0.84 μ g/mL). This result concurs with that of Taştekin [46], reporting the highest antioxidant activity determined by CUPRAC assay in the ethyl acetate fraction of *P. harmala* growing in Turkey.

The tested extracts of *P. harmala* revealed a very higher inhibitory activity against AChE and BChE, owing to the presence of bioactive inhibitory phytochemicals. The chloroform fraction displayed the most potent effect against AChE and BChE, despite its low content in phenolic and flavonoid compounds. These findings suggest the involvement of other bioactive compounds such as alkaloids and coumarins in the inhibition of these enzymes. A similar result was found in the ethyl acetate and butanol fractions, suggesting the role of the flavonoid content against the cholinesterase activity. In addition, the extracts inhibited a more effective effect on BChE than AChE, and hence their activity explains the specificity to BChE rather than AChE. Results showed also a good inhibitory effect of the methanolic extract against AChE (IC_{50} : 65.38 ± 1.47 μ g/mL) which is similar to that reported in the study of Ali et al. [47] conducted on the methanolic extract of Egyptian *P. harmala*, showing an important AChE inhibitory activity (IC_{50} : 68 μ g/mL). The BChE effect of the methanolic extract of the aerial parts of Tunisian *P. harmala* has recently been reported by Edziri et al. [48]. As reported, the β -carboline alkaloids are the main bioactive compound of *P. harmala* having a potent effect against AChE [49]. Among β -carboline molecules, harmaline which is a common dihydro β -carboline type has interesting pharmacological effects, and is able to interact with numerous enzymes and neurotransmitters, including topoisomerase I, and monoamine oxidase-A [50].

5. Conclusion

In the light of the results obtained, it can be concluded that the crude extract and all fractions of *P. harmala* seeds have an important antioxidant activity mainly the ethyl acetate fraction that can be assigned to their phenolic contents since high amounts of total phenolic and flavonoids have been recorded in the extracts. The results also revealed a powerful anticholinesterase especially the chloroform fraction exhibiting an effect comparable to or even more potent than the standard used. From these outcomes, it can be suggested that *P. harmala* seeds can constitute a prominent source of bioactive molecules for human health purposes, both in pharmaceuticals and nutritional industrial products.

The study needs to be completed by future research investigating the phytochemical analysis of the bioactive molecules using HPLC and LC-MS methods.

6. Conflicts of interest

There are no conflicts to declare

7. References

- [1] Agustina S., Aidha N.N., Oktarina E. and Kurniati N.F., Evaluation of antioxidant and wound healing activities of *Spirulina* sp. *Egypt J Chem*, **64**(8), 4601-4610(2021). DOI: 10.21608/ejchem.2021.48597.3008.
- [2] Christen Y., Oxidative stress and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, **71**(2), 621S-629S(2000). DOI:10.1093/ajcn/71.2.621s.
- [3] Anwar H., Hussain G. and Mustafa I., "Antioxidants from Natural Sources", Ed. E. Shalaby and G.M. Azzam, Chap. 1, IntechOpen, London, UK, 178 (2018). DOI:10.5772/intechopen.75961.
- [4] Rasheed A. and Azeez R.F.A., "A review on natural antioxidants", Ed. C. Mordeniz, Chap. 5, IntechOpen, London, UK, 110 (2019). DOI:10.5772/intechopen.82636.
- [5] Pandey K.B. and Rizvi S.I., Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid med cell longev*, **2**(5), 270-278(2009). DOI:10.4161/oxim.2.5.9498.
- [6] El Aanachi S., Gali L., Nacer S.N., Bensouici C., Dari K. and Aassila H., Phenolic contents and *in vitro* investigation of the antioxidant, enzyme inhibitory, photoprotective, and antimicrobial effects of the organic extracts of *Pelargonium graveolens* growing in Morocco. *Biocatal Agr Biotechnol*, **29**,1-8(2020). DOI:10.1016/j.bcab.2020.101819.
- [7] Köksal E., Tohma H., Kılıç Ö., Alan Y., Aras A., Gülçin İ. and Bursal E., Assessment of antimicrobial and antioxidant activities of *Nepeta trachonitica*: analysis of its phenolic compounds using HPLC-MS/MS. *Sci pharm*, **85**(2), 2-14(2017). DOI:10.3390/scipharm85020024.
- [8] Colovic M.B., Krstic D.Z., Lazarevic-Pasti T.D., Bondzic A.M. and Vasic V.M., Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, **11**(3), 315-335(2013). DOI:10.2174/1570159x11311030006.
- [9] Amat-ur-Rasool H., Ahmed M., Hasnain S., Ahmed A. and Carter W.G., In Silico Design of Dual-Binding Site Anti-Cholinesterase Phytochemical Heterodimers as Treatment Options for Alzheimer's Disease. *Curr Issues Mol Biol*, **44**(1), 152-175(2021). DOI:10.3390/cimb44010012.
- [10] Lou Y.H., Wang J.S., Dong G., Guo P.P., Wei D.D., Xie S.S. and Kong L.Y., The acute hepatotoxicity of tacrine explained by ¹H NMR based metabolomic profiling. *Toxicol Res*, **4**(6), 1465-1478(2015). DOI:10.1039/c5tx00096c.
- [11] Abdel K., Effect of *salvia Egyptiaca* extract on cholinergic system in adult male Albino rats. *Isot Radiat Res*, **36**(4), 683-693(2004).
- [12] Ferreira A., Proença C., Serralheiro M.L.M. and Araujo M.E.M., The *in vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. *J ethnopharmacol*, **108**(1), 31-37(2006). DOI:10.1016/j.jep.2006.04.010.
- [13] Shahinozzaman M., Taira N., Ishii T., Halim M.A., Hossain M.A. and Tawata S., Anti-inflammatory, anti-diabetic, and anti-Alzheimer's effects of prenylated flavonoids from Okinawa propolis: an investigation by experimental and computational studies. *Molecules*, **23**(10), 2479(2018). DOI:10.3390/molecules23102479.
- [14] Lamchouri F., Antitumor properties and toxicity effects of *Peganum harmala* L. (*Zygophyllaceae*). *Plant Sci Today*, **1**(4), 192-195(2014). DOI:10.14719/pst.2014.1.4.71.
- [15] Atrooz O.M., Wietrzyk J., Filip-Psurska B., Al-Rawashdeh I., Soub M. and Abukhalil M.H., Antiproliferative, Antioxidant, and Antibacterial activities of crude plant extracts of *Asphodeline lutea* L. and *Peganum harmala* L. *World J Pharm Res*, **7**(11), 148-167(2018).
- [16] Monsef H.R., Ghobadi A., Iranshahi M. and Abdollahi M., Antinociceptive effects of *Peganum harmala* L. alkaloid extract on mouse formalin test. *J Pharm Pharma Sci*, **7**(1), 65-9(2004).
- [17] Moradi M.T., Karimi A., Rafieian-Kopaei M. and Fotouhi F., *In vitro* antiviral effects of *Peganum harmala* seed extract and its total alkaloids against Influenza virus. *Microb pathog*, **110**, 42-49(2017). DOI:10.1016/j.micpath.2017.06.014.
- [18] Asgarpanah J. and Ramezanloo F., Chemistry, pharmacology and medicinal properties of *Peganum harmala* L. *Afr J Pharm pharmacol*, **6**(22), 1573-1580(2012). DOI:10.5897/ajpp11.876.
- [19] Müller L., Gnoyke S., Popken AM. and Böhm V., Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *LWT-Food Sci Technol*, **43**(6), 992-999(2010). DOI:10.1016/j.lwt.2010.02.004.
- [20] Topçu G., Ay M.A., Bilici C., Sarıkürkcü M., Öztürk A. and Ulubelen A., A new flavone from antioxidant extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*, **103**(3), 816-822(2007). DOI:10.1016/j.foodchem.2006.09.028.
- [21] Aissani F., Grara N., Bensouici C., Bousbia A., Ayed H., Idris M.H.M. and Teh L.K., Algerian *Sonchus oleraceus* L.: a comparison of different extraction solvent on phytochemical composition, antioxidant properties and anti-cholinesterase activity. *Adv Tradit Med*, (2), 1-12(2021). DOI:10.1007/s13596-021-00553-y.
- [22] Khalfallah A., Berrehal D., Bensouici C., Kabouche A., Semra Z., Voutquenne-Nazabadioko L., Alabdul-Magid A. and Kabouche Z., Flavonoids, cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Evax pygmaea*. *Pharm biol*, **55**(1), 2292-2296(2017). DOI:10.1080/13880209.2017.1405997.
- [23] Shi H., Noguchi N. and Niki E., Galvinoxyl method for standardizing electron and proton donation activity. *Methods Enzymol*, **335**, 157-166(2001). DOI:10.1016/s0076-6879(01)35240-0.
- [24] Apak R., Guclu R.K., Ozyurek M. and Karademir S.E., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agr Food Chem*, **52**(26), 7970-7981(2004). DOI:10.1021/jf048741x.
- [25] Mamache W., Amira S., Bensouici C., Laouer H. and Benchikh F., *In vitro* antioxidant, anticholinesterases, anti- α -amylase, and anti- α -glucosidase effects of Algerian *Salvia aegyptiaca* and *Salvia verbenaca*. *J*

- Food Biochem*, **44**(11), 1-15(2020). DOI:10.1111/jfbc.13472.
- [26] Szydłowska-Czernecka A., Dianoczeki C., Recseg K., Karlovits G. and Szlyk E., Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*, **76**(4), 899-905(2008). DOI:10.1016/j.talanta.2008.04.055.
- [27] Mouffouk S., Mouffouk C., Bensouici C. and Haba H., *In vitro* Cytotoxic Effect, Hemolytic, and Antioxidant Activities of the Algerian Species *Nonea vesicaria* Rchb. *Curr Bioact Compd*, **16**(8), 1197-1204(2020). DOI:10.2174/1573407216666200109120431.
- [28] Saci F., Louaileche H., Gali L. and Bensouici C., Changes in anticholinesterase, antioxidant activities and related bioactive compounds of carob pulp (*Ceratonia siliqua* L.) during ripening stages. *J Food Meas Charact*, **14**(2), 937-945(2020). DOI:10.1007/s11694-019-00344-9.
- [29] Gali L. and Bedjou F., Antioxidant and anticholinesterase effects of the ethanol extract, ethanol extract fractions and total alkaloids from the cultivated *Ruta chalepensis*. *S Afr J Bot*, **120**, 163-169(2019). DOI:10.1016/j.sajb.2018.04.011.
- [30] Hayouni E.A., Abedrabba M., Bouix M. and Hamdi M., The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenicea* L. fruit extracts. *Food chem*, **105**(3), 1126-1134(2007). DOI:10.1016/j.foodchem.2007.02.010.
- [31] Rezzagui A., Merghem M., Derafa I. and Dahamna S., Acute and sub-acute toxic effects of Algerian *Peganum harmala* L. crud extract. *J Drug Deliv Ther*, **10**(2), 115-121(2020). DOI:10.22270/jddt.v10i2.3920.
- [32] Abubakar E.M., Misau S., Modibbo S. and Lamarin Bala G., Percentage yield and acute toxicity of the plant extracts of *Ceiba pentandra* grown in Bauchi State, North Eastern Nigeria. *J Pharmacogn Phytochem*, **6**(5), 1777-1779(2017).
- [33] Bouchoukh I., Hazmoune T., Boudelaa M., Bensouici C. and Zellagui A., Anticholinesterase and antioxidant activities of foliar extract from a tropical species: L. (Myrtaceae) grown in Algeria. *Curr Issues Pharm Med Sci*, **32**(3), 160-167(2019). DOI:10.2478/cipms-2019-0029.
- [34] Abbas M.W., Hussain M., Qamar M., Ali S., Shafiq Z., Wilairatana P. and Mubarak M.S., Antioxidant and anti-inflammatory effects of *Peganum harmala* extracts: an *in vitro* and *in vivo* study. *Molecules*, **26**(19), 6084(2021). DOI:10.3390/molecules26196084.
- [45] Elansary H.O., Szopa A., Kubica P., Ekiert H., Al-Mana F.A. and El-Shafei A.A., Polyphenols of *Frangula alnus* and *Peganum harmala* leaves and associated biological activities. *Plants*, **9**(9), 1-15(2020). DOI: 10.3390/plants9091086.
- [46] Taştekin N.H. Thesis, Institute of Health Sciences, Hacettepe University, Ankara, Turkey (2022).
- [47] Ali S.K., Hamed A.R., Soltan M.M., Hegazy U.M., Elgorashi E.E., El-Garf I.A. and Hussein A.A., *In-vitro* evaluation of selected Egyptian traditional herbal medicines for treatment of Alzheimer disease. *BMC Complement Altern Med*, **13**(1), 1-10(2013). DOI:10.1186/1472-6882-13-121.
- [48] Edziri H., Marzouk B., Mabrouk H., Garreb M., Douki W., Mahjoub A., Verschaeve L., Najjar F. and [35] Ait Abderrahim L., Taïbi K. and Ait Abderrahim C., Assessment of the antimicrobial and antioxidant activities of *Ziziphus lotus* and *Peganum harmala*. *Iran J Sci Technol Trans A: Sci*, **43**(2), 409-414 (2019). DOI: 10.1007/s40995-017-0411-x.
- [36] Radjah A., Chorfi H. and Bouatrous Y., Stage of development and solvent effects on Phytochemistry and antioxidant activity of three algerian plants. *Analele Univ din Oradea Fasc Biol*, **26**(2), 91-99(2019).
- [37] Houghton P.J., Howes M.J., Lee CC. and Steventon G., Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*, **110**(3), 391-400(2007). DOI:10.1016/j.jep.2007.01.032.
- [38] Khlifi D., Sghaier R.M., Amouri S., Laouini D., Hamdi M. and Bouajila J., Composition and antioxidant, anti-cancer and anti-inflammatory activities of *Artemisia herba-alba*, *Ruta chalepensis* L. and *Peganum harmala* L. *Food chem toxicol*, **55**, 202-208(2013). DOI:10.1016/j.fct.2013.01.004.
- [39] El Abed N., Guesmi F., Mejri M., Marzouki M.N. and Ben Hadj Ahmed S., Phytochemical screening and assessment of antioxidant, antibacterial and cytotoxicity activities of five Tunisian medicinal plants. *Inter J Pharm Res Bio Sci*, **3**(4), 770-89(2014).
- [40] Benarous K., Bombarda I., Iriepa I., Moraleda I., Gaetan H., Linani A., Tahri D., Sebaa M. and Yousfi M., Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: In silico and in vitro studies. *Bioorg Chem*, **62**, 1-7(2015). DOI:10.1016/j.bioorg.2015.06.005.
- [41] Baghiani A., Djarmouni M., Boumerfeg S., Trabsa H., Charef N., Khennouf S. and Arrar L., Xanthine Oxidase Inhibition and Antioxidant Effects of *Peganum harmala* Seed Extracts. *Eur J Med Plants*, **2**(1), 42-56(2012). DOI:10.9734/ejmp/2012/898.
- [42] Güder A. and Korkmaz H., Evaluation of *in-vitro* antioxidant properties of hydroalcoholic solution extracts *Urtica dioica* L., *Malva neglecta* Wallr. and their mixture. *Iran J Pharm Res*, **11**(3), 913-923(2012).
- [43] Guergour, H. Thesis, Department of Biochemistry, Ferhat Abbas University, Setif, Algeria (2018).
- [44] Mazandarani M., Sineh Sepehr K., Baradaran B. and Khuri V., Autecology, phytochemical and antioxidant activity of *Peganum harmala* L. seed extract in North of Iran (Tash Mountains). *J Med Plants By-prod*, **2**, 85-90(2012).
- Mastouri M., Phytochemical screening, butyrylcholinesterase inhibitory activity and anti-inflammatory effect of some Tunisian medicinal plants. *S Afr J Bot*, **114**, 84-88(2018). DOI:10.1016/j.sajb.2017.10.019.
- [49] Cao R., Peng W., Wang Z. and Xu A., β -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr Med Chem*, **14**(4), 479-500(2007). DOI:10.2174/092986707779940998.
- [50] Herraiz T., González D., Ancín-Azpilicueta C., Arán V.J. and Guillén H., β -Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human monoamine oxidase (MAO). *Food Chem Toxicol*, **48**(3), 839-845(2010). DOI:10.1016/j.fct.2009.12.019



Research Article

Effect of *Peganum harmala* L. extract supplemented ISP2 medium on growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* S115

Amel Nait Marzoug^a, Adel Ayari^{b,*}, Fadila Khaldi^a, Ines Guehria^c, Abdelhak Gheid^a

^aLaboratory of Sciences and Technology of Water and Environment, University of Mohamed Cherif Messaadia, Souk-Ahras, Algeria

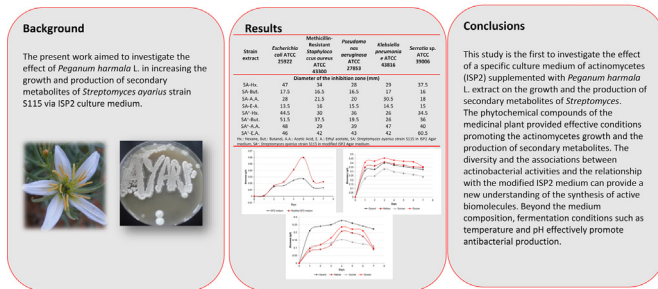
^bLaboratory of Aquatic and Terrestrial Ecosystems, University of Mohamed Cherif Messaadia, Souk-Ahras, Algeria

^cLaboratory of Biochemistry and Biotechnology, LR01ES05, Faculty of Sciences, University of El Manar, 2092, Tunisia



GRAPHICAL ABSTRACT

Effect of *Peganum harmala* L. extract supplemented ISP2 medium on growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* S115



ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2022

Accepted 22 December 2022

Available online 30 March 2023

Keywords:

Actinomycetes
Antibacterial activity
Biomass
Culture medium
Glucose
Glycerol
Growth
Peganum harmala
Secondary metabolites
Streptomyces ayarius

ABSTRACT

Background: The present work aimed to investigate the effect of *Peganum harmala* L. in increasing the growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* strain S115 via ISP2 culture medium. *Peganum harmala* L. was dried and added to ISP2 medium. The morphological properties and the antibacterial activity of *S. ayarius* strain S115 seeded in ISP2 and the modified ISP2 media was evaluated by using the agar well diffusion method against five pathogenic bacteria, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia* sp. and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. The biomass of *S. ayarius* strain S115 in both media was determined. The kinetics of growth and production of secondary metabolites were studied for 7 d in different carbon sources.

Results: Culture on the modified ISP2 showed an effective growth of *S. ayarius* strain S115 with changed color of the aerial mycelium from gray to white. The antibacterial activity revealed large inhibition zones against the tested pathogenic bacteria compared to those of the ISP2. The amount of *S. ayarius* strain S115 biomass was twice as high in the modified ISP2. The effect of different carbon sources on the growth and production of secondary metabolites of *S. ayarius* strain S115 revealed the highest biomass and biological activities through using glucose in the modified ISP2 on the 3rd day of culture. Of note, glycerol was found as the optimal carbon source in ISP2.

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

* Corresponding author.

E-mail address: adel.ayari@univ-soukahras.dz (A. Ayari).

<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.12.006>

0717-3458/© 2023 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusions: The discovery of new bioactive molecules from actinomycetes seeded in specific culture media may contribute to the development of therapeutic solutions

How to cite: Nait Marzoug A, Ayari A, Khaldi F, et al. Effect of *Peganum harmala* L. extract supplemented ISP2 medium on growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* S115. Electron J Biotechnol 2023;64. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.12.006>.

© 2023 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Antibacterial resistance is a major-human problem [1,2,3,4]. Additionally, the pathogenic bacteria such as Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa* resistant to several antibiotics lead to serious health threats [5,6]. As a result, several approaches have been explored to control the pathogenesis of these microorganisms, in addition to the recent great interest in the use of the natural antibiotic sources, owing to their potential therapeutic efficiency [3]. In this regard, the pharmaceutical industries in the world are interested in producing antibiotics from actinomycetes due to their ability to synthesize the bioactive secondary metabolites [7,8]. These molecules are diverse chemical organic compounds that indirectly contribute to the ordinary growth, development, or reproduction of the producing organisms. Also, they can be synthesized under optimal growth conditions in the stationary phase or at the end of the exponential growth phase [9], and are considered antifungal, antiviral, anticancer, antiparasitic, and immunosuppressant agents whose enzymes are commonly used in the chemical pharmaceutical industries [9,10,11]. Furthermore, *Streptomyces* is a major producer of a wide range of secondary metabolites and is the ideal source of several antibiotics, anticancer compounds, enzymes and enzyme inhibitors, etc. [3,12,13,14]. Noteworthy, the antibiotics are primarily produced on a large scale by the fermentation process, by which the increasing production yields require improvement of the producing strains and their culture conditions, and consequently, the bacterial metabolism can be effectively regulated. Thus it seems to be valuable to provide the stimulators for increasing the growth and production of secondary metabolites that being used against pathogenic microorganisms [15]. Here in, the use of medicinal plant extracts in culture media is a worthy tool for the design and the development of fermentation processes. As far as known, the specific medium of International *Streptomyces* Project-2 (ISP2) actinobacteria supplemented with a medicinal plant extract to increase the bacterial potential growth and production of bioactive secondary metabolites has not been investigated. In this study, *Peganum harmala* L., of the family Zygophyllaceae, widely found in the arid and semi-arid regions of Algeria, was selected as an effective medicinal plant commonly used in traditional Algerian medicine for its various virtues [16,17]. *P. harmala* is an alkaloid-rich plant, and thus a hallucinogenic plant with psychotropic effects, and various biological properties such as analgesics, diuretics, antiproliferative, antihelmintics, abortifacients, and antimicrobials [18]. Moreover, *Streptomyces ayarius* strain S115 is a new strain belonging to the actinobacteria and was isolated from the sediments of Lake Oubeira (north-eastern Algeria) and registered at GenBank under the accession number JQ965757. A series of approaches used to enhance the production of the bioactive compounds were adopted as the application of culture media using associations with medicinal plants and classical methods. Based on the Algerian natural sources of antimicrobial metabolites, this work is a representative example of the possibility of closely performing a chemical-biological study of the natural products.

2. Materials and methods

2.1. Strain isolation

The *S. ayarius* strain S115 strain used throughout this study was kindly provided by Dr. Adel Ayari, from the Culture Collection of the Active Biomolecules Valorization Team of the Aquatic and Terrestrial Ecosystems Laboratory of Mohamed Cherif Messaadia University of Souk Ahras, Algeria [19]. The strain *S. ayarius* strain S115 was isolated from a sediment sample collected in Oubeira's lake of the El-Kala region (east-north of Algeria), on casein-starch medium (starch, 10 g; casein, 0.3 g; K₂HPO₄, 2 g; KNO₃, 2 g; CaCO₃, 0.02 g; FeSO₄ 7H₂O, 0.01 g; MgSO₄ 7H₂O, 0.05 g; agar, 20 g; H₂O, 1000 ml, pH 7.2) as recommended by Shirling and Gottlieb [20], by the dilution method. The strain was stored on International *Streptomyces* Project-2 (ISP2) agar slant medium at 4°C.

2.2. Plant material

The seeds of *P. harmala* were collected in July 2019 during the flowering period from the region of Sidi Fredj (South-East of Souk Ahras, Algeria) in the geographic coordinates: 36°0'58.94" N; 8°13'54.03" E; 544 m (Latitude/longitude/altitude). The seeds were air-dried in the shade and ground into a fine powder using an electric blender.

2.3. Preparation of modified ISP2 medium

The plant powder of *Peganum harmala* was suspended in sterile distilled water, filtered through Whatman No. 1 paper, and then sterilized. The filtrate was afterward added to the medium containing the International *Streptomyces* Project-2 agar (yeast extract, 4 g; malt extract, 10 g; glucose, 4 g; agar, 20 g; H₂O, 1000 ml, pH 7.2).

2.4. Cultivation and extraction of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 and modified ISP2 medium

The *Streptomyces ayarius* strain S115 strain was simultaneously inoculated by tight streaks on two media (ISP2 agar and modified ISP2 agar) and incubated at 28°C for 14 d. Then, small blocks of matured *S. ayarius* strain S115 agar were added to 100 ml of ISP2 broth and modified ISP2 broth medium in baffled Erlenmeyer flasks. The broths were incubated for 7 d at 28°C in a shaker incubator (Edmund Bühler, Germany), and the bacterial strain media were centrifuged to remove biomass. An equal volume of organic solvent was used to extract the cell-free supernatant, since the bacterial effectiveness was tested in four extraction solvents, including n-hexane, ethyl acetate, acetic acid, and n-butanol. The solvent phases containing a crude extract of secondary metabolites were dried using a rotary evaporator (Buchi, Switzerland) and were afterward recovered in 1 ml of methanol [19,21].

2.5. Assay of antibacterial activity in ISP2 and modified ISP2 medium

The antibacterial activity of *Streptomyces ayarius* strain S115 was tested by using the agar well diffusion method [8]. The tested

microorganisms, namely *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Serratia* sp. ATCC 39006 and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 were obtained from the culture collection of the Active Biomolecules Valorization Team of the aquatic and Terrestrial Ecosystems Laboratory of Mohamed Cherif Messaadia, University of Souk Ahras, Algeria. These strains were inoculated on Muller Hinton agar medium, and the agar wells were made using a sterile well driller. A volume of 150 µl of the methanolic extract was deposited on the wells and incubated at 37°C for 24 h. After incubation, the clear inhibition zones were measured using a caliper.

2.6. Determination of biomass in ISP2 and modified ISP2 medium

The evolution of the biomass during the fermentation process in two media was estimated according to the method of Pfefferle et al. [22]. In brief, 2 ml of the bacterial samples were centrifuged at 5000 rpm for 15 min, the resulting supernatants were discarded, and the cell pellet was washed twice with distilled water and dried at room temperature. The dry weight was measured and recorded as previously reported [23].

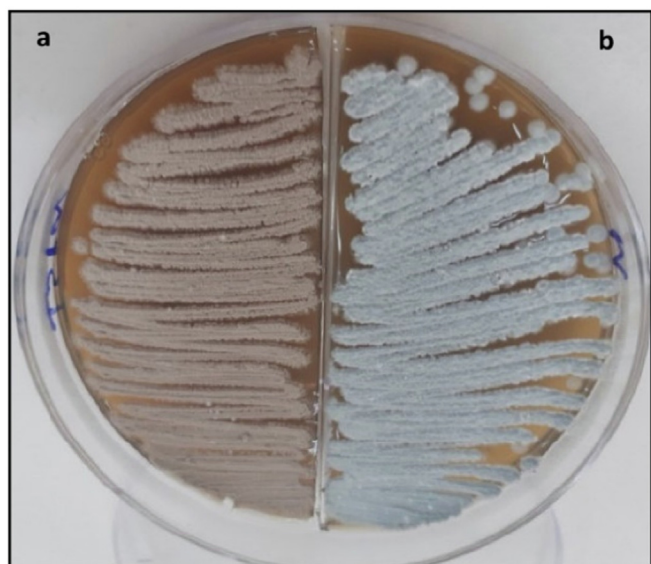


Fig. 1. Morphological characteristics of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 Agar (a) and modified ISP2 Agar medium (b).

Table 1
Antibacterial activities of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 Agar and modified ISP2 Agar medium.

Strain extract	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816	<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006
Diameter of the inhibition zone (mm)					
SA-Hx.	47	34	28	29	37.5
SA-But.	17.5	16.5	16.5	17	16
SA-A.A.	28	21.5	20	30.5	18
SA-E.A.	13.5	16	15.5	14.5	15
SA ⁺ -Hx.	44.5	30	36	26	34.5
SA ⁺ -But.	51.5	37.5	19.5	26	36
SA ⁺ -A.A.	48	29	39	47	40
SA ⁺ -E.A.	46	42	43	42	60.5

Hx.: Hexane; But.: Butanol; A.A.: Acetic Acid; E.A.: Ethyl acetate; SA: *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 Agar medium; SA⁺: *Streptomyces ayarius* strain S115 in modified ISP2 Agar medium.

2.7. Growth kinetics and secondary metabolites production in ISP2 and modified ISP2 medium

The growth Kinetics and secondary metabolites production in the two culture media, as well as the evolution of the antibacterial activity against the pathogenic bacteria, were monitored daily for 7 d.

2.8. Effect of carbon sources

Different carbon sources were used to replace the carbon sources in ISP2 and modified ISP2 media, and all other components were held constant. Carbon sources including maltose, sucrose, and glycerol were sterilized separately and added just before inoculation, as well as the strain biomass and production of secondary metabolites, were respectively recorded.

3. Results and discussion

3.1. Description of *Streptomyces ayarius* strain S115

Streptomyces ayarius strain S115 is an aerobic Gram-positive strain, non-motile and filamentous actinobacteria. The fragments of the mycelia aerial have a rod-shaped morphology. The well-developed substrate mycelium varies from sulfur yellow to brown, since the color of aerial mycelium is usually grey on ISP2 agar (yeast extract, 4 g; malt extract, 10 g; glucose, 4 g; agar, 20 g; H₂O, 1000 ml, pH 7.2), ISP3 agar (meals, 20 g; MnCl₂ 4H₂O, 0.1 g; FeSO₄ 7H₂O, 0.1 g; ZnSO₄ 7H₂O, 0.1 g; Agar, 18 g, H₂O, 1000 ml, pH 7.2), ISP4 Agar (starch soluble, 10 g; K₂HPO₄, 1 g; MgSO₄ 7H₂O, 1 g; NaCl, 1 g; (NH₄)₂SO₄, 2 g; CaCO₃, 2 g; agar, 20 g; H₂O, 1000 ml, pH 7.2), and peptone yeast extract iron agar (ISP6) [20].

The optimum growth temperature is between 28 and 30°C, while pH varies between 7 and 9. The bacterial strain can metabolize starch, glucose, fructose, sucrose, arabinose, galactose, inositol, lactose, maltose, mannitol, sorbitol, and weakly metabolize rhamnose, but is unable to use cellulose and xylose. Also, it exhibits activity of β-glucosidase, lysine and ornithine decarboxylases, and arginine dihydrolase. The GenBank accession number for the 16S rRNA gene sequence is JQ965757.

3.2. Cultivation of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 and modified ISP2 medium

After an incubation period of 14 d in ISP2 agar and modified ISP2 agar medium, colonies of *Streptomyces ayarius* strain S115 grew well in both media and appeared with a leathery texture, slow growth inside agar, and production of hyphae, spores, and diffusible pigment. Interestingly, the aerial mycelium exhibits gray

color (Fig. 1A), while the color of the modified ISP2 agar medium changes to white color (Fig. 1B). In this study, the IPS2 medium promoting the sporulation of actinomycetes [20] was selected to evaluate the effect of the plant powder on strain growth. This medium is composed of a carbon source, glucose, nitrogen source, malt, and yeast extracts. The supplementation of plant powder retains the ability of this medium to promote bacterial sporulation and changes the aerial mycelium color from gray to white. This color

change is likely related to the flavonoids and phenolic-rich plant powder.

3.3. Assay of antibacterial activity in ISP2 and modified ISP2 medium

The results of the agar well diffusion assay showed high antibacterial activity of the supernatant of fermented modified broth ISP2 of *S. ayarius* strain S115 against all the Gram positive

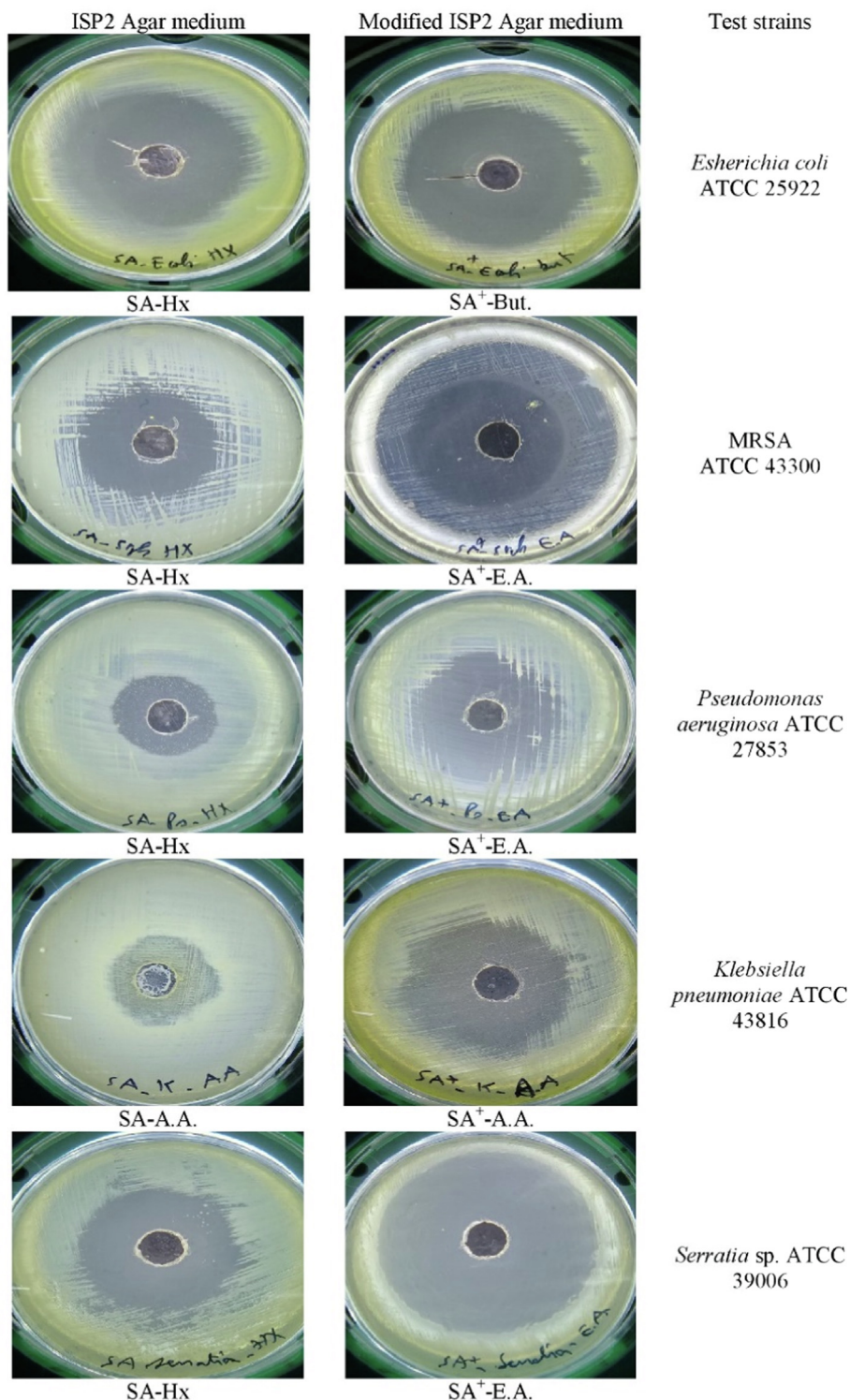


Fig. 2. Best solvents in antibacterial activities of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 and modified ISP2 medium: Hx.: Hexane; But: Butanol; A.A.: Acetic Acid; E.A.: Ethyl acetate; SA: *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 Agar medium; SA⁺: *Streptomyces ayarius* strain S115 in modified ISP2 Agar medium.

and negative target species: *Escherichia coli* ATCC 25922, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 and *Serratia* sp. ATCC 39006 compared with that of the fermented broth ISP2 (Table 1 and Fig. 2). The diameter of the inhibition zone of antibacterial activity against Gram-negative bacteria was significantly higher than that of Gram-positive bacteria showing values varying from 13.5 mm to 60.5 mm. As reported, the actinomycetes are bacteria rich in secondary metabolites, extracellular enzymes, and enzyme inhibitors. Hence, this study has proved the ability of the tested actinomycetes to assimilate plant polyphenol compounds from the modified ISP2 medium to synthesize bioactive molecules of high antibacterial activity. Regarding the extraction solvent optimization, ethyl acetate was found to be the best solvent to extract all antibacterial agents from the modified ISP2 fermentation broth against MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *Serratia* sp. ATCC 39006. Meanwhile, butanol and acetic acid are respectively, the best extraction solvent for *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 4381. In the ISP2 broth devoid of the plant powder, the hexane solvent was the adequate solvent for efficient extraction of bioactive molecules against *E. coli* ATCC 25922, MRSA ATCC 43300, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *Serratia* sp. however, acetic acid has proven to be an effective solvent for extracting antibacterial agents against *K. pneumoniae* ATCC 43816.

A previous study using different solvents, including ethyl acetate, methanol, and chloroform to extract the bioactive compounds and to compare the inhibition zones of the solvent extracts proved ethyl acetate as the best among the tested solvents [24,25], and this coincides with these findings. It was reported that the antibacterial potential of the culture filtrate might be related to the high production of secondary antibacterial compounds as antibiotics in many *Streptomyces* species [19,21,26]. These results suggest that the inhibition of bacterial growth by the culture filtrates is likely referred to the production of extracellular hydrolytic enzymes and secondary antibacterial compounds that were activated by the plant polyphenols supplemented ISP2 medium. Most of the *Streptomyces* bioactive secondary metabolites are antimicrobial, anticancer, and immunosuppressive agents [27]. In addition, these bacteria contribute to producing nearly of the two-third commercial antibiotics [19]. Of note, some of the used antibiotics in therapy, such as streptomycin, kanamycin, tetracycline, chloramphenicol, and neomycin are derived from *S. griseus*, *S. kanamyceticus*, *S. venezuelae*, and *S. fradiae* [28,29].

3.4. Biomass determination in ISP2 and modified ISP2 medium

The amount of biomass was twice as higher as that found in International *Streptomyces* Project-2 (ISP2) (Fig. 3). The maximum biomass value was noticed on the 5th day in the two media, where it reached 0.0271 in the ISP2 medium, and 0.06001 in the modified ISP2 medium. As the medium composition can influence biomass production, the production of secondary metabolites is believed to occur when growth is limited by one of the medium substrates [30]. The three main factors causing this limitation are namely the sources of carbon, nitrogen, and phosphate. Overall, when one of these elements becomes limiting, growth slows down and consequently, the production of secondary metabolites such as antibiotics takes place during the idiophase. Under certain experimental conditions, high biomass production can occur during the growth phase without nutritional limitations but with slowly metabolizable substrates, and this is alike to the case of plant compounds. Accordingly, Voelker and Altaba [31], have reported production of pristinamycins during the growth phase in the culture medium of *Streptomyces pristinaespiralis* containing sodium nitrate as the sole source of nitrogen.

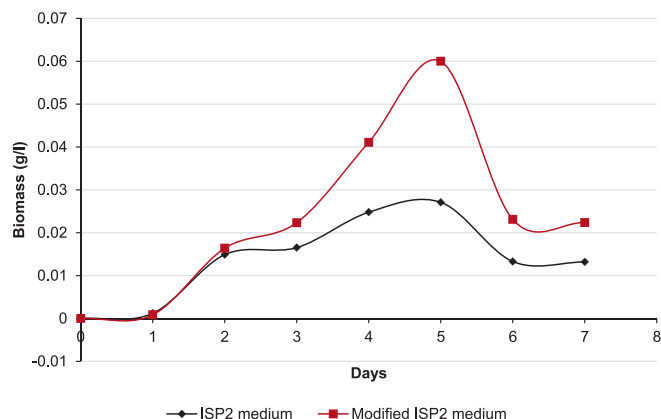


Fig. 3. Kinetics of biomass of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 and modified ISP2 medium.

3.5. Kinetics and optimization of growth and secondary metabolites production in ISP2 and modified ISP2 medium

ISP2 medium was found as the best culture medium among those tested in several previous studies, showing optimal production of antimicrobial agents. ISP2 supplemented with plant powder showed higher biomass than that found in ISP2 alone. In ISP2 medium containing different carbon sources, including glycerol, maltose, and sucrose instead of glucose as a carbon source showed that the glycerol was the optimal carbon source in ISP2 (Fig. 4) since glucose was the optimal carbon source in ISP2 modified medium in 3rd d of culture.

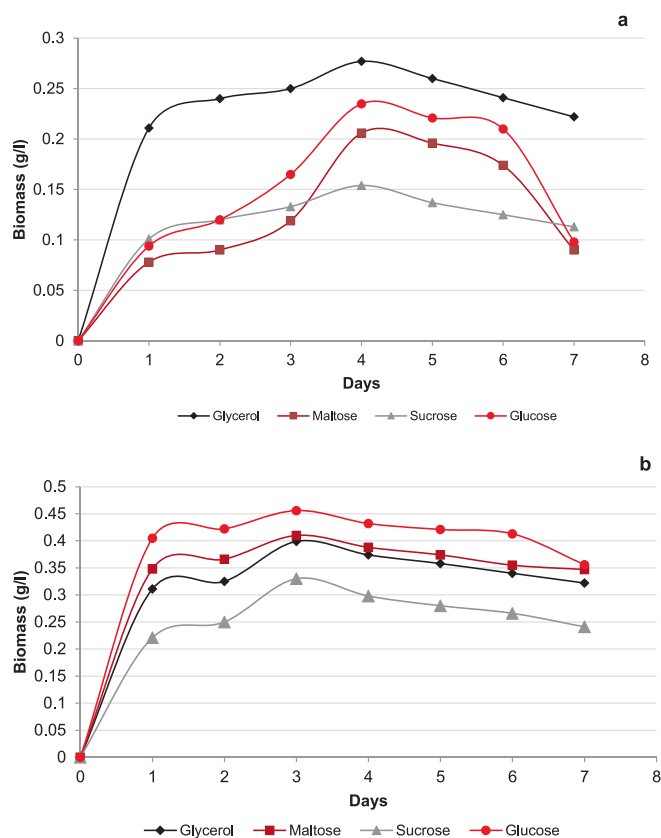


Fig. 4. Kinetics and optimization of growth (effect of carbon sources) of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 (a) and modified ISP2 medium (b).

On top of that, the glycerol was identified as the optimal carbon source among the tested carbon sources used to replace glucose in ISP2 medium, exhibiting the largest inhibition zone against *Escherichia coli* ATCC 25922, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Serratia* sp. ATCC 39006 on the 4th day of culture (Table 2). A previous study has reported that the maximum production of some antibiotics was achieved using glucose and lactose as carbon sources [25,32].

The *S. ayarius* strain S115 strain cultured in International *Streptomyces* Project-2 (ISP2) medium showed good production of secondary metabolites, and efficient bacterial growth starting with an exponential growth phase lasting 1 d (0–1 d), followed by a second exponential phase between the 2nd and 4th d for ISP2 and 2nd and 3rd d for modified ISP2 medium. This suggests the presence of a diauxic phenomenon. Additionally, a decline phase begins on the 4th d for ISP2 and the 3rd d for the modified ISP2 medium. The production of antibiotics begins on the 3rd d in ISP2 and on the 2nd d in

ISP2 modified medium during the exponential phase, meanwhile, the maximum production was observed on the 4th d for all the tested pathogenic bacteria in the two media, i.e. during the decline phase. The antibiotics produced by the bacterial strain cultured in the modified ISP2 medium were unlike and greater than that of the ISP2 medium until the last day of the culture, showing regular and continuous production of antibiotics. Furthermore, the kinetics of growth and production of secondary metabolites were studied under liquid conditions and agitation using the two media (ISP2 and modified ISP2). This choice was made based on the results from the previously conducted studies, reporting that the ISP2 medium composed of malt extract (10 g/l), yeast extract (4 g/l), and glucose (4 g/l) is one of the most favorable media for the production of antibiotics in actinomycetes [23]. The difference between the two used media is related to the addition of a quantity of the plant powder. For the growth kinetics, certain points in common between the two media were noted, including the absence of a latency phase where the pre-cultures can be performed under the

Table 2
Optimization of secondary metabolites production (effect of carbon sources) of *Streptomyces ayarius* strain S115 in ISP2 and modified ISP2 medium.

Strain days	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922							
	GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	0	17 ⁺	0	15.5 ⁺	0	13.5 ⁺	0	16.8 ⁺
3	19	24.8 ⁺	16	17 ⁺	12	15.8 ⁺	17	23 ⁺
4	28	30 ⁺	22	24 ⁺	22	21 ⁺	23	28 ⁺
5	24	27 ⁺	20.5	22 ⁺	20	20 ⁺	21	26.2 ⁺
6	23	25.5 ⁺	19	20.2 ⁺	18	18.2 ⁺	20.5	24 ⁺
7	21	23 ⁺	19	19 ⁺	16	17 ⁺	19	20 ⁺
Strain days	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300							
	GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	21	22 ⁺	0	17 ⁺	0	14 ⁺	18	20 ⁺
3	24	26 ⁺	18	20 ⁺	14	18 ⁺	19	22.5 ⁺
4	27.5	30 ⁺	20	24 ⁺	15.5	22 ⁺	23.5	26 ⁺
5	24.5	28 ⁺	19	20.5 ⁺	13.5	16.5 ⁺	22	25 ⁺
6	22	25 ⁺	18	18.5 ⁺	12	14.5 ⁺	20	21.5 ⁺
7	20	21 ⁺	17	17 ⁺	11	13.5 ⁺	19	19 ⁺
Strain days	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853							
	GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	18	19.5 ⁺	15.5	16 ⁺	13	14.5 ⁺	17.2	18.5 ⁺
3	21.5	22 ⁺	17	18.5 ⁺	14	16 ⁺	19	21 ⁺
4	24	25.5 ⁺	19	20.5 ⁺	15.5	18 ⁺	22	24 ⁺
5	23	23 ⁺	18.5	19.5 ⁺	13.5	17 ⁺	21	22.5 ⁺
6	20	21.5 ⁺	17	18 ⁺	13	14.5 ⁺	18	19.5 ⁺
7	19	19 ⁺	16	17 ⁺	12	13 ⁺	17	18 ⁺
Strain days	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 43816							
	GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	19	20.5 ⁺	15.5	17 ⁺	14	15.5 ⁺	17.5	19.8 ⁺
3	19.8	22 ⁺	17.8	18 ⁺	16.5	17.8 ⁺	19	21 ⁺
4	23	25 ⁺	20	21 ⁺	18.5	19.4 ⁺	22	24 ⁺
5	22.5	21 ⁺	18	19 ⁺	17	18 ⁺	21.2	20 ⁺
6	20.9	19 ⁺	16	17.5 ⁺	15.2	16.2 ⁺	19	19 ⁺
7	18.5	18 ⁺	15.5	16 ⁺	14.5	15.5 ⁺	18	17 ⁺
Strain days	<i>Serratia</i> sp. ATCC 39006							
	GY		M		S		GL	
1	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺	0	0 ⁺
2	18	19.2 ⁺	13	15 ⁺	13	17 ⁺	17	18 ⁺
3	19.5	20.5 ⁺	16	17.5 ⁺	17	18.5 ⁺	19.5	20 ⁺
4	23	24.8 ⁺	18.5	20.5 ⁺	20	21.2 ⁺	22	22.5 ⁺
5	22.5	23 ⁺	16.8	17 ⁺	18	19 ⁺	19	21 ⁺
6	22	22.2 ⁺	15	14 ⁺	16	17 ⁺	17.5	19.8 ⁺
7	20	19 ⁺	13	13 ⁺	13.8	15.8 ⁺	15.5	17 ⁺

GY: Glycerol; M: Maltose; S: Sucrose; GL: Glucose.
+ : *Peganum harmala* powder supplemented ISP2 medium (modified medium).

same conditions as the cultures and be taken in the growth exponential phase. The other common point is that of the production of antibiotics during the exponential phase. In contrast, the production of secondary metabolites by microorganisms generally can be occurred during the slowing and stationary phase (idiophase), while the production period is variable, and can take place in the exponential phase in actinomycetes [23].

4. Conclusions

Up to the authors' knowledge, this study is the first to investigate the effect of a specific culture medium of actinomycetes International *Streptomyces* Project-2 (ISP2) supplemented with *Peganum harmala* L. extract on the growth and the production of secondary metabolites of *Streptomyces*. As a result, the phytochemical compounds of the medicinal plant provided effective conditions promoting the actinomycetes growth and the production of secondary metabolites. The diversity and the associations between various actinobacterial activities and the relationship with the modified ISP2 medium (culture medium supplemented with substrates (e.g. plant powder extract)) can provide a new understanding of the synthesis of active biomolecules and offer opportunities to isolate novel therapeutic agents. Beyond the medium composition, fermentation conditions such as temperature and pH effectively promote antibacterial production. The influence of cellular growth, in particular, the pellet morphology of streptomycetes must be taken into consideration for optimal metabolite production.

Author contributions

- Study conception and design: A Nait Marzoug; F Khaldi.
- Data collection: A Nait Marzoug; A Ayari; I Guehria.
- Analysis and interpretation of results: A Nait Marzoug; A Ayari; I Guehria; A Gheid.
- Draft manuscript preparation: A Nait Marzoug; A Ayari; F Khaldi.
- Revision of the results and approval of the final version of the manuscript: A Nait Marzoug Amel; A Ayari; F Khaldi.

Conflict of interest

None.

References

- [1] Al-Dhabi NA, Esmail GA, Durairandyan V, et al. Chemical profiling of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-2 recovered from an extreme environment in Saudi Arabia as a novel drug source for medical and industrial applications. Saudi. J Biol Sci 2019;26(4):758–66. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.03.009>. PMID: 31049001.
- [2] Al-Dhabi NA, Esmail GA, Ghilan AKM, et al. Isolation and screening of *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-49 from the environment of Saudi Arabia with concomitant production of lipase and protease in submerged fermentation. Saudi. J Biol Sci 2020;27(1):474–9. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.011>. PMID: 31889873.
- [3] Bhakyashree K, Kannabiran K. Actinomycetes mediated targeting of drug resistant MRSA pathogens. J King Saud Univ - Sci 2020;32(1):260–4. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.034>.
- [4] Suresh RSS, Younis EM, Fredimoses M. Isolation and molecular characterization of novel *Streptomyces* sp. ACT2 from marine mangrove sediments with antidermatophytic potentials. J King Saud Univ - Sci 2020;32(3):1902–9. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.01.020>.
- [5] Boucher HW, Corey GR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2008;46(supp5):S344–9. <https://doi.org/10.1086/533590>. PMID: 18462089.
- [6] Al-Ansari M, Kalaiyarasi M, Almalki MA, et al. Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from *Streptomyces* sp. AS11 isolated from the marine environment. J King Saud Univ - Sci 2020;32(3):1993–8. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.02.005>.
- [7] Bérty J. Bioactive microbial metabolites. J Antibiot 2005;58(1):1–26. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>. PMID: 15813176.
- [8] Amin DH, Tolba S, Abolmaaty A, et al. Phylogenetic and antimicrobial characteristics of a novel *Streptomyces* sp. Ru87 isolated from Egyptian soil. Int J Curr Microbiol App Sci 2017;6(8):2524–41. <https://doi.org/10.20546/iicmas.2017.608.300>.
- [9] Ibrahim SY. Fermentation, extraction and characterization of antimicrobial agent from marine *Saccharomonospora viridis* AHK 190. Egypt J Microbiol 2018;53(9):9–21. <https://doi.org/10.21608/ejm.2018.2823.1046>.
- [10] Zaitlin B, Watson SB. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: myths, tenets and truths. Water Res 2006;40(9):1741–53. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.02.024>. PMID: 16600325.
- [11] Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J Nat Prod 2007;70(3):461–77. <https://doi.org/10.1021/np068054v>. PMID: 17309302.
- [12] Kämpfer P. Genus *Streptomyces*: the Actinobacteria. In: Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, et al. editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. United Kingdom: Springer Nature; 2012. p. 1777–81.
- [13] Vijayakumar R, Selvam KP, Muthukumar C, et al. Antimicrobial potentiality of a halophilic strain of *Streptomyces* sp. VPTSA18 isolated from the saltpan environment of Vedaranyam. India. Ann Microbiol 2021;62:1039–47. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0345-z>.
- [14] Al-shaibani MM, Radin Mohamed RMS, Sidik NM, et al. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from Phylum Actinobacteria and its therapeutic applications. Molecules 2021;26(15):4504. <https://doi.org/10.3390/molecules26154504>. PMID: 34361657.
- [15] Kannaiyan M, Manuel VN, Raja V, et al. Antimicrobial activity of the ethanolic and aqueous extracts of *Salacia chinensis* Linn. against human pathogens. Asian Pac J Trop Dis 2012;2(1):S416–20. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60194-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60194-7).
- [16] Achour S, Rhalem N, Khattabi A, et al. L'intoxication au *Peganum harmala* L. au Maroc : à propos de 200 cas. Therapies 2012;67(1):53–8. <https://doi.org/10.2515/therapie/2012003>. PMID: 22487503.
- [17] Habbachi W, Benhissen S, Ouakid ML, et al. Effets biologiques d'extraits aqueux de *Peganum harmala* (L.) (Zygophyllaceae) sur la mortalité et le développement larvaire de *Drosophila melanogaster* (Diptera - Drosophilidae). Algerian J Arid Environ 2013;3(1):82–8. <https://doi.org/10.12816/0008892>.
- [18] Bousliman Y, Ait EL Cadi M, EL Jaoudi R, et al. Les plantes toxiques au Maroc. Médecine du Maghreb 2012;196:9–26.
- [19] Ayari A, Morakchi H, Kirane-Gacemi D. Evaluation of antifungal activity of novel marine actinomycete, *Streptomyces* sp. AA13 isolated from sediments of Lake Oubeira (Algeria) against *Candida albicans*. Afr. J Microbiol Res 2016;10(6):156–71. <https://doi.org/10.5897/AJMR2013.7765>.
- [20] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Evol Microbiol 1966;16(3):313–40. <https://doi.org/10.1099/00207713-16-3-313>.
- [21] Ayari A, Morakchi H, Kirane GD. Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria. Afr J Biotechnol 2012;11(2):305–11. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2345>.
- [22] Pfefferle C, Theobald U, Gürtler H, et al. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. J Biotechnol 2000;80(2):135–42. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00249-2). PMID: 10908794.
- [23] Bouali H, Hamza K, Bouras N, et al. Effet de milieux de culture sur la croissance et la production de chloramphenicol chez deux souches de *Saccharothrix* sp. Pal 54 et Pal 42 isolées d'un sol de palmeraie de Ghardaïa. Algerian J Arid Environ 2017;7(1):71–83. <https://doi.org/10.12816/0045918>.
- [24] Parthasarathi S, Sathya S, Bupesh G, et al. Isolation, characterization and extraction of antimicrobial compound from marine actinomycete *Streptomyces hygroscopicus* BDUS 49. Res J Biotechnol 2013;8(3):40–8.
- [25] Sebak M, Saafan AE, Abdelghani S, et al. Isolation and optimized production of putative antimicrobial compounds from Egyptian soil isolate *Streptomyces* sp. MS. 10. Beni-Suef Uni J Basic Appl Sci 2021;10(8):1–12. <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00099-7>.
- [26] El-Shanshoury AER, Metwally AM, Sabha ME, et al. Biocontrol of *Aspergillus flavus* producing Aflatoxin B1 by *Streptomyces exfoliatus*. Egypt J Bot 2022;62(2):457–73. <https://doi.org/10.21608/eibo.2022.7763.1287>.
- [27] Salwan R, Sharma V. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. Microbiol Res 2020;231:126374. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126374> PMID: 31756597.
- [28] Quinn GA, Banat AM, Abdelhameed AM, et al. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. J Med Microbiol 2020;69(8):1040–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>. PMID: 32692643.
- [29] Pandey BP, Pradhan SP, Adhikari K, et al. Screening and molecular identification of *Streptomyces* species isolated from high altitude soil of

- Nepal. Korean J Microbiol 2021;57(3):174–82. <https://doi.org/10.7845/kjm.2021.1035>.
- [30] Demain AL, Dijkhuizen L. Ecology and industrial microbiology. Curr Opin Microbiol 2006;9(3):237–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.04.009>.
- [31] Voelker F, Altaba S. Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. Microbiol 2001;147(9):2447–59. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-9-2447>. PMID: 11535785.
- [32] Ilić SB, Konstantinović SS, Savić DŠ, et al. The impact of Schiff bases on antibiotic production by *Streptomyces hygroscopicus*. Med Chem Res 2010;19(7):690–7. <https://doi.org/10.1007/s00044-009-9223-7>. PMID: 20700374.



Réf. SBS-A53

SEMINAIRE NATIONAL 'webinaire'

Bio-ressources: Nutrition, Santé et Environnement - 17 et 18 Mai 2021

ATTESTATION DE PARTICIPATION

Le comité scientifique du séminaire atteste que

Melle/Mme/Mr : **NAIT MARZOUG AMEL**

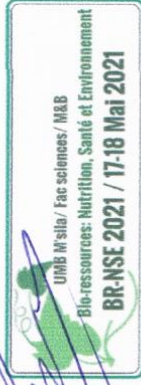
A présenté une communication : **Affichée**

Intitulée : **Phytochemical study of Peganum harmala L. (zygophyllaceae)**

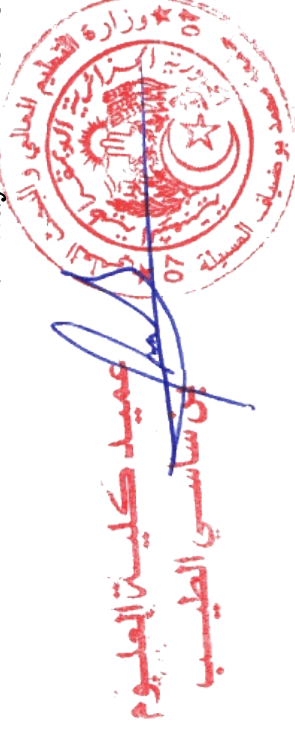
Co-auteurs : **Khalidi, F. and Ayari, A.**

Le Président du Séminaire

Dr. Noui HENDEL



Le Doyen de la Faculté des Sciences
Pr. Ettayib BENSACI

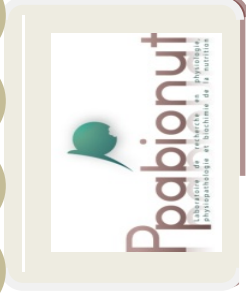




République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Tiemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la Terre et de l'Univers



Laboratoire de Physiologie, Physiopathologie et Biochimie de la Nutrition (PPABIONUT)

Webinaire National sur

« **Valorisation des matières résiduelles du secteur agro-alimentaire** »

Samedi 26 Juin 2021

ATTESTATION DE COMMUNICATION

LA PRÉSIDENTE DU COMITÉ SCIENTIFIQUE ATTESTE QUE LA COMMUNICATION AFFICHÉE :

INTITULÉE : COMPOSITION CHIMIQUE, COMPOSÉS PHÉNOLIQUES ET ACTIVITÉ ANTIRADICALAIRE DE L'EXTRAIT HYDRO-MÉTHALONIQUE DES GRAINES DE PEGANUM HARMALA.

A ÉTÉ PRÉSENTÉE PAR : NAIT MARZOUG Amel

CO-AUTEURS: KHALDI F, AYARI A

AFFILIATION : Laboratoire des Sciences et Techniques de l'Eau et Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la vie, Université de Mohamed Cherif Messaadia, Souk Ahras,

LA DOYENNE

Pr Mokhtari Nassima

LA PRÉSIDENTE DU COMITE SCIENTIFIQUE



MERZOUK H

Saad Dahlab University, Blida-1
Faculty of Natural and life sciences



Certificate OF ATTENDANCE



This certificate is proudly awarded to

NAIT MARZOUG Amel

Co-authors :Fadila Khaldi, Adel Ayari

Has successfully participated at the

1ST INTERNATIONAL WEBINAR ON BIOLOGICAL AND CHEMICAL ENGINEERING

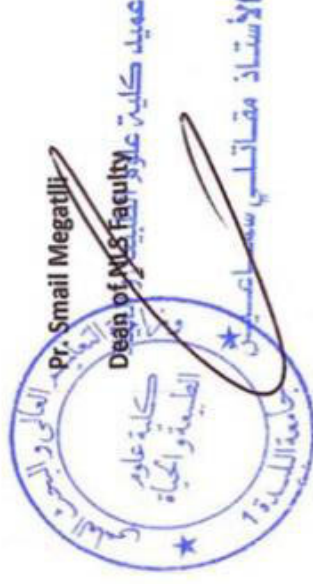
Held with the support of Faculty of Natural and Life Sciences-Blida1 University-Algeria, on November 10th & 11th, 2021,

By presenting an e-poster entitled:

Acetylcholinesterase Inhibitory Activity From Peganum Harmala Seeds As Alzheimer's Disease Treatment



Dr. Farida KADRI
Chair of IWBCCE 2021



Pr. Smail Megatliji
Dean of NLS Faculty
عميد كلية علوم الحياة والبيئة
الأستاذ مقصطي سماعيل

Activités biologiques et caractérisations biochimiques des extraits de la plante *Peganum harmala* : effet sur la cinétique de croissance et production des métabolites des actinomycètes (*Streptomyces ayarius* sp. S115)

Résumé

Ce travail contribue à l'étude des activités biologiques des différents extraits obtenus à partir de la plante *Peganum harmala* L. et leur effet sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *Streptomyces ayarius* sp. S115. Un criblage phytochimique a été effectué afin d'identifier les principaux groupes chimiques présents. L'analyse quantitative a été faite en mesurant le contenu en polyphénols et flavonoïdes totaux. La puissance antioxydante des extraits a été évaluée *in vitro* par huit méthodes différentes. L'activité enzymatique a été estimée par la méthode d'Ellman. Les caractéristiques morphologiques et l'activité antibactérienne de la souche *S. ayarius* sp. S115 ensemencée dans les milieux ISP2 et ISP2 modifié a été évaluée par la méthode de diffusion sur puits. La biomasse de la souche *S. ayarius* sp. S115 dans les deux milieux a été déterminée. La cinétique de croissance et la production de métabolites secondaires ont été étudiées pendant 7 jours avec différentes sources de carbone et d'azote. Le criblage phytochimique a révélé la présence de nombreuses classes de métabolites secondaires. La fraction acétate d'éthyle contenait la teneur la plus élevée en polyphénols et flavonoïdes ($237,23 \pm 1,06 \mu\text{g EAG}/\text{mg}$ d'extrait et $82,58 \pm 0,03 \mu\text{g EQ}/\text{mg}$ d'extrait respectivement). La fraction acétate d'éthyle à haute teneur phénolique a présenté également la plus forte activité antioxydante. En outre, la fraction chloroformique a montré l'effet inhibiteur le plus puissant contre l'acétylcholinestérase et la butyrylcholinestérase (CI50: $14,69 \pm 0,10$ et $7,36 \pm 0,77 \mu\text{g}/\text{ml}$ respectivement). La culture sur l'ISP2 modifié a montré une croissance importante de la souche *S. ayarius* sp. S115 avec un changement de couleur du mycélium aérien de gris au blanc. L'activité antibactérienne a révélé des grandes zones d'inhibition contre les bactéries pathogènes testées par rapport à celles de l'ISP2 avec des zones d'inhibition allant de 13,5 mm à 60,5 mm. Ainsi, la quantité de biomasse de la souche *S. ayarius* sp. S115 était deux fois plus élevée dans l'ISP2 modifié. L'effet des différents sources de carbone et d'azote sur la croissance et la production de métabolites secondaires de la souche *S. ayarius* sp. S115 a révélé que la biomasse et les activités antibactériennes les plus élevées étaient obtenues en utilisant du glucose et du tryptone dans l'ISP2 modifié alors que, le glycérol et l'extrait de levure ont été trouvés comme des sources de carbone et d'azote optimales dans l'ISP2. La présente étude a permis de confirmer l'efficacité de la plante comme un ingrédient important dans la composition du milieu ISP2 nécessaire pour la culture des *Streptomyces* producteurs d'antibiotiques et d'apporter une preuve biologique mesurable de son pouvoir antioxydant et anti-cholinestérase.

Mots clés : *Peganum harmala* L., teneur en polyphénols, activités antioxydantes, activité anti-cholinestérase, *Streptomyces ayarius* sp. S115, activité antibactérienne, biomasse, croissance.

Abstract

This work contributes to the study of the biological activities of different extracts obtained from the plant *Peganum harmala* L. and their effect on the growth and production of secondary metabolites of *Streptomyces ayarius* strain sp. S115. A phytochemical screening was performed to identify the main chemical groups present. Quantitative analysis was done by measuring the total polyphenol and flavonoid content. The antioxidant power of extracts was evaluated *in vitro* by eight different methods. Enzymatic activity was estimated by Ellman's method. The morphological characteristics and antibacterial activity of *S. ayarius* strain sp. S115 seeded in ISP2 and the modified ISP2 media was evaluated by well diffusion method. The biomass of *S. ayarius* strain sp. S115 in both media was determined. Growth kinetics and production of secondary metabolites were studied for 7 days in different carbon and nitrogen sources. The phytochemical screening revealed the presence of numerous classes of secondary metabolites. The ethyl acetate fraction contained the highest content of polyphenols and flavonoids ($237.23 \pm 1.06 \mu\text{g GAE}/\text{mg}$ of extract and $82.58 \pm 0.03 \mu\text{g QE}/\text{mg}$ of extract, respectively). The ethyl acetate fraction with high phenolic content also exhibited the strongest antioxidant activity. In addition, the chloroform fraction showed the most potent inhibitory effect against acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase (IC50: 14.69 ± 0.10 and $7.36 \pm 0.77 \mu\text{g}/\text{ml}$, respectively). Culture on the modified ISP2 showed an effective growth of *S. ayarius* strain sp. S115 with changed color of the aerial mycelium from gray to white. The antibacterial activity revealed large inhibition zones against the tested pathogenic bacteria compared to those of ISP2 with inhibition zones ranging from 13.5 mm to 60.5 mm. Thus, the amount of *S. ayarius* strain sp. S115 biomass was twice as high in the modified ISP2. The effect of different carbon and nitrogen sources on the growth and production of secondary metabolites of *S. ayarius* strain sp. S115 revealed the highest biomass and antibacterial activities were obtained through using glucose and tryptone in the modified ISP2, whereas glycerol and yeast extract were found as the optimal carbon and nitrogen sources in ISP2. The present study confirmed the effectiveness of the plant as an important ingredient in the ISP2 medium required for the culture of antibiotic-producing *Streptomyces* and provided measurable biological proof of its antioxidant and anti-cholinesterase power.

Key words : *Peganum harmala* L., polyphenol content, antioxidant activities, anti-cholinesterase activity, *Streptomyces ayarius* sp. S115, antibacterial activity, biomass, growth.

المخلص

يساهم هذا العمل في دراسة الأنشطة البيولوجية للمستخلصات المختلفة التي تم الحصول عليها انطلاقاً من نبات *Peganum harmala* L. وتأثيرها على نمو وإنتاج الأيض الثانوي لسلسلة S115 *Streptomyces ayarius* sp. تم إجراء فحص كيميائي نباتي لتحديد المجموعات الكيميائية الرئيسية الموجودة. تم تنفيذ التحليل الكمي عن طريق قياس المحتوى الكلي للبوليفينول والفلافونويد. تم تقييم فعالية المستخلصات المضادة للأوكسدة في المختبر بثمانية طرق مختلفة. أما بالنسبة للنشاط الأنزيمي فقد تم تقديره وفق طريقة Ellman's. تم تقييم الخصائص المورفولوجية والنشاط المضاد للبكتيريا لسلسلة S115 *S. ayarius* sp. المزروعة في الأوساط ISP2 و ISP2 المعدل بواسطة طريقة الانتشار على الإبار. كما تم تحديد الكتلة الحيوية لسلسلة S115 *S. ayarius* sp. في كلا الوسيطين. أيضاً تمت دراسة حركة النمو وإنتاج الأيض الثانوي لمدة 7 أيام بمصادر مختلفة من الكربون والازوت. كشف الفحص الكيميائي النباتي عن وجود فئات عديدة من الأيض الثانوي. حيث احتوى جزء أسيتات الإيثيل على أعلى كمية من البوليفينول والفلافونويد (237.23 ± 1.06 مكغ مكافئ حمض الغاليك/مغ من المستخلص و 82.58 ± 0.03 مكغ مكافئ كيرسيتين/مغ من المستخلص على التوالي). كما أظهر جزء أسيتات الإيثيل ذو المحتوى الفينولي الكبير أعلى نشاط مضاد للأوكسدة. بالإضافة إلى ذلك، سجل جزء الكلوروفورم التأثير المثبط الأكثر فعالية ضد الأسيتيل كولينستراز والبوليترييل كولينستراز (CI50: $14,69 \pm 0,10$ و $7,36 \pm 0,77$ مكغ/مغ على التوالي). أظهرت الزراعة على ال ISP2 المعدل نمواً ملحوظاً في سلسلة S115 *S. ayarius* sp. مع تغير لون الميسيليوم الهوائي من الرمادي إلى الأبيض. كما أظهر النشاط المضاد للبكتيريا عن وجود مناطق تثبيط كبيرة تتراوح ما بين 13,5 مم و 60,5 مم ضد البكتيريا المسببة للأمراض التي تم اختبارها مقارنة بتلك الموجودة في ال ISP2. كذلك، كانت كمية الكتلة الحيوية لسلسلة S115 *S. ayarius* sp. أعلى بضعفين في ال ISP2 المعدل. بينت الدراسة تأثير مصادر الكربون والازوت المختلفة على نمو وإنتاج الأيض الثانوي لسلسلة S115 *S. ayarius* sp. أن أعلى كتلة حيوية وأنشطة مضادة للبكتيريا تم الحصول عليهم عند استخدام الجلوكوز والتركيبات في ال ISP2 المعدل بينما، تم العثور على الجليسيرول ومستخلص الخميرة كمصادر كربون مثالية في ال ISP2. أكدت الدراسة الحالية فعالية النبات كمكون مهم في وسط ال ISP2 الضروري لزراعة *Streptomyces* المنتجة للمضادات الحيوية وقدمت دليلاً بيولوجياً قابلاً للقياس لمضادات الأوكسدة والكولينستراز.

الكلمات المفتاحية : *Peganum harmala* L., محتوى البوليفينول، الأنشطة المضادة للأوكسدة، النشاط المضاد للكولينستراز، *Streptomyces ayarius* sp. S115، الكتلة الحيوية، النمو.