

N° d'ordre :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE CHIMIE



DOMAINE : SCIENCES DE LA MATIERE
FILIERE : CHIMIE

MEMOIRE DE MASTER

SPECIALITE : CHIMIE PHARMACEUTIQUE

THEME

Recherche d'activités antioxydante et antibactérienne chez une souche locale de champignons comestibles cultivée sur certains résidus agricoles

Présenté par :

**GHEZAL
CHEMAM**

**Lynda
Hassiba**

Soutenu publiquement, le 28 / 09 / 2017, devant le Jury composé de :

FERNANE	FARIDA	Pr	à l'UMMTO	PRESIDENT
MANSOUR-BENAMAR	MALIKA	MCB	à l'UMMTO	ENCADREUR
DERMACHE	LEILA	MCA	à l'UMMTO	EXAMINATEUR
AICHE-IRATNI	GHENIMA	MCB	à l'UMMTO	EXAMINATEUR

Tables des matières

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Premier chapitre : Synthèse bibliographique sur <i>Pleurotus ostreatus</i>	
I. Généralités sur <i>Pleurotus ostreatus</i>	2
I.1. Définition	2
I.2. Systématique	2
I.3. Description	2
I.4. Biocycle de <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
I.5. Valeur nutritive	4
I.6. Saveur	5
I.7. Composition chimique	5
I.8. Substrats utilisés pour la culture du <i>Pleurotus ostreatus</i> local	6
I.8.1. Grignon d'olive	6
I.8.1.1. Définition	6
I.8.1.2. Composition chimique	6
I.8.2. Marc de café	6
I.8.2.1. Définition	6
I.8.2.2. Composition chimique	7
I.8.3. Paille.....	7
I.8.3.1. Définition	7
I.8.3.2. Composition chimique	7
II. Propriétés pharmacologiques de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
II.1. Utilisations en médecine traditionnelle	9
II.2. Effet préventif sur l'apparition de tumeurs	9
II.3. Effet pharmacologique d'extrait hydrosoluble de <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
II.4. Effet pharmacologique d'extrait aqueux de <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
II.5. Potentiel antimicrobien	10
II.6. Activité antidiabétique.....	10
II.7. Potentiel immunomodulateur	10
II.8. Potentiel anti-hypercholestérolémique	11
II.9. Potentiel antiviral	11
II.10. Potentiel antioxydant	11

II.10.1. Molécules responsables de l'activité antioxydante	12
II.10.1.1. Polyphénols	12
II.10.1.2. Flavonoïdes.....	13
II.10.1.3. Tanins	13

Deuxième chapitre : Matériels et méthodes

I. Matériels	14
I.1. Matériel mycologique	14
I.2. Matériel bactériologique	14
I.2.1. Milieux de culture	14
I.2.2. Souches bactériennes	15
I.2.2. Antibiotique	15
I.3. Réactifs chimiques	15
I.4. Appareils utilisés	15
II. Méthodes d'étude	16
II.1. Préparation de la poudre lyophilisée de l'extrait aqueux du <i>Pleurotus ostreatus</i>	16
II.1.1. Rendements en lyophilisat de l'extrait aqueux de <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
II.2. Dosages effectués	18
II.2.1. Dosage des polyphénols totaux	18
II.2.1.2. Préparation du réactif de folin ciocalteu	19
II.2.2. Dosage des flavonoïdes.....	19
II.2.3. Dosage des tanins	20
II.2.3.1. Préparation du tampon A.....	21
II.2.3.2. Préparation de la solution de BSA	21
II.2.3.3. Préparation de la solution de FeCl ₃	21
II.3. Activités biologiques recherchés	21
II.3.1. Recherche de l'activité antioxydante des extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
II.3.2. Recherche de l'activité antibactérienne des extraits aqueux du <i>Pleurotes Ostreatus</i> local	23
II.4. Préparation des milieux de culture	24
II.4.1. Préparation du milieu BHIB	24
II.4.2. Préparation du milieu MHA	25
II.5. Préparation des souches bactériennes	25
II.6. Préparations des solutions et milieux de culture	25

II.7. Ensemencement.....	25
II.8. Préparation des disques de papier absorbant.....	25
II.9. Mesure des diamètres d'inhibition.....	25
II.10. Analyses statistiques des résultats.....	26
Troisième Chapitre : Résultats et discussions	
I. Résultats et discussion	27
I.1. Rendements en poudre lyophilisée de l'extrait aqueux de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
I.2. Dosage des polyphénols totaux	27
I.3. Dosage des flavonoïdes.....	29
I.5. Dosage des Tanins totaux	31
I.6. Activité anti-oxydante.....	32
I.6.1. Capacité de piégeage de radical libre DPPH	32
I.7. Activités antibactérienne.....	35
I.8. Etude statistique.....	38
Conclusion	40
Références bibliographiques	41
Résumé	

Liste des Figures

Figure 1 : <i>Pleurotus ostreatus</i>	3
Figure 2 : Cycle de culture de <i>Pleurotus ostreatus</i>	4
Figure 3 : Propriétés pharmacologiques de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes.....	13
Figure 5 : Schéma explicatif des étapes d'obtention de la poudre lyophilisée des carpophores de <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
Figure 6 : Schéma explicatif des étapes du dosage des polyphénols totaux	18
Figure 7 : Schéma explicatif des étapes du dosage des flavonoïdes	19
Figure 8 : Schéma explicatif des étapes du dosage des tanins	20
Figure 9 : Réaction de l'antioxydant avec le DPPH.....	21
Figure 10 : Schéma explicatif du teste de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique ...	22
Figure 11 : Schéma explicatif du teste de piégeage du radical DPPH par l'échantillon	23
Figure 12 : Schéma explicatif des étapes de la recherche de l'activité antibactérienne des extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
Figure 13 : Comparaison des rendements des quatre extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
Figure 14 : Courbe étalon de l'acide gallique.....	27
Figure 15 : Courbe d'étalonnage de la quercétine.....	29
Figure 16 : courbe étalon de l'acide tannique	30
Figure 17 : pourcentage d'inhibition du DPPH de l'extrait de <i>Pleurotus ostreatus</i> ayant poussé sur GO	31
Figure 18 : pourcentage d'inhibition du DPPH de l'extrait de <i>Pleurotus ostreatus</i> ayant poussé sur MC.....	31
Figure 19 : pourcentage d'inhibition du DPPH de l'extrait de <i>Pleurotus ostreatus</i> ayant poussé sur PB	32
Figure 20 : pourcentage d'inhibition du DPPH de l'extrait de <i>Pleurotus ostreatus</i> ayant poussé sur M	32
Figure 21 : Courbe étalon de l'acide ascorbique (vitamine C).....	32

Figure 22: Valeurs d'IC50 des composées testés comparativement à celui de l'acide ascorbique.....	33
Figure 23 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de <i>Pleurotus ostreatus</i> local récolté sur Grignon d'olive	35
Figure 24 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de <i>Pleurotus ostreatus</i> local récolté sur marc de café	35
Figure 25 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de <i>Pleurotus ostreatus</i> local récolté sur paille de blé	35
Figure 26 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de <i>Pleurotus ostreatus</i> local récolté sur le substrat mélange (GO-MC-PB)	35

Liste des tableaux

Tableau 1 : Composition chimique de <i>Pleurotus ostreatus</i>	5
Tableau 2 : Composition chimique de grignon d'olive.....	6
Tableau 3: Composition chimique du marc de café.....	7
Tableau 4 : Composition chimique de la paille de blé	7
Tableau 5 : Rendements en poudre lyophilisée des extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i>	26
Tableau 6 : Concentration des polyphénols dans les extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i> local	27
Tableau 7 : Concentration des polyphénols dans les extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i> local	29
Tableau 8 : Concentration des polyphénols dans les extraits de <i>Pleurotus ostreatus</i> local	36

Remerciements

Nous remercions Allah de nous avoir aidés à réaliser ce travail.

Cette étude a été réalisée au niveau du Laboratoire de Production, Amélioration et Protection des Végétaux de la Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques (FSBSA) de l'Université Mouloud MAMMERI de Tizi-Ouzou (UMMTO) sous la direction du Docteur MANSOUR-BENAMAR Malika.

Au terme de ce travail, nous exprimons notre gratitude et nos sincères remerciements ainsi que notre profond respect à Madame MANSOUR-BENAMAR Malika, Maitre de conférences classe B à la FSBA (UMMTO) pour nous avoir encadrées, guidées, conseillées et suivies attentivement dans la réalisation de ce mémoire de Master II.

Nous remercions Madame FERNANE FARIDA, Professeur à la Faculté des Sciences (UMMTO), qui nous fait honneur de présider le jury, qu'elle trouve ici l'expression de notre profond respect.

Nos sincères remerciements s'adressent à Madame DERMECHE LEILA Maitre de conférences classe A à la Faculté des Sciences (UMMTO), qui nous fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail.

Nos sincères remerciements s'adressent également à Madame IRATNI-AICHE GHENIMA Maitre de conférences classe B à la FSBA (UMMTO), qui nous fait l'honneur d'examiner et de juger ce travail ainsi que pour toute l'aide qu'elle nous a apporté et le temps qu'elle nous a consacré tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Nos sincères remerciements s'adressent au Professeur HOUALI Karim qui nous a ouvert son laboratoire et nous a autorisé à y travailler, qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect.

Un grand merci à Madame RABHI HOURJA pour sa patience et toute l'aide qu'elle nous a apporté.

Que toutes les personnes qui ont contribué à la réalisation et à la finalisation de ce mémoire trouvent ici l'expression de nos vifs remerciements et notre profonde reconnaissance

DEDICACES

*Je dédie ce travail à mes **Parents** qu'ils trouvent ici toute ma gratitude*

Pour leur soutien tout le long de mes études

*A mes **Sœurs** (**Kenza, Katia, doudouche et fafi**) et à mon **Frère** (**Amar**)*

*A mes **cousins** et mes **cousines***

*A tous mes **amis** et mes **camarades***

A ceux qui m'aiment, qui font partis de ma vie

LYNDA

DEDICACES

*Je dédie ce travail à mes chers **Parents** pour leur soutien moral et financier, pour leurs encouragements tout le long de mes études*

*A mes **Frères** (**Mohand, Mustapha, Ferhat, Loucif et Nadir**) et mes **sœurs** (**Chouchou, Sousou, Kaissa et Dido**)*

*À mes **beaux frères** (**Hafid, Hamid, Karim et Aissa**) et mes **belles sœurs** (**Kamelia, Karima, Yasmine et Chacha**)*

*A mes **nièces**, plus particulièrement **Chanez et Manel** ainsi qu'a mes **neveux***

*A tous mes **amis** et mes **camarades***

A ceux qui m'aiment, qui font partis de ma vie et qui m'ont tout donné

HASSIBA

INTRODUCTION

Depuis des milliers d'années, l'être humain a utilisé diverses ressources trouvées dans son environnement afin de traiter et soigner différentes maladies. Actuellement, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) estime qu'environ 80% des habitants de la terre ont recours aux préparations traditionnelles à base de plantes en tant que soins de santé primaire (Athamena, 2009).

Aux côtés des plantes utilisées, de nombreux macromycètes (gros champignons) sont connus pour leur vertu médicinale et certains d'entre eux sont déjà utilisés à ces fins (Patel et al, 2012). Selon Deepalakshmi & Mirunalini (2014), les champignons comestibles constituent une partie intégrale du régime alimentaire humain et ces derniers temps, les quantités et les variétés de champignons consommés ont augmentés considérablement.

Le genre *Pleurotus* comporte environ 40 espèces différentes. Parmi ces espèces, *Pleurotus ostreatus* qui est consommé un peu partout dans le monde, en raison de son goût, de sa saveur et de sa valeur nutritive élevée (protéines, vitamines et éléments minéraux) ainsi que pour ses propriétés médicinales (Lindequist, 2005).

Cette espèce de Pleurote serait prometteuse selon Deepalakshmi & Mirunalini (2014) car elle posséderait des propriétés, hématologiques, antivirales, antibiotiques, et des activités hypocholestérolémiantes et immunomodulatrices et serait source d'antioxydants

Selon Blandeau (2012), *Pleurotus ostreatus* fait partie des champignons ayant un grand intérêt anticancéreux. Il serait plus efficace que d'autres champignons tout en étant très bien toléré. Il possède un large spectre d'action. En outre il présente l'avantage de pouvoir être cultivé sur divers résidus agricoles (Mansour-Benamar, 2016).

La culture de champignons comestibles est également un moyen judicieux de recyclage de déchets organiques

Le but de notre étude est de vérifier si les carpophores de la souche locale de *Pleurotus ostreatus* (Jacq ex Fries) Kummer (POL) isolée à Oued-Aissi (Tizi-Ouzou, Algérie) et cultivée sur différents résidus agricoles à savoir le grignon d'olive (résidu de l'extraction d'huile d'olive), le marc de café (résidu de la consommation du café), la paille de blé (résidu de la récolte de grain de blé) et le mélange de ces trois résidus agricoles, pouvaient présenter des activités antioxydantes et antibactériennes. Si oui est-ce-que ces substrats de cultures ont une influence sur ces activités ?

Le mémoire est divisé en deux parties :

- Une synthèse bibliographique présentée dans le chapitre I et portant sur des généralités sur la souche de champignon comestible d'intérêt à savoir *Pleurotus ostreatus* et les substrats de culture utilisés.
- Une partie expérimentale divisée en deux chapitres numéroté II et III.
 - Dans le chapitre II, nous présenterons le matériel et les méthodes d'étude que nous avons utilisé pour rechercher des activités antioxydantes et antibactériennes chez les carpophores de *Pleurotus ostreatus* local récoltés sur les quatre substrats de culture.
 - Dans le chapitre III nous présenterons et discuterons les résultats obtenus.

PREMIER CHAPITRE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur *Pleurotus ostreatus*

I.1. Définition

Le mot Pleurote désigne le nom générique d'un groupe de champignons caractérisés en général par un pied latéral, des lames anastomosées vers le pied formant l'hymenium (tissu fertile), un chapeau charnu et des spores blanchâtres pouvant être parfois colorées (figure 1a).

Les Pleurotes sont des champignons Basidiomycètes saprophytes cellulolytiques car ils sont aptes à s'alimenter et à se développer sur substrat riche en cellulose (Durrieu, 1993).

Pleurotus ostreatus appelé communément Pleurote en forme d'huître ou Pleurote en huître est un champignon comestible qui pousse aussi bien sur le bois que sur la paille et offre ainsi la possibilité de valoriser divers déchets agro-industriels (paille de céréale, marc de café, grignon d'olive...etc.) (Mansour-Benamar et al, 2016).

Etant décomposeur primaire (dégradent les substances lignocellulosiques) (Rajarathnam&Bano, 1989), il s'attaque naturellement aux souches d'arbres morts ou parfois aux arbres en état de faiblesse, mais jamais aux arbres sains (Delmas, 1989).

I.2. Systématique

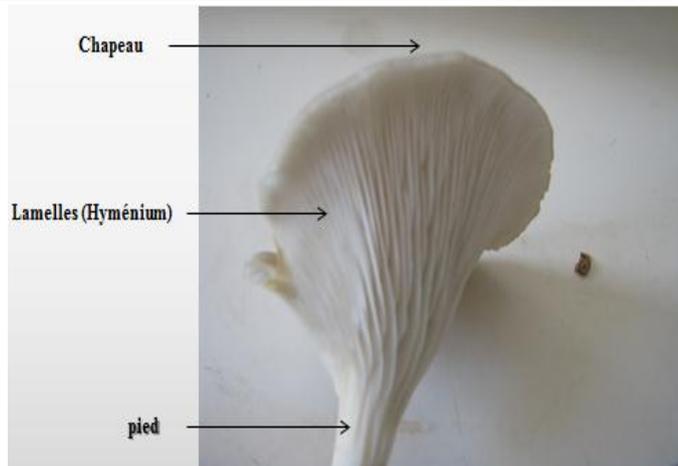
La systématique du Pleurote en huître rapportée par Mansour-Benamar (2016) est la suivante :

Règne	: Fungi
Division	: Basidiomycota
Classe	: Agaricomycetes
Sous Classe	: Agaricomycetidae
Ordre	: Agaricales
Famille	: Pleurotaceae
Genre	: <i>Pleurotus</i>
Espèce	: <i>P.ostreatus</i> (Jacq.Ex. Fries) Kummer (1871) : <i>P. ostreatus</i> (Jacq. P. Kumm (1871)

I.3. Description

Pleurotus ostreatus est un Basidiomycète à lamelles, bon comestible, qui pousse en touffes (figure 1). Il est formé, comme nous l'avons dit précédemment, par un pied et un chapeau.

Le chapeau, légèrement bombé au début, s'étale ensuite en éventail ; il est charnu, marron grisâtre, a entre 4 à 15 cm de diamètre. Les marges du chapeau sont incurvées et lisses. Les lamelles sont blanchâtres, serrées et longuement décurrentes, plus espacées vers le pied.



Le pied (ou stipe) est excentré, très court, parfois absent, plein, poilu à la base, ayant 1-10cm de longueur et 1-3cm de diamètre (Delmas, 1989). Il n'a pas d'anneau et pas de volve.

La chair est blanche et épaisse, tendre sauf le pied.

Les basides portent quelques rares basidiospores (7.5-11x3-4µm).



Figure 1: *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex. Fries) Kummer (1871) souche locale (Mansour-Benamar & Ammar-Khodja, 2017)

I.4. Biocycle de *Pleurotus ostreatus*

Dans la nature, le cycle biologique de *P.ostreatus*, se divise en deux phases distinctes, la phase végétative et la phase fructifère

La première phase correspond à la croissance et au développement dumycélium primaire monocaryotique issu de la germination d'une basidiospore.

La deuxième phase correspond à la formation descarpophores. Elle démarre avec la conjugaison (plasmogamie) de deux mycéliums compatibles donnant naissance à un mycélium secondaire dicaryotique, qui à son tour, rentre en phase de croissance. Cette phase est caractérisée par la formation de boucles d'anastomoses (Delmas, 1989). Cette phase correspond également au cycle de culture (figure 2) (Mansour-Benamar, 2016).

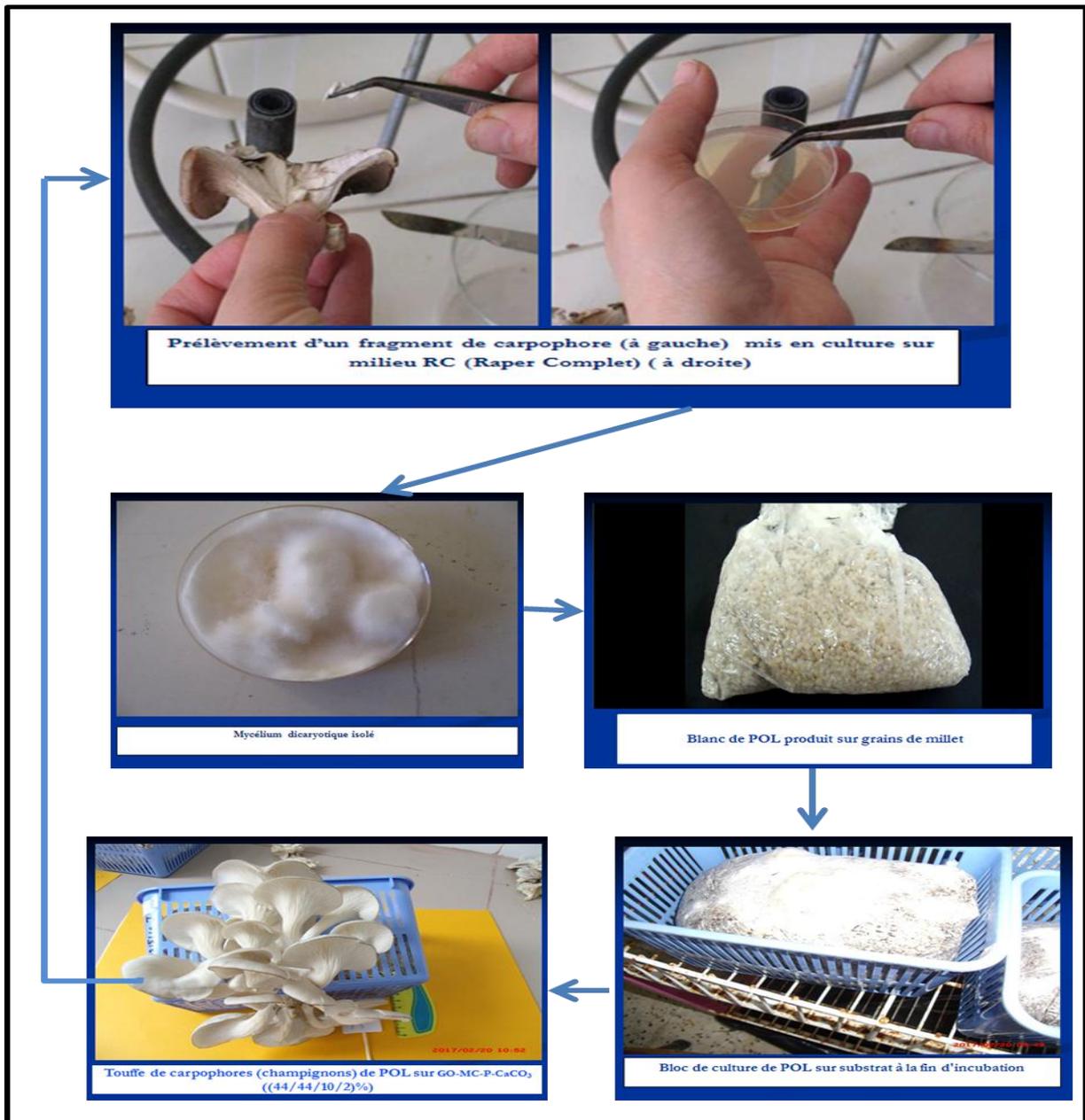


Figure 2: Cycle de culture de *Pleurotus ostreatus* local (Mansour-Benamar et Ammar-Khodja, 2017)

I.5. Valeur nutritive

Pleurotus ostreatus est la troisième espèce de champignons, après le shiitake et le champignon de Paris, cultivée à travers le monde à des fins culinaires. Il est riche en protéines, fibres, carbohydrates, minéraux et vitamines et présente l'avantage d'être pauvre en matière grasse (tableau 1) d'où l'intérêt de son utilisation dans les repas de régime (Delmas 1998).

Selon Deepalakshmi & Mirunalini (2014), cette composition diffère selon que le champignon soit d'origine commerciale ou sauvage ; elle dépend également des conditions de culture, de la nature et de l'origine du substrat de culture utilisé ainsi que du procédé d'extraction des composés.

I.6. Saveur

Selon Deepalakshmi & Mirunalini (2014), les composés aromatiques présents dans le champignon stimulent l'appétit et donnent aux plats cuisinés avec *P. ostreatus* une saveur caractéristique. Sur différentes espèces de champignons comestibles, environ 150 composés aromatiques ont pu être identifiés ; les carbonates d'alcools octavalants et les composés carbonyles seraient responsables de cette saveur unique. Parmi ces composés se trouvent l'octanol, le 3-octanone et le 1-octynol-3-ol.

Le goût du champignon dépend, également, des acides aminés présents, des nucléotides, d'autres éléments comme l'azote, le fer, le soufre, le zinc et le potassium mais aussi de l'auto-oxydation des acides gras insaturés (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

I.7. Composition chimique

P. ostreatus est composé de plusieurs éléments regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1: Composition chimique de *Pleurotus ostreatus* (Blandeau, 2012)

Éléments	Taux de présence
Protéines brutes	27,4%
Lipides	1%
Hydrates de carbone totaux	65%
Fibres	8,3%
Cendres	6,6%

Contrairement aux végétaux, les champignons renferment tous les acides aminés essentiels qui ne peuvent pas être synthétisés par l'Homme (isoleucine, leucine, lysine,

méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine) et qu'il doit trouver dans son alimentation.

I.8. Substrats utilisés pour la culture de *Pleurotus ostreatus* local

Le substrat est le matériau sur lequel pousse le mycélium. Selon Oei (1993), les propriétés du substrat déterminent quels microorganismes peuvent s'y développer, toutefois, l'environnement joue aussi un rôle important car c'est l'association des conditions internes au substrat et des conditions environnementales qui déterminent la possibilité de croissance du mycélium.

Quelques champignons peuvent s'adapter à une large gamme de substrats et poussent sur le bois de presque tous les feuillus, c'est le cas du Pleurote, tandis que le Shiitake, par exemple, requiert des arbres plus spécifiques (l'arbre shii) pour se développer. La sélectivité du substrat aux besoins du champignon cultivé et son inadéquation aux autres organismes sont importantes lors de la culture de champignon (Oei, 1993). La sélectivité dépend des substances nutritives présentes, du pH, de l'activité microbienne, de l'aération, de la teneur en eau, ou plus exactement de l'activité en eau disponible et de substances assimilables disponibles.

I.8.1. Grignon d'olive

I.8.1.1. Définition

Le résidu solide généré lors de l'extraction de l'huile d'olive est appelé grignon ou tourteau d'olives (Sansoucy, 1984).

I.8.1.2. Composition chimique

La composition chimique du grignon d'olive (tableau 3) dépend étroitement de la variété d'olive, du degré de maturation des olives et du système employé lors de l'extraction de l'huile d'olive (Nefzaoui, 1991).

Tableau 2: Composition chimique de grignon d'olive (Nefzaoui, 1991).

Substrat	Matière sèche (MS) en (%) de matière fraîche	Matière Minérale en (%MS)	Matière azotée totale (% MS) MS	Cellulose Brute en (%MS)	Matière grasse en (%MS)
Grignon d'olive	75 - 80	3 - 5	5-10	35-50	8-15

I.8.2. Marc de café

I.8.2.1. Définition

Le marc de café est le résidu de la consommation du café soluble obtenu après torréfaction des grains de café marchands, après mouture et extraction à l'eau bouillante ou à la vapeur d'eau (Mansour-Benamar et al, 2016).

I.8.2.2. Composition chimique

Les glucides sont des éléments les plus abondants dans le marc de café. Il s'agit du mannose (46,8 %), galactose (30,4 %) et glucose (19%) (Carassou, 2015). Le marc de café est composé de plusieurs éléments (tableau 5)

Tableau 3: Composition chimique du marc de café (Carassou, 2015).

Composés	Quantités	Minéraux	Quantités (mg/kg)
Glucides	45,3%	Potassium	8824 ± 4662
Lipides	9,3-16,2 %	Phosphore	1534 ± 503
Protéines	14%	Magnésium	2201 ± 1341
Minéraux	6800 mg/kg de matière sèche	Calcium	349 ± 122
Polyphénols	13-18 mg acide gallique équivalent.	Fer	46 ± 21
		Manganèse	27 ± 10
		Cuivre	25 ± 12

1.8.3. Paille

I.8.3.1. Définition

La paille de blé est constituée par la tige avec les feuilles et l'épi ou rachis à son sommet secs (Zeitoun, 2011).

I.8.3.2. Composition chimique

D'une manière générale, les pailles de céréales sont riches en constituants pariétaux, fort incrustés de lignine, riche également en minéraux dont une partie de silice, mais pauvres en matières azotées et en matières grasses (tableau 4) (Février & Willequet, 2009).

Tableau 4: Composition chimique de la paille de blé (Février & Willequet, 2009).

Matière sèche	Protéines brutes	Celluloses brutes	Calcium	Phosphore
g/kg	g/kg matière sèche			
850-900	30	43-45	2.5-3.1	0.7-0.8

II. Propriétés pharmacologiques de *Pleurotus ostreatus*

Les premières traces d'utilisation des champignons, d'un point de vue médical, ont été retrouvées en Asie et remonteraient à des milliers d'années (Ronceros Ramos, 2015). Cet usage traditionnel n'a aucune base scientifique. Des expérimentations qui se sont révélées plus ou moins convaincantes, n'ont été retenues que certaines transmises de générations en générations. Néanmoins, des études approfondies, sur ces remèdes naturels qui semblent efficaces, s'imposent afin de définir leur réel intérêt thérapeutique et de créer de nouveaux médicaments pour le futur. En effet, les champignons sont des aliments à partir desquels il est possible d'extraire des principes actifs. Ceux-ci pourront devenir des médicaments avec une autorisation de mise sur le marché, si la preuve de leur efficacité est obtenue (Blandeau, 2012).

De nos jours, il existe, dans le commerce, des champignons sous forme de poudre (comprimés, gélules...) ou liquide (ampoules). Certains champignons sont préparés selon des procédés homéopathiques (granules) (Blandeau, 2012).

P.ostreatus contient plusieurs composés comme : des protéines, des polysaccharides et les lipides (tableau 1). Selon Deepalakshmi & Mirunalini (2014), ces complexes peuvent être isolés à l'aide de différentes techniques utilisant des solvants appropriés comme la séparation par HPLC par exemple et se sont avérés avoir de nombreuses activités. Les propriétés pharmacologiques de *P.ostreatus* sont illustrées dans la Figure 3.

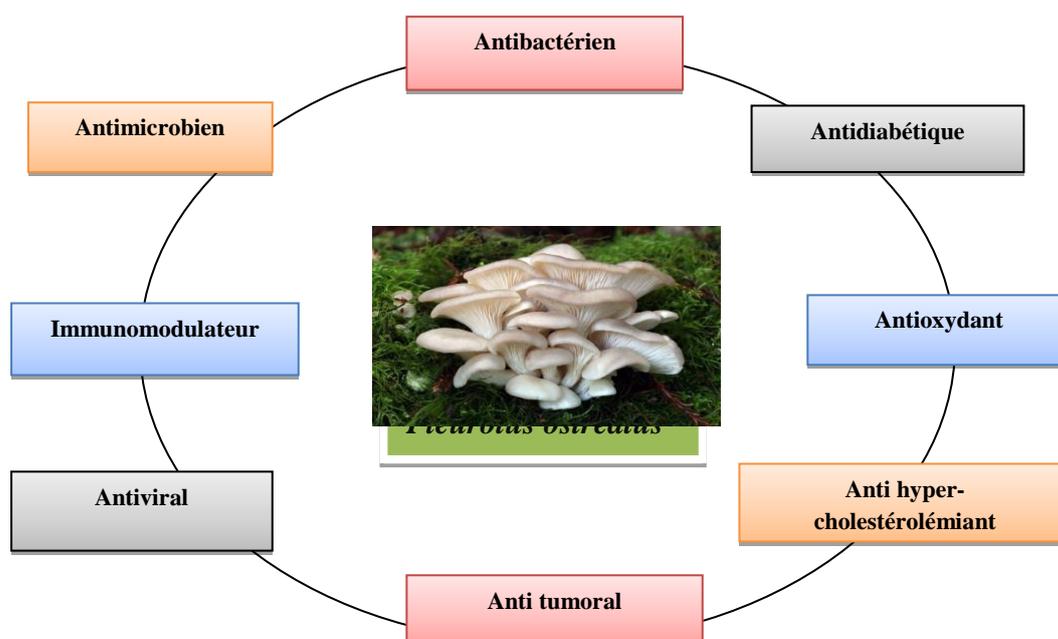


Figure 3 : Propriétés pharmacologiques de *Pleurotus ostreatus* (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

II.1. Utilisations en médecine traditionnelle

Actuellement, à travers le monde, il existe un regain d'intérêt pour les remèdes traditionnels. Il existe des essais d'intervention directe sur les êtres humains mais ces études restent encore limitées (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

Blandeau (2012) rapporte que les carpophores de *P. ostreatus* réduits en poudre, guérissent traditionnellement les lombagos, les douleurs aux jambes, les membres engourdis, les douleurs des tendons et les troubles sanguins et possèdent également des vertus immunostimulantes et hypocholestérolémiantes.

II.2. Effet préventif sur l'apparition de tumeurs

P. ostreatus fait partie des champignons présentant un grand intérêt anticancéreux à l'avenir grâce à son efficacité et son spectre d'action large tout en étant tolérée (Blandeau, 2012).

Une étude sur la prévention des cancers chimio induits et le rôle de la diététique a montré qu'un régime riche en fibres pouvait prévenir le cancer du côlon et que les acides gras non saturés pouvaient prévenir l'apparition du cancer du sein ; en effet, lorsque le 1,2-diméthylhydrazine (DMH) (substance cancérigène) a été administrée à des rats, ceux-ci ont développé des tumeurs au niveau du côlon. Les rats recevant le DMH avec un complément de *P. ostreatus* n'ont pas développé de tumeurs contrairement au groupe non supplémenté. Les analyses effectuées sur les deux groupes ont mis en évidence une activation de l'apoptose et un taux en protéine P53 (protéine suppresseur de tumeur par arrêt du cycle cellulaire des cellules cancéreuses en G0/G1) plus important dans le groupe supplémenté. Il est donc permis de dire que le Pleurote joue un rôle protecteur contre certaines substances cancérigènes (Givelet, 2011 ; Blandeau, 2012).

II.3. Effet pharmacologique de l'extrait hydrosoluble de *Pleurotus ostreatus*

L'extrait hydrosoluble de mycélium de *P. ostreatus* a été testé sur des souris ayant un sarcome 180. L'injection de ce composé a arrêté les cellules cancéreuses en phase G0 et G1 du cycle cellulaire. Une stimulation des cellules cytotoxiques NK (Natural killer) et des macrophages producteurs de dérivés nitrés a été également observée (Blandeau, 2012).

II.4. Effet pharmacologique d'extrait aqueux de *Pleurotus ostreatus*

Trois polysaccharides ont été isolés à partir de l'extrait aqueux des carpophores par précipitation éthanolique. Ils ont été nommés A5, A3 et A6. Le composé A6 étant composé

principalement de galactose est inactif. Les composés A5 et A3 contiennent essentiellement du glucose et possèdent les propriétés anti tumorales marquées à une dose de 0,1mg/kg/jour grâce à la présence d'une structure (1-3)-béta-glucane(Blandeau, 2012).

II.5. Potentiel antimicrobien

Le champignon a besoin de composés antimicrobiens pour survivre dans son milieu naturel, il n'est donc pas surprenant que plusieurs substances à faible pouvoir inhibiteur (Acide applanoxidique envers *Trichophyton mentagrophytes* ainsi que des stéroïdes, comme le 5 α -ergosta-7,22-dien-3 β -ol envers des micro-organismes à Gram positif et à Gram négatif) ou à fort pouvoir inhibiteur (acide oxalique) soient isolées à partir de différentes espèces de champignons, ce qui peut être bénéfique pour l'être humain(Lindequist, 2005).

II.6. Activité antidiabétique

Le diabète est un désordre métabolique qui touche environ 250 millions de personnes dans le monde. A la recherche de traitements plus efficaces avec moins d'effets secondaires, les chercheurs se tournent de plus en plus vers les macromycètes dont *P. ostreatus*(Deepalakshmi & Mirunalini, 2014). En effet, les champignons comestibles possèdent un indice glycémique très faible (IG=15) (Roncero Ramos, 2015).

Les extraits de *P.ostreatus* ont également un effet anti-hyperglycémiant, c'est-à-dire que ce champignon est capable de réduire le taux de glucose dans le sang, cependant, à cause de l'insuffisance d'études cliniques, le mécanisme d'action, difficile à mettre en évidence, n'est toujours pas clair(Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

II.7. Potentiel immunomodulateur

Les extraits aqueux du mycélium frais de *P.ostreatus* sont capables d'accroître l'activité de molécules oxygénées réactives qui sont connues pour leurs propriétés immunomodulatrices. Ces dernières consistent à freiner les réactions du système immunitaire, ce qui est nécessaire pour un patient qui subit un traitement chimiothérapique, radiothérapie ou bien une greffe d'organe (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014).

II.8. Potentiel anti-hypercholestérolémique

L'administration de poudre de *P.ostreatus* à des rats hypercholestérolémiques, a réduit le taux de cholestérol total dans le sang de 37%, ainsi que le taux total des triglycérides de 45%. Les chercheurs pensent que c'est probablement dû à la présence de la lovastatine (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014). La mévinoline ou lovastatine est une molécule

hypocholestérolémiant car elle inhibe l'HMG-CoA réductase, enzyme-clé de la synthèse du cholestérol intracellulaire(LantoineBriquanne, 2003 ; Blandeau, 2012).

II.9. Potentiel antiviral

Le but de la chimiothérapie antivirale est la découverte d'agentsantiviraux qui sont spécifiques pour l'inhibition de la multiplication virale sans affecter la division normale des cellules.Il est nécessaire d'identifier et développer les nouveaux agents antiviraux sans effet secondaire défavorables et résistance. El Fakharany et al en 2010 ont constatéqu'une laccase isolée et purifiée du champignon *P.ostreatus* serait capable d'empêcher l'entrée du virus de l'hépatite C dans les cellules du sang ainsi que la tumeur hépatique périphériques dans les Cellules HepG2 (lignée de cellules hépatiques cancéreuses humaines).

Les champignons manifestent une activité inhibitrice de la transcriptase inverse HIV I (Virus ImmunodéficiênciaHumaine) (Deepalakshmi & Mirunalini, 2014). La transcriptase inverse (TI) est une enzyme virale qui caractérise la famille des Retroviridae ; elle a été la première cible des médicaments anti-VIH, et,est responsable, au cours du cycle de réplication, de la synthèse de l'ADN double brin proviral non intégré à partir de l'ARN génomique viral monocaténaire (Roquebert&Leleu, 2010).

II.10. Potentiel antioxydant

Des extraits éthanoliquesde *P. ostreatus*cultivés sur du bois ont présenté une concentration de 2,63 µg/ml en polyphénols totaux, avec un pourcentage d'inhibition de 90,75% au test de piégeage du radical libre DPPH (1,1-diphényle-2-picrylhydrazyl) , ce qui aamené les auteurs à dire que ce sont des antioxydants forts capables de déplacer les radicaux libres et de les chélater(Oyetayo &Arioet al, 2013).

Une étude faite sur des extraits acétoniques de *P.ostreatus*a montré une activité antioxydante ($IC_{50} = 4,4$ mM) et un taux élevé en polyphénols totaux (352,8 mg/l eq.AG).(Iwalokun, 2007).

II.10.1. Molécules responsables de l'activité antioxydante

Selon Sarni-Mancado&Cheyner(2006),tous les végétaux contiennent des composés phénoliques, maintenant reconnus dans des domaines variés, notamment en pharmacologie à savoir lalutte contre l'athérosclérose, l'action anti cancérigène, et la forte action antioxydante grâce auxflavonoïdes (lutéoline, quercétine, kaempférol, apigénine, taxifoline) par piégeage des radicaux libres en formant des radicaux moins réactifs, cette capacité est expliquée par

leur propriété de donation d'un atome d'hydrogène à partir de leur groupement hydroxyle. (Zeghad, 2009).

II.10.1.1. Polyphénols

Les composés phénoliques ou les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire, largement distribués, possédant plusieurs groupements phénoliques, avec ou sans autres fonctions et comportant au moins 8000 structures connues différentes, allant des molécules phénoliques simples de faible poids moléculaire tels que les acides phénoliques à des composés hautement polymérisés comme les tannins. Ils font partie intégrante de l'alimentation humaine et animale (Athamena, 2009)

a. Classification des polyphénols

Les polyphénols sont répartis en plusieurs classes :

- ❖ les flavonoïdes,
- ❖ les tanins,
- ❖ les saponines (triterpénoïdes),
- ❖ autres polyphénols.

Les polyphénols sont associés à de nombreux processus physiologiques qui interviennent dans la qualité alimentaire et sont impliqués lorsque la plante est soumise à des blessures mécaniques. La capacité d'une espèce végétale à résister à l'attaque des insectes et des microorganismes est souvent corrélée avec la teneur en composés phénoliques. Ces composés montrent des activités anti-inflammatoires, analgésiques, antibactériens, antiviraux, anticancéreux, anti-allergènes, vasodilatateurs et antioxydants (Athamena, 2009).

b. Propriétés réductrices des polyphénols

Plus un composé aromatique est substitué par des groupements donneurs d'électrons, plus l'énergie de sa HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital) est élevée, plus son potentiel d'ionisation est faible et plus son caractère réducteur est grand. Il peut alors subir une oxydation mono-électronique qui conduit au cation radicalaire correspondant (Sarni-Mancado & Cheynier, 2006).

II.10.1.2. Flavonoïdes

Occupant une place prépondérante dans le groupe des phénols, les flavonoïdes sont des métabolites secondaires ubiquistes des plantes. Environ 2 % du carbone organique photosynthétisé par les plantes, soit environ 109 tonnes par an, est converti en flavonoïdes (Athamena, 2009). D'un point de vue structure chimique, les flavonoïdes sont des

dérivés du noyau flavone ou 2-phényl chromone à 15 atomes de carbone (C6-C3-C6), constitué de deux noyaux aromatiques, désigné par les lettres A et B, reliés par un hétérocycle oxygéné, désigné par la lettre C, portant des fonctions phénols libres, éthers ou glycosides (figure 6) (Athamena, 2009)

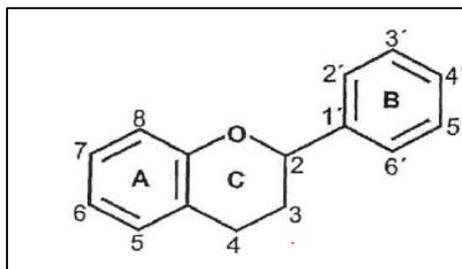


Figure 4 : Structure de base des flavonoïdes (Athamena, 2009).

II.10.1.3. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau. Il y'a deux grands groupes de tanins :

- les tanins hydrosolubles,
- les tanins condensés ou non hydrosolubles ou tannins cathéchiques dérivant des catécholset des proanthocyanidols par condensation.

DEUXIEME CHAPITRE : MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

I.1. Matériel mycologique

Le matériel mycologique est constitué de carpophores (ou champignons) de *Pleurotus ostreatus* local (POL) cultivé au Laboratoire de Production, Amélioration et Protection des Végétaux (LPAPV) ,sous la direction de M^{me} Mansour-Benamar sur quatre substrats de culture à savoir le grignon d'olive (GO), le marc de café(MC), la paille de blé (PB) et le mélange des trois substrats (GO + MC+ PB) aux taux respectifs de 44% , 44% et 10% ,Chacun des quatre substrats est supplémenté par 2% de carbonates de calcium (CaCO₃) pour optimiser le pH (Suite aux travaux de Amrane et Belkacemi, 2017).

Les carpophores ont commencé à se former et à être récolté environ un mois après la mise en culture et la récolte a duré un mois. Le cycle de culture a duré au total deux mois.

I.2. Matériel bactériologique

I.2.1. Milieux de culture

- **BHIB (BrainHeart Infusion Broth):** milieu de culture liquide riche utilisé pour la réactivation des souches bactérienne conservées à 4°C.
 - ▶ **Composition chimique**
 - Infusion cœur-cerveille (matières solides) :8,0 g
 - Digestion peptique de tissu animal : 5g
 - Digestion pancréatique de caséine : 16g
 - Chlorure de sodium: 5g
 - Glucose: 2g
 - Phosphate d'hydrogène disodique : 2,5g
 - pH 7,4 ± 0,2 (Becton Dickinson, 2013)
- **MHA (Mueller Hinton Agar)**
 - ▶ **Composition chimique**
 - Infusion de viande de bœuf : 300 ml,
 - Peptone de caséine : 17,5 g
 - Amidon de maïs : 1,5 g
 - Agar : 17 g
 - pH = 7,4 (Becton Dickinson, 2013)

I.2.2.Souches bactériennes

Les deux souches bactériennes pathogènes testées, proviennent du Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Il s'agit de souches référencées, fréquemment utilisées en recherche d'activité antibactérienne :

Escherichia coli: ATCC 25922 (Gram -). (ATCC = American type culture collection)

Bacillus cereus: ATCC 10876 (Gram +).

I.2.3.Antibiotique

- Disques de Gentamicine (SD016-1CT), fabriqué au laboratoire HIMEDIA. 10µg par disque de 6 mm de diamètre.

I.3.Réactifs chimiques

- Acétate de potassium
- Acide ascorbique
- Acide chlorhydrique 37%
- Acide tannique
- Acide gallique
- BSA: Sérum Albumine Bovin
- Carbonate de sodium Na_2CO_3
- Chlorure d'aluminium AlCl_3
- Chlorure de sodium NaCl
- DPPH: 2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl
- Eau distillé H_2O
- Ethanol absolu 96% $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- Folin ciocalteu (acide phosphotungstique ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) + acide phosphomolybdique ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$))
- Hydroxyde de sodium NaOH
- Méthanol CH_3OH
- Quercitine
- SDS: Sodium Dodecyl Sulfates
- TEA: Triéthylamine

I.4.Appareillage

- Agitateur magnétique Rühromag.
- Autoclave Wisd.
- Balance analytique Ohaus.
- Balance technique Mettler PJ400.
- Centrifugeuse Sigma.
- Etuve à 37° Memmert.
- Four pasteur Kottermann.

- Lyophilisateur Christ.
- Micropipette a volume réglable 10-1000µl Biohit.
- Micropipette a volume réglable 20-100µl Spinreact.
- Micropipette de 20µl Tranferpette.
- Mixeur Philips.
- Pompe à vide Vaccum.
- pH mètre Eutech.
- Spectrophotomètre UV-Visible de la marque Shimadzu.
- Ultra congélateur Direct Freez.
- Vortex Velpscientifica.

II. Méthodes d'étude

II.1. Préparation de la poudre lyophilisée de l'extrait aqueux de *Pleurotus ostreatus*:

Les champignons ont été récoltés à la période de mars 2017 et ils ont été soumis aux étapes indiquées dans la figure 5 pour obtenir une poudre lyophilisée (lyophilisat).

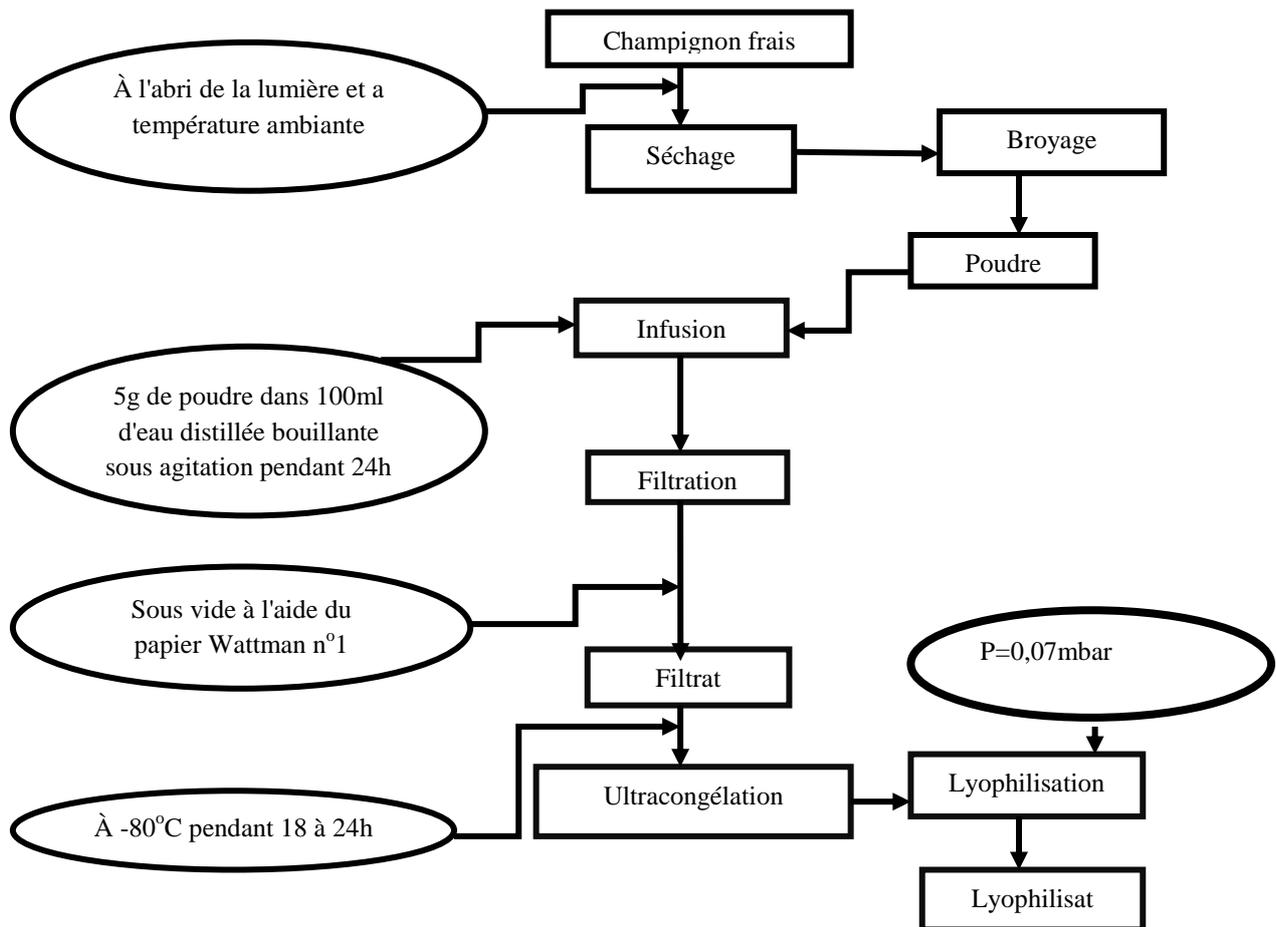


Figure 5 : Schéma explicatif des étapes d'obtention de la poudre lyophilisée des carpophores de *Pleurotus ostreatus*

II.1.1. Rendements en lyophilisat de l'extrait aqueux de *Pleurotus ostreatus*

Pour pouvoir calculer les rendements en poudre lyophilisée de l'extrait aqueux de *Pleurotus ostreatus* on a utilisé la loi suivante :

$$\text{Rendement} = \frac{\text{masse de poudre lyophilisée}}{\text{masse de poudre de champignon}} \times 100$$

Masse de la poudre de champignon avant infusion pour chaque extrait: 5g.

→ Nous avons pesé 5g de la poudre de champignon auxquels est ajouté 100ml d'eau distillé bouillante. La concentration en solution aqueuse est : 50mg/ml.

II.2. Dosages effectués

II.2.1. Dosage des polyphénols totaux

La teneur en polyphénols est déterminée à l'aide du réactif de Folin Ciocalteu qui est réduit, lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration produite, dont l'absorption maximum à 765 nm est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les extraits végétaux, selon la méthode décrite par Wong et al, en 2006. La technique est détaillée dans la figure 6.

Une courbe étalon est réalisée à partir d'une gamme de concentrations d'acide gallique allant de 0,31 µg/ml à 5 µg/ml contre un blanc (1 µl du réactif de Folin + 200 µl de Na₂CO₃).

II.2.1.2. Préparation du réactif de Folin-ciocalteu

Pour préparer le réactif de Folin-ciocalteu, 9ml d'eau distillé ont été ajouté à 1 ml de réactif de Folin-ciocalteu.

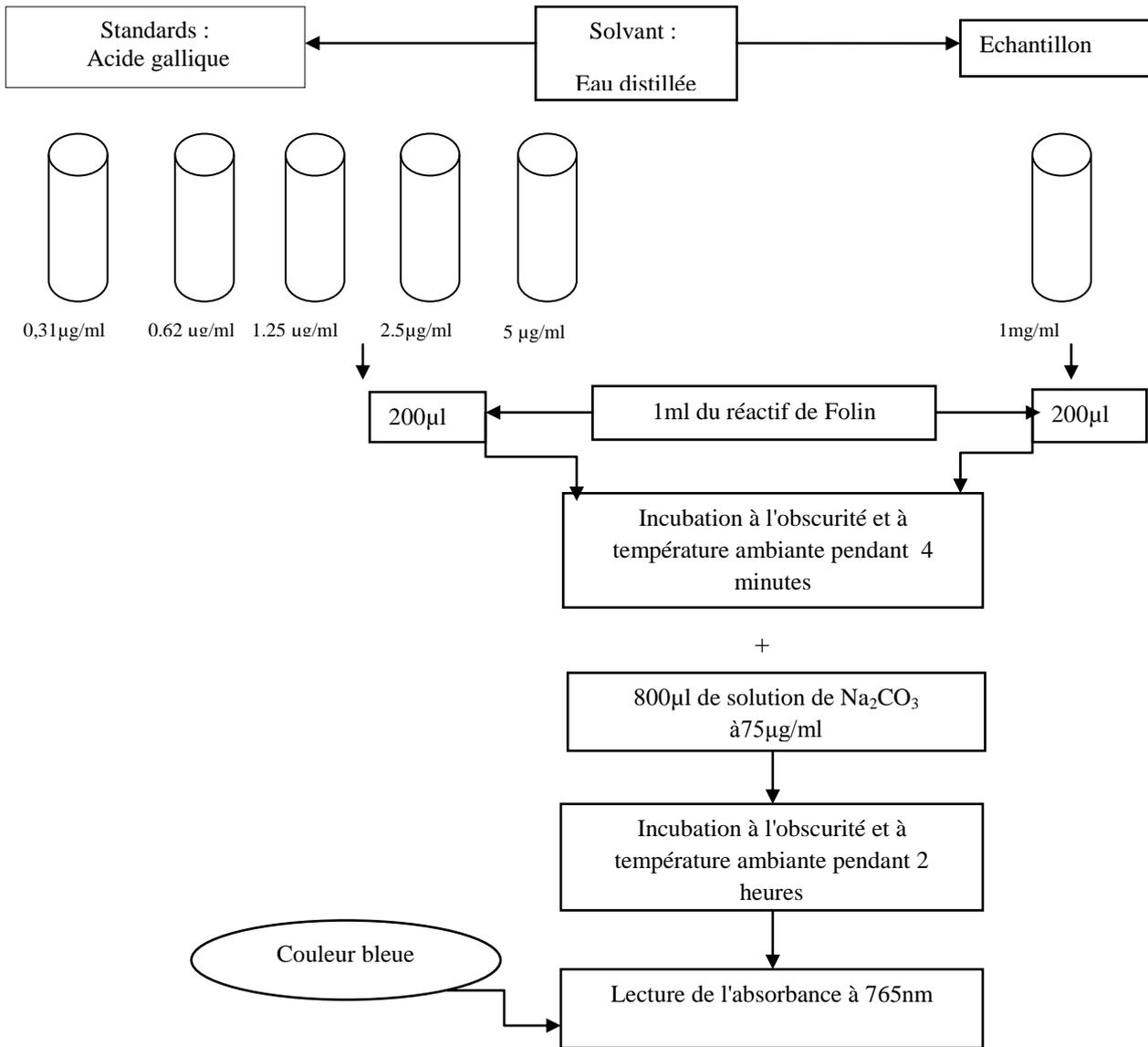


Figure 6: schéma explicatif des étapes du dosage des polyphénols totaux (Wong et al, 2006)

II.2.2. Dosage des flavonoïdes

La teneur en flavonoïdes totaux est déterminée à l'aide la méthode de dosage qui repose sur la capacité de ces composés à former des complexes chromogènes de couleur jaune avec le chlorure d'aluminium (AlCl_3), coloration dont l'intensité est mesurable à l'aide d'un spectrophotomètre à UV, selon la méthode décrite par Kim(2003) comme l'indique la figure 7. Une courbe étalon est réalisée à partir d'une gamme de concentration de quercitrine.

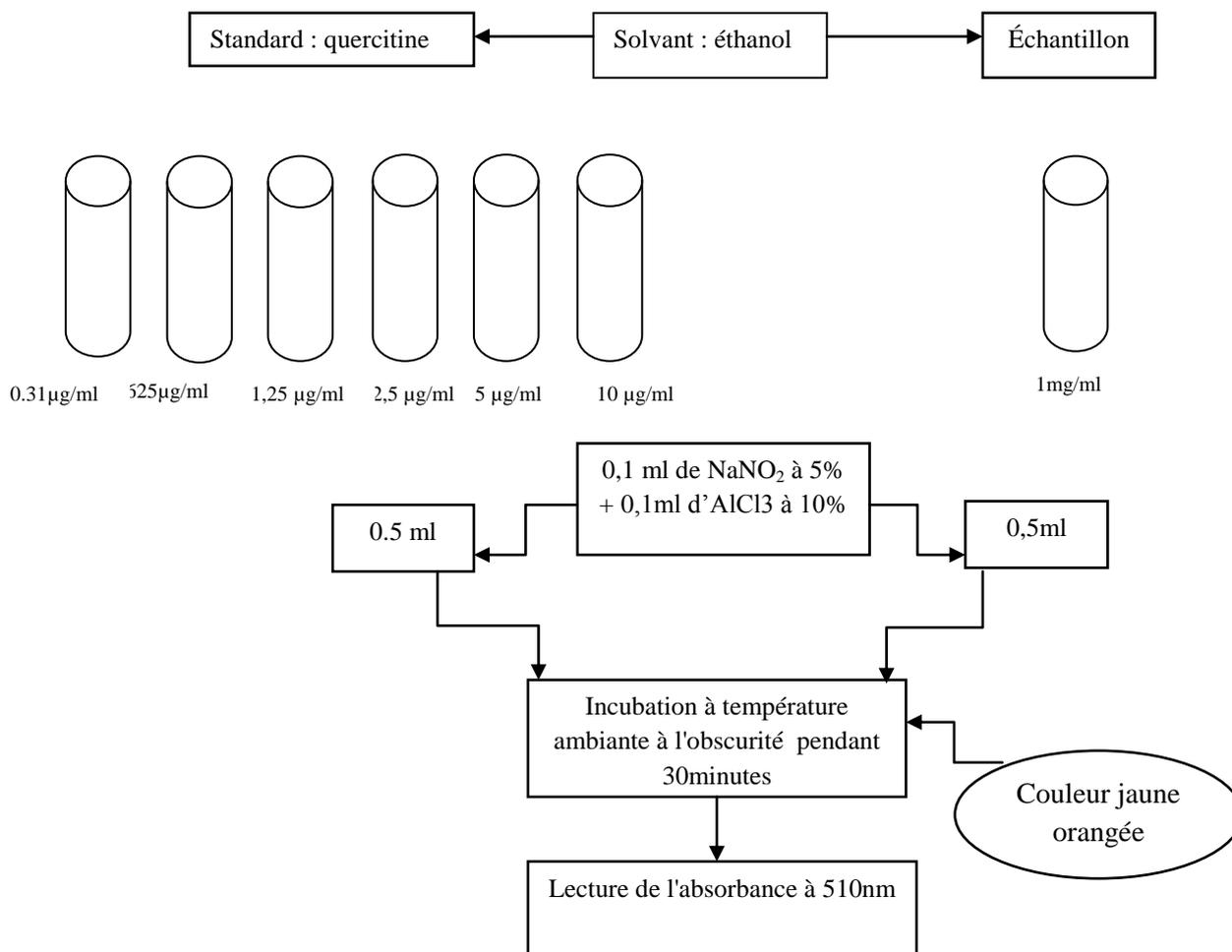


Figure 7: Schéma explicatif des étapes du dosage des flavonoïdes (Kim, 2003)

II.2.3. Dosage des tanins

La teneur en tanins totaux est déterminée à l'aide du chlorure ferrique (FeCl₃) qui réagit avec les tanins en milieu alcalin pour former des chélates sous forme de précipités de couleur bleu-noire pour les tanins galliques et éllagiques et un précipité brun verdâtre pour les tanins condensés, selon la méthode décrite par Hargeman et Bulter (1989).

Une courbe étalon a été réalisée à partir d'une gamme de concentration d'acide tannique allant de 0,625 µg/ml - 20 µg/ml. Les mesures ont été effectuées contre un blanc (2ml de SDS/TEA + 500 µl FeCl₃) comme l'indique la figure 8.

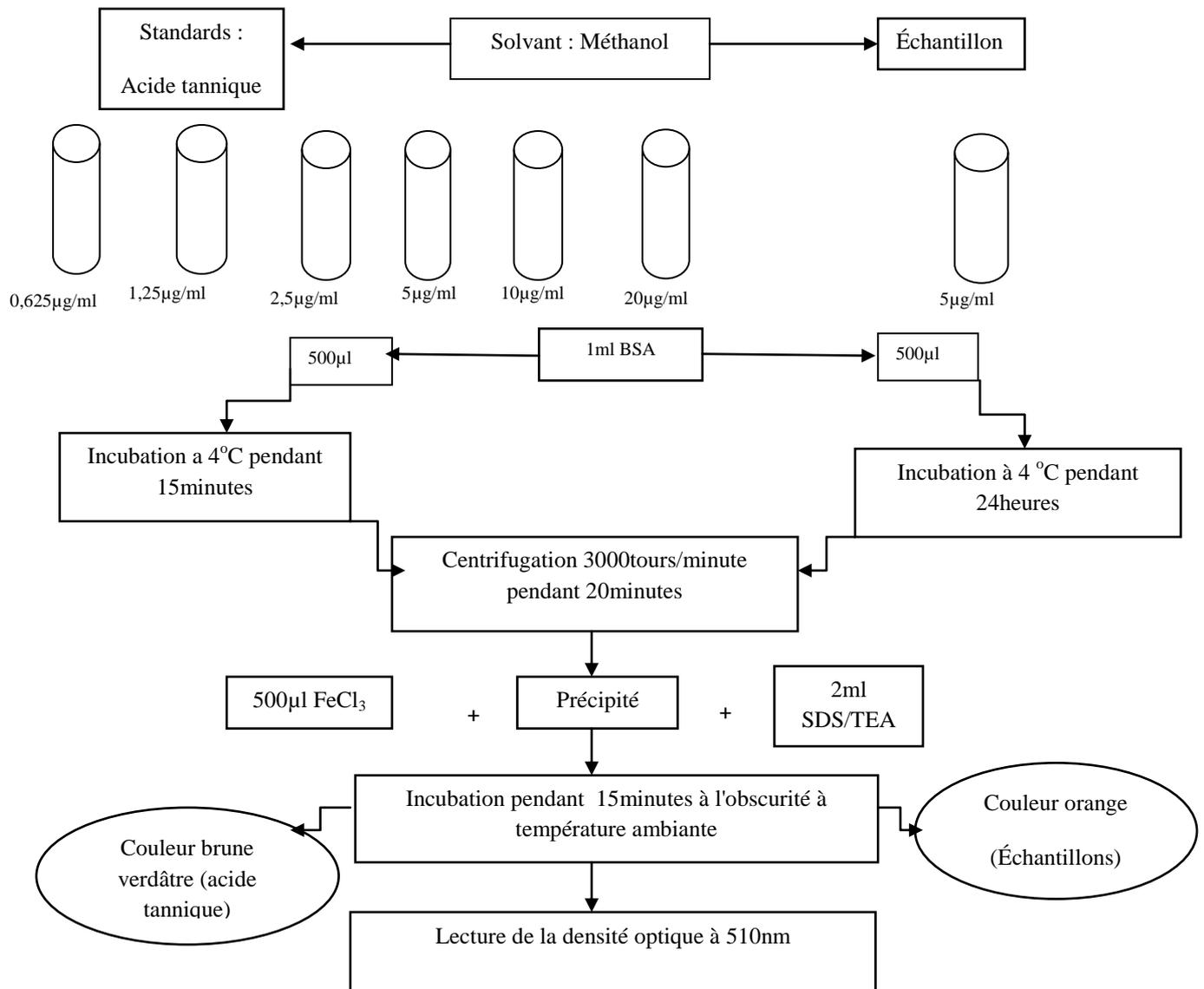


Figure 8 : Schéma explicatif des étapes du dosage des tanins (Hargerman&Bulter, 1989)

II.2.3.1. préparation du tampon A

➤ Solution mère 1 (SM₁)

80ml d'eau distillée auxquels sont ajoutés 14ml d'acide acétique glacial et 9,94g de NaCl, puis ajusté à 100ml avec de l'eau distillée.

➤ Solution mère 2 (SM₂)

16,41g d'acétate de sodium anhydre auxquels sont additionnés 80ml d'eau distillée et 9,94g de NaCl puis ajusté à 100ml avec de l'eau distillée.

Pour préparer le tampon A nous avons 4ml de SM₁ 6ml de SM₂, puis ajusté à 100ml avec de l'eau distillée, le pH a été ajusté 4,9 à l'aide d'une solution de NaOH 1M.

II.2.3.2. Préparation de la solution de BSA

Dans 100ml de tampon A 0,1g de BSA ont été Dissout.

II.2.3.3. Préparation de la solution de FeCl₃

1,62g de FeCl₃ dans 100ml de HCl 0,01M.

II.3. Activités biologiques recherchés

II.3.1. Recherche de l'activitéantioxydante des extraits de *Pleurotus ostreatus*

L'activité antioxydante est mesurée à l'aide du DPPH (2,2'-diphényle-1-picryl hydrazyl) de couleur violette, qui, en présence d'un antioxydant dit piègeur de radicaux libres, se réduit en 2,2-Diphényle-1-picryl hydrazine de couleur jaunece qui provoque la diminution de l'absorbance mesurée à une longueur d'ondes de 517nm.

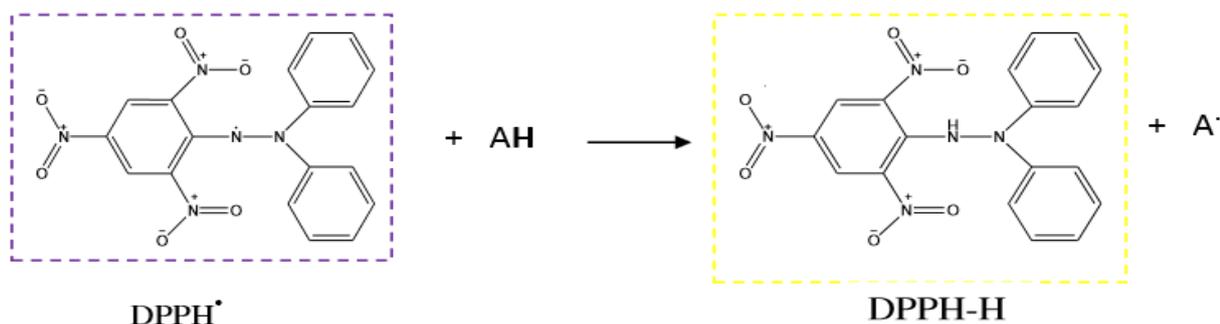


Figure 9 : Réaction de l'antioxydant avec le DPPH.

L'activité antioxydante, qui exprime la capacité à piéger le radical libre est généralement estimée par le pourcentage d'inhibition (I%) donné par la relation suivante :

$$I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀ : Absorbance à 517nm du standard (contient tous les éléments mais sans aucun échantillon).

A₁ : Absorbanceà 517 nm après 30 minutes d'incubation de l'échantillon.

Le dosage est réalisé selon la méthodeutilisée par Aiche-Iratni en 2016. Les étapes de ce dosage sont schématisées dans les figures 9 et 10, une courbe étalon est réalisée à partir d'une gamme de concentration d'acide ascorbiqueallant de (10 – 100µg/ml)

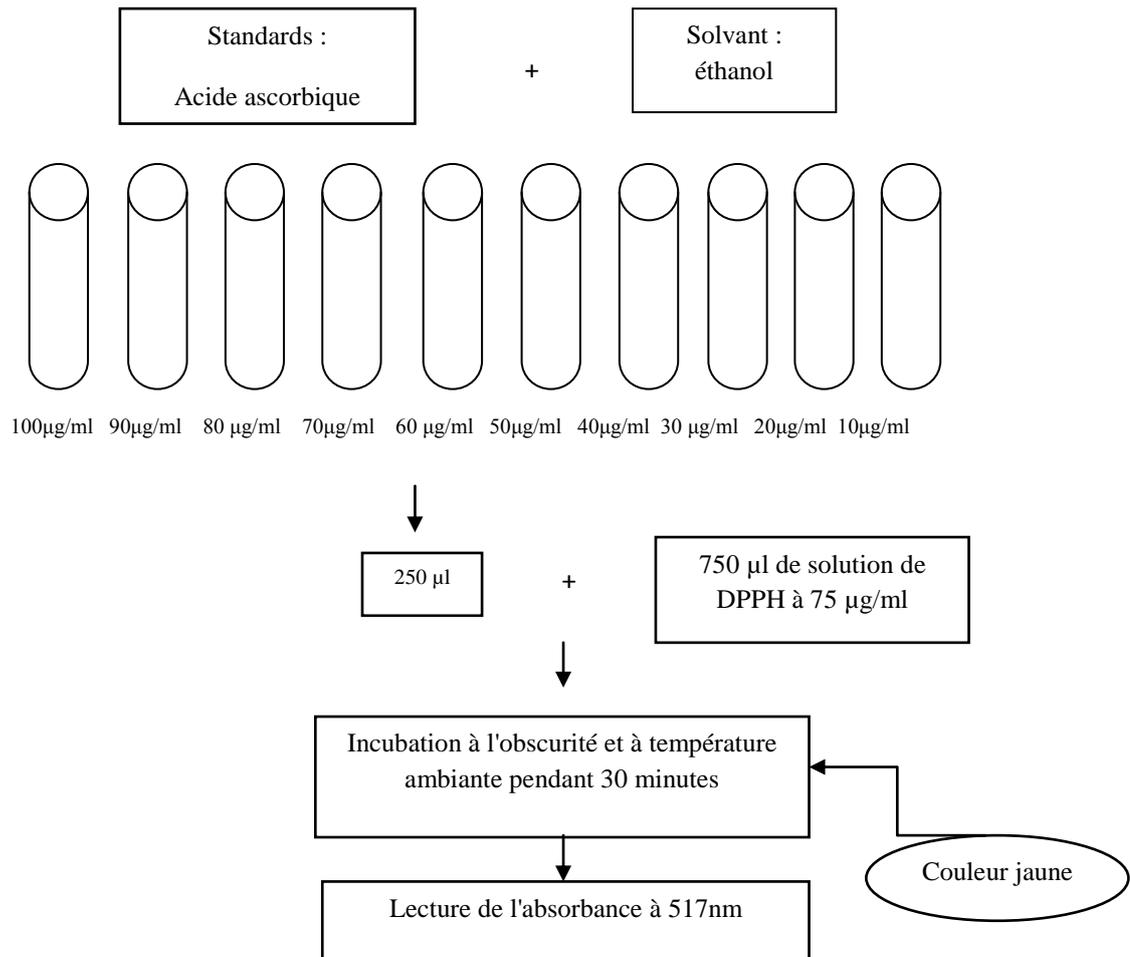


Figure 10: schéma explicatif du test de piégeage du radical DPPH par l'acide ascorbique(Sadegh et al, 2014 ; Aiche-Iratni, 2016)

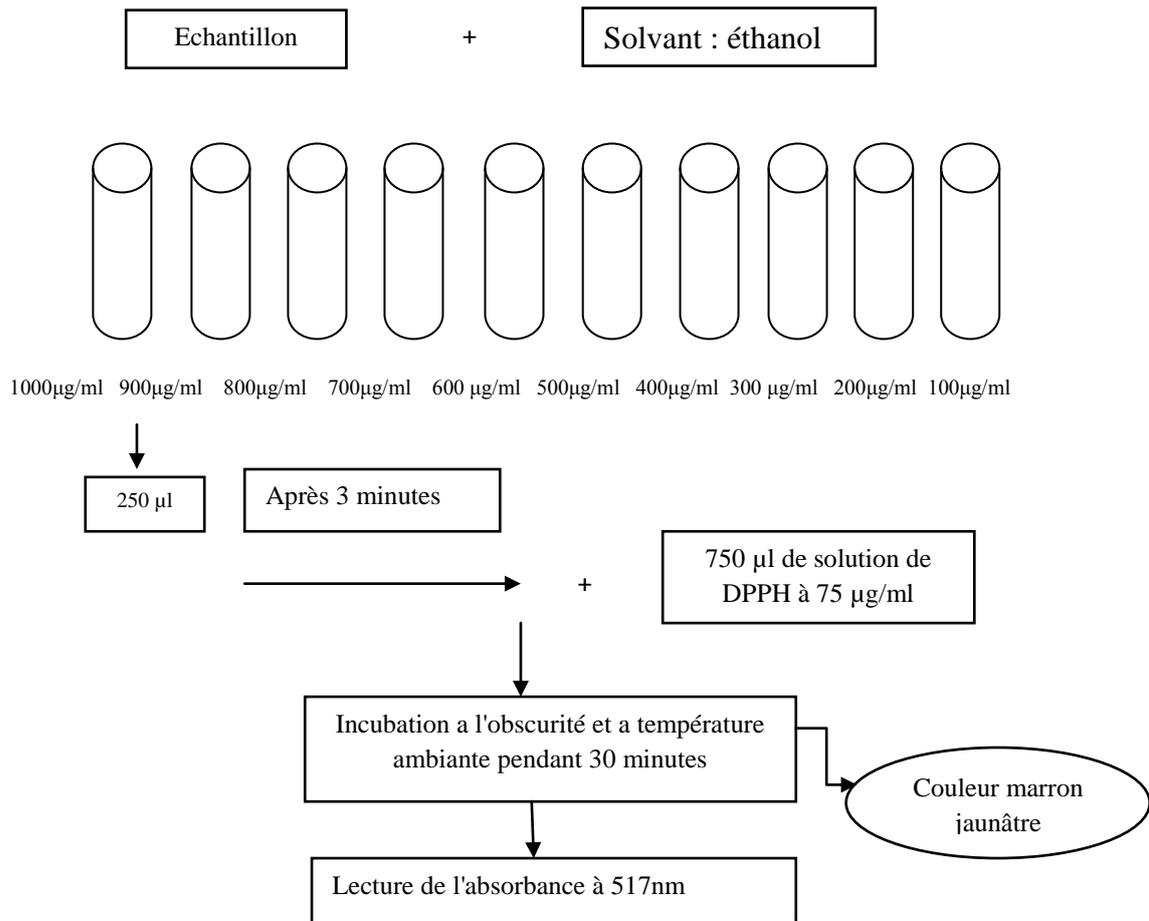


Figure 11: schéma explicatif du teste de piégeage du radical DPPH par l'échantillon (Sadegh et al, 2014 ;Aiche-Iratni, 2016)

II.3.2.Recherche de l'activitéantibactérienne des extraits aqueux du *Pleurotes Ostreatus*local

L'étude de l'activitéantibactériennea été faite sur deux souches pathogènesréféréncées qui sont, pour rappel, *Escherichia coli* ATCC 25922 (Gam -) et *Bacillus cereus*ATCC 10876 (Gram +), selon la méthode utilisée par Sadegh et al (2014), méthode schématisée dans la figure 11.

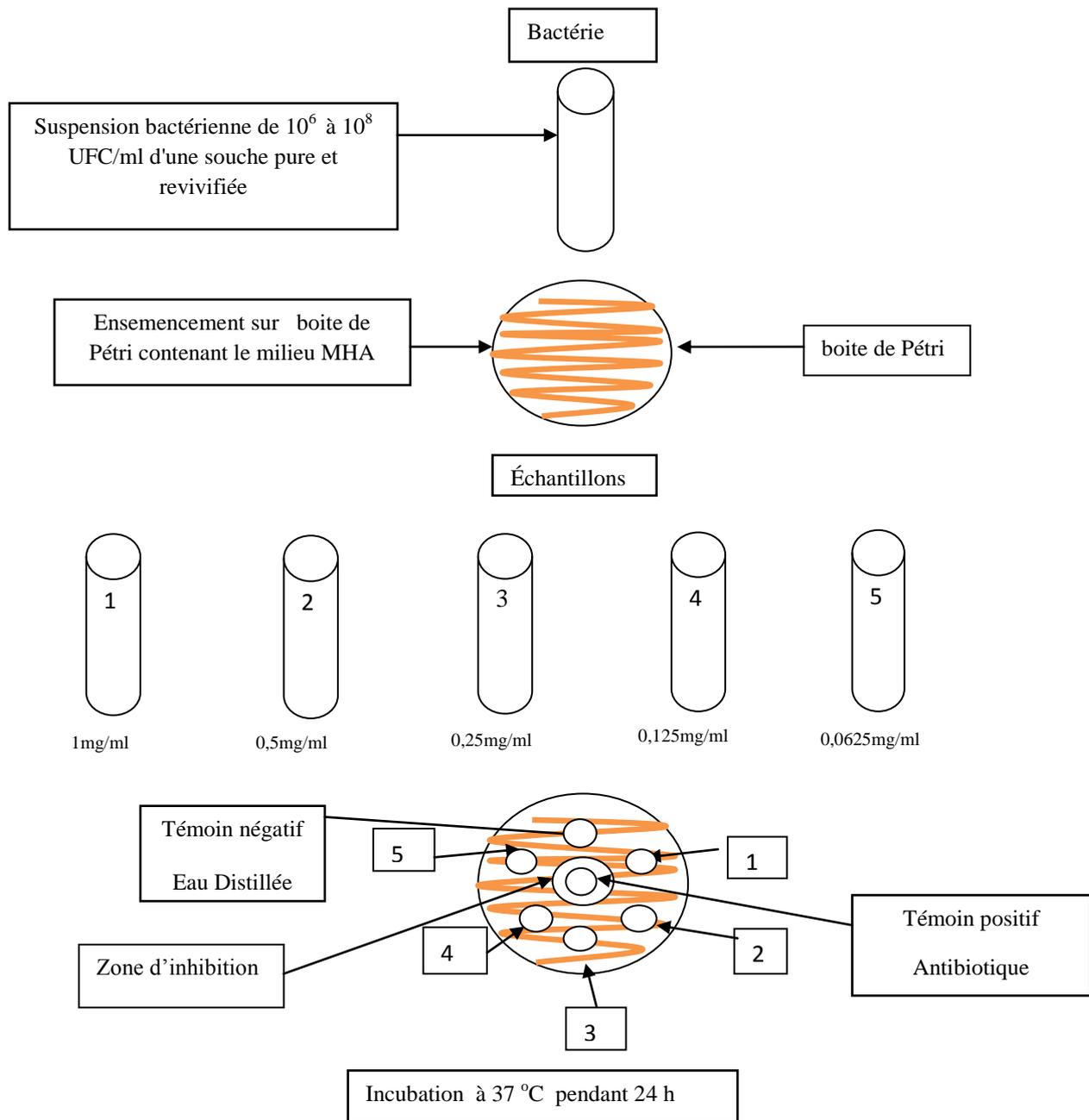


Figure 12 : Schéma explicatif des étapes de la recherche de l'activité antibactérienne des extraits de *Pleurotus ostreatus*

II.4.Préparation des milieux de culture

II.4.1.Préparation du milieu BHIB

37g de milieu BHIB en poudre auxquels est ajoutée une quantité suffisante d'eau distillée pour former un litre de milieu. Après chauffage sous agitation jusqu'à dissolution totale, nous avons procédé à sa stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, le milieu a été réparti aseptiquement (dans une zone stérile délimitée par les flammes de deux becs benzène) dans des tubes à essai stériles à raison d'environ 10 ml de milieu par tube.

II.4.2. Préparation du milieu MHA

38g du milieu MHA en poudre auxquels est ajoutée une quantité suffisante d'eau distillée pour former un litre de milieu. Après chauffage sous agitation jusqu'à dissolution totale, nous avons procédé à la stérilisation à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes. Nous avons réparti aseptiquement le milieu dans des boîtes de Pétri stériles à raison d'environ 25ml de milieu par boîte selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de l'Association Française de Microbiologie de 2015 puis nous avons laissé les milieux se solidifier. Trois répétitions par essai ont été prévues.

II.5. Préparation des souches bactériennes

Deux souches bactériennes utilisées pour l'expérimentation étaient conservées, au réfrigérateur à 4°C sur MHA, dans des sachets plastiques. Nous les avons revivifiées par prélèvement à l'aide d'une anse Pasteur stérile de quelques colonies bactériennes que nous avons transférées dans un tube à essai contenant le bouillon BHI stérile. Les tubes ainsi inoculés sont mis à incuber à 37°C pendant 18h à 24h (Burnichon & Texier, 2003, Aiche-Iratni, 2016).

II.6. Préparation de la suspension bactérienne

À l'aide d'une anse àensemencer stérile, quelques colonies bactérienne développées sur MHA ont été prélevées puis introduites dans un tube à essai contenant quelques millilitres d'eau physiologique à 0,9% de NaCl. Après une bonne agitation au vortex, nous avons procédé à la lecture de son absorbance à 625nm à l'aide d'un spectrophotomètre à UV-visible. Il faut diluer la suspension bactérienne, jusqu'à obtention d'une absorbance située entre 0,08 et 0,1 qui correspondent approximativement à 10^6 à 10^8 UFC/ml de charge bactérienne.

II.7. Ensemencement

Trois boîtes de Pétri contenant le milieu MH neuf solidifié sont ensemencées avec une des 2 suspensions bactériennes en veillant à l'étaler sur toute la surface, puis nous avons déposé les différentes rondelles de papier absorbant stériles imbibées d'extraits de carpophore de POL, d'eau distillée stérile dite témoin négatif ainsi que le disque d'antibiotique qualifié de témoin positif (figure 12).

II.8. Préparation des disques de papier absorbant

Des disques de papier absorbant de 6mm de diamètre ont été découpés à l'aide d'une perforuse à papier puis stérilisés à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

II.9. Mesure des diamètres d'inhibition

Après incubation des boîtes ensemencées à 37°C pendant 24 heures, on mesure les diamètres d'inhibition de chaque zone en longueur et en largeur, puis calculer la moyenne des deux valeurs.

II.10. Analyse statistique des résultats

Les résultats obtenus sont soumis à une analyse statistique de la variance à un seul facteur de classification, cette analyse nous permet de comparer les polyphénols totaux, les flavonoïdes totaux et les activités antioxydantes des carpophores de la souche locale de *Pleurotus ostreatus* récoltés sur les quatre substrats testés, GO, MC, PB et le mélange (M).

Lorsque cette analyse montre une différence significative, elle est complétée par le test de Newman Keuls (NK) au seuil de 5%. Le test NK permet de constituer des groupes homogènes de traitement par comparaison de moyennes. Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel R.

Si la probabilité (P) est :

- $P \geq 0,05$ les variables montrent une différence non significative.
- $P \leq 0,05$ les variables montrent une différence significative.
- $P \leq 0,01$ les variables montrent une différence hautement significative.
- $P \leq 0,001$ les variables montrent une différence très hautement significative.

TROISIEME CHAPITRE : RESULTATS ET DISCUSSIONS

I. Résultats et discussions

I.1. Rendements en poudre lyophilisée de l'extrait aqueux de *Pleurotus ostreatus*

Les rendements en lyophilisat des quatre extraits de *P.ostreatus* sont présentés dans la figure 13.

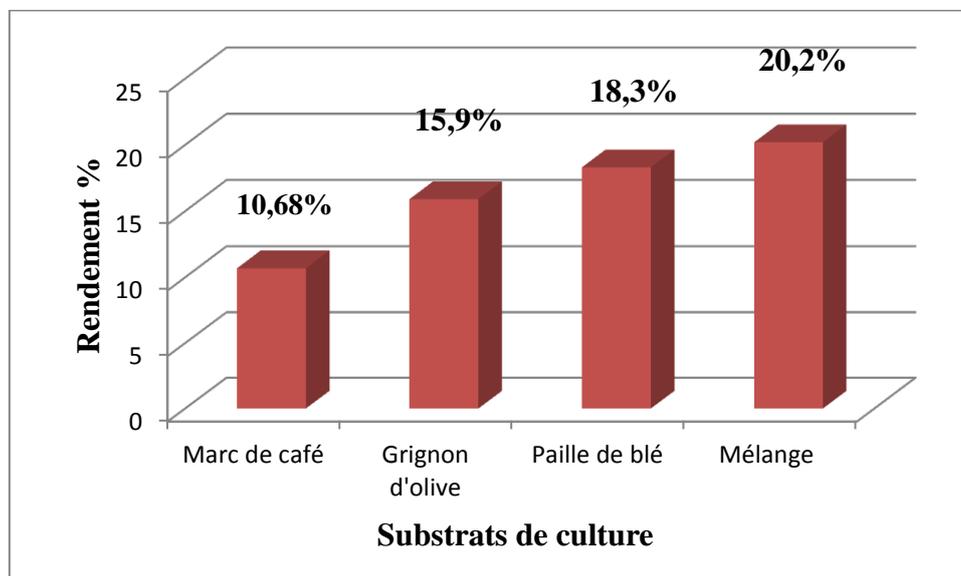


Figure 13: Comparaison des rendements des quatre extraits de carpophores de *Pleurotus ostreatus*(%).

Le rendement le plus important en lyophilisat a été obtenu avec la poudre de champignons ayant poussés sur le mélange (GO+MC+PB), tandis que le rendement le plus faible a été obtenu avec la poudre du champignon ayant poussé sur le marc de café.

I.2. Dosage des polyphénols totaux

Le dosage des polyphénols totaux (PPT) a été estimé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu. C'est l'une des méthodes les plus anciennes conçue pour déterminer la concentration en polyphénols totaux des plantes médicinales et des aliments. La courbe (figure 14) montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités de PPT ont été rapportées en microgramme d'équivalent d'acide gallique par gramme de matière sèche ($\mu\text{g EAG/g MS}$) et sont déterminées par l'équation de type : $y = 0,0165 x + 0,0244$ sachant que $R^2 = 0,9256$ (Figure 14).

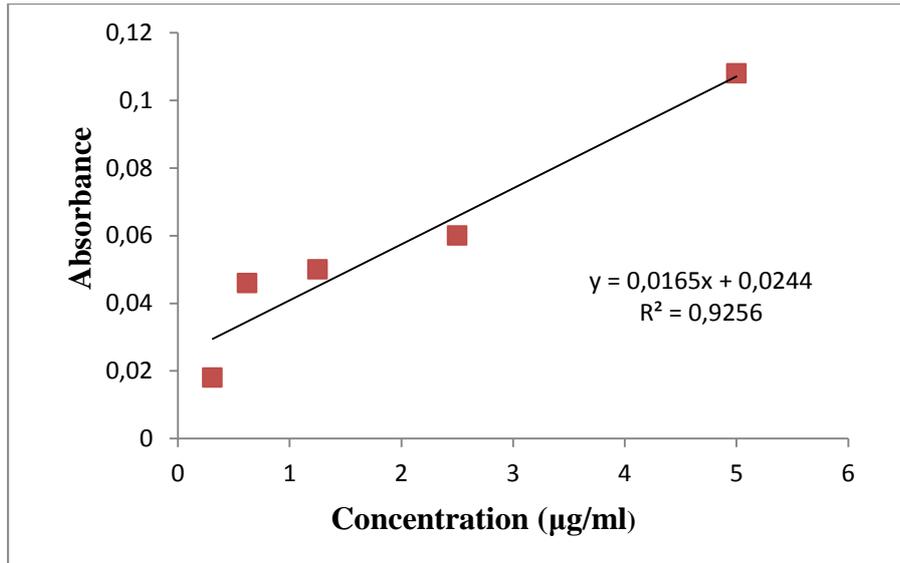


Figure 14: Courbe étalon de l'acide gallique

Dans le tableau 6 sont regroupées les valeurs des concentrations en PPT obtenues par l'extraction aqueuse des carpophores de *P.ostreatus* ayant poussé sur les quatre substrats de culture à savoir le grignon d'olive (GO), le marc de café (MC), la paille de blé (PB) et le substrat (M) formé par le mélange des trois.

Tableau 6 : Concentration en polyphénols dans les extraits de carpophores de *Pleurotus ostreatus* local

Substrats de culture	Concentration en Polyphénols totaux (mg EAG/g MS)
Grignon d'olive	1,636 ± 0,082
Marc de café	1,308 ± 0,020
Paille de blé	2,730 ± 0,134
Mélange	3,679 ± 0,076

La concentration la plus basse en PPT a été obtenue chez les carpophores récoltés sur MC avec 1,308 ± 0,020 mg EAG/g MS et la plus élevée (3,679 ± 0,076 mg EAG/g MS) a été obtenue chez ceux cueillis sur le substrat mélange M (GO-MC-PB).

Ces concentrations en PPT sont nettement supérieures à celles obtenues avec des carpophores d'une souche de *Pleurotus ostreatus* cultivée sur des substrats à base de bois d'arbres tropicaux comme *Pycnanthus angolensis* (2,63 µg EAG/g MS) et *Ceiba pentandra* (0,89 µg EAG/g MS) (Oyetayo & Ario et al, 2013).

On constate une légère différence entre la concentration en PPT des carpophores de *Pleurotus ostreatus* et celles des extraits éthanoliques obtenus par Wong et al en 2013, avec

d'autres espèces de Pleurotes comme *P. florida* et *P. eryngii* (respectivement $3,72 \pm 0,02$ et $3,57 \pm 0,14$ mg EAG/g MS). Comparés à d'autres espèces de champignons comestibles comme *Hypsizygus tessulatus* et *Flammulina velutipes* ($3,14 \pm 0,31$ et $0,9 \pm 0,1$ mg EAG/g MS), les extraits aqueux des carpophores de *P. ostreatus* local sont plus riches en PPT. Néanmoins, les extraits acétoniques et les extraits à l'éther de pétrole de *P. ostreatus* obtenus par Iwalokun en 2007 sont largement plus riches en PPT (respectivement $352,8$ mg EAG/g MS et $325,7$ mg EAG/g MS).

La concentration des composés récupérés lors d'une extraction est étroitement liée aux conditions d'extraction et les profils et les activités biologiques sont influencées de façon importante par le système de solvants utilisé pour l'extraction (Aiche-Iratni, 2016).

La méthode d'extraction doit permettre une extraction complète des composés d'intérêt et doit éviter leur modification chimique (Athamena, 2009). Les composés extraits avec des solvants tels que l'eau, l'éthanol et le méthanol sont qualifiés de composés polaires (Pedneault, 2007). L'eau est considérée comme un bon solvant polaire; elle permet d'extraire un grand nombre de composés biologiquement actifs à partir de différentes matières végétales; elle est le solvant le plus employé pour l'extraction de composés pour l'étude de l'activité antioxydante (Aiche-Iratni, 2016). Les résultats que nous avons obtenus indiquent que la concentration en PPT dans les carpophores de POL est influencée par les substrats de culture. D'après les résultats des travaux de recherche que nous avons cités précédemment, la concentration en PTT dépend aussi du genre et de l'espèce de champignon mais aussi de la nature du solvant d'extraction.

I.3. Dosage des flavonoïdes

Les flavonoïdes (FVT) constituent la classe polyphénolique la plus importante (Athamena, 2009).

Le dosage des flavonoïdes a été réalisé selon la méthode d' AlCl_3 en utilisant comme standard la quercétine (Figure 15). La courbe montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations. Les quantités des FVT ont été rapportées en microgramme d'équivalent de quercétine par gramme de matière sèche ($\mu\text{g EQ/g MS}$) et déterminé par l'équation de type : $y = 0.0441 x + 0.1055$ sachant que $R^2 = 0,92$ (Figure 15).

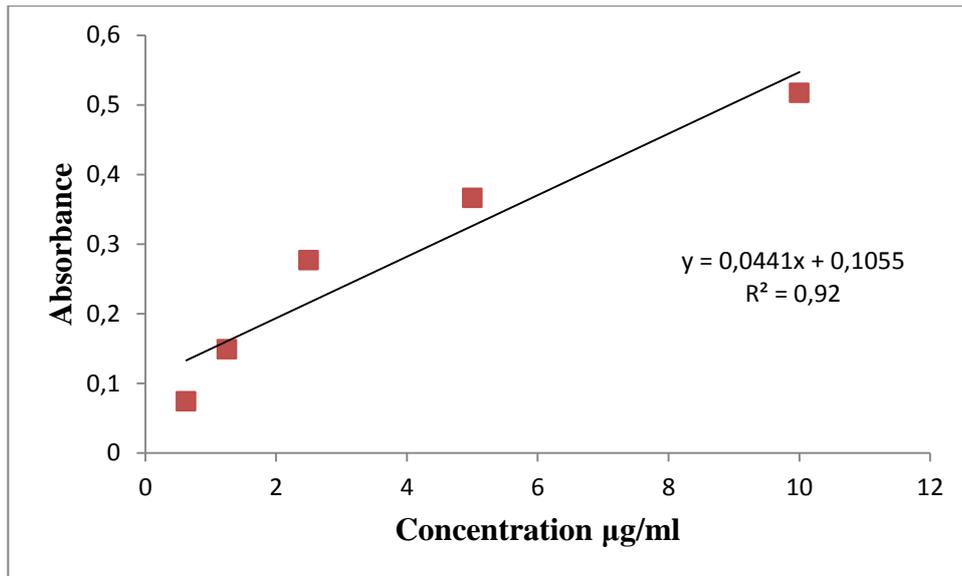


Figure 15: Courbe d'étalonnage de la quercétine

Dans le tableau 7 sont regroupées les valeurs des concentrations en flavonoïdes obtenues par l'extraction aqueuse de l'extrait de carpophores de *P.ostreatus* ayant poussé sur quatre substrats différents dans les mêmes conditions d'extraction.

Tableau 7 : Concentration des flavonoïdes dans les extraits de *Pleurotus ostreatus*

Substrats de culture	Concentration en flavonoïdes totaux (mg EQ/g MS)
Grignon d'olive	0,177 ± 0,028
Marc de café	0,133 ± 0,042
Paille de blé	0,434 ± 0,142
Mélange	0,798 ± 0,060

Les concentrations des flavonoïdes sont relativement faibles dans les extraits aqueux de carpophores de *P.ostreatus* ayant poussés sur le marc de café (0,133±0,042 mg EQ/g MS). Par contre l'extrait de carpophores de *P.ostreatus* ayant poussé sur le mélange des substrats a montré la concentration la plus élevée en FVT (0,798±0,060 µg EQ/g MS).

P.ostreatus ayant poussé sur le mélange M contient plus de FVT que les extraits éthanoliques d'autres espèces de Pleurotes: *Pleurotus florida*, *Pleurotus eryngii* (respectivement 0,17 ±0,02 et 0,48±0,04 mg EQ/g MS) mais moins que d'autres genres de

champignons comestibles comme *Auricularia polytricha* et *Hypsizygustessulatus* dont les valeurs sont respectivement $6,95 \pm 0,14$ et $1,04 \pm 0,10$ mg EQ/g MS.

P.ostreatus ayant poussé sur le mélange des trois substrats de culture M s'annonce plus prometteur car il est plus riche en FVT que certaines plantes comme: *Hedychium spicatum* ($4,22 \pm 0,425 \mu\text{g EQ/g MS}$), *Hedychium coronarium* ($2,47 \pm 0,079 \mu\text{g EQ/g MS}$) (Bag et al, 2015).

I.5. Dosage des Tanins totaux

La méthode utilisée pour le dosage des tanins totaux (TT) est la méthode utilisant FeCl_3 rapportée et décrite par Aiche-Iratni (2016). Un standards d'acide tannique (AT) a été utilisé pour tracer une courbe (figure 16) étalon ayant pour équation $y = 0,0477x + 1,5416$, avec $R^2 = 0,7364$.

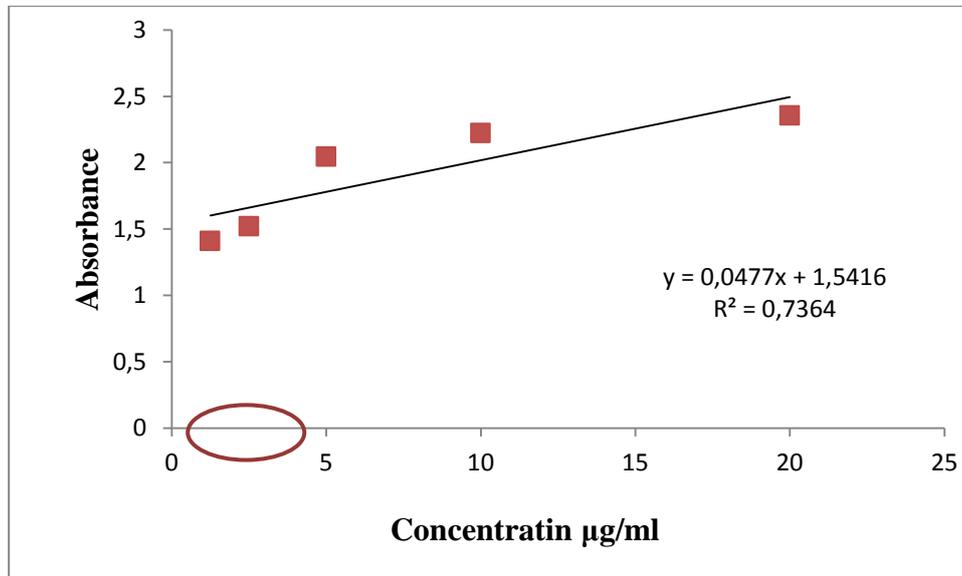


Figure 16: courbe étalon de l'acide tannique

Les valeurs des absorbances des échantillons GO, MC, PB et M ont révélé que les teneurs en tanin de chacun sont comprises entre 0 et $0,5 \mu\text{g}$ dans 5mg d'échantillon. Il n'est pas possible d'avoir leurs valeurs exactes avec la courbe étalon utilisée ; par contre *Pleurotus floridan* en possède pas (Wandati, 2013).

D'autres espèces de champignons sauvages sont très riches en TT, exemple *Russuladelica*, *Russulalepida*, *Russula mustelin* dont les valeurs des concentrations en tanins totaux sont respectivement ($165 \pm 0,54$; $124,20 \pm 0,25$ et $130,05 \pm 0,16$ mg EAT/100g MS). Ces champignons peuvent être plus intéressants que certaines espèces de plantes comme par exemple, *Pistacia Lentiscus* ($25,57 \pm 5,03$ mg EAT/g MS).

Cependant, la présence, de grandes quantités de tanins condensés dans les extraits aqueux de *P.ostreatus* cultivé(144.33 ± 13.57mg EC/100g MS) a été rapportée par Yim et al, en 2009. (EC= Equivalent Catéchine)

I.6. Activité anti-oxydante

Les extraits naturels issus des végétaux contiennent une variété de substances actives auxquelles sont attribués de nombreux effets biologiques notamment l'effet antioxydant. Pour bien aborder cette notion d'antioxydante, il faut définir la notion de la réaction d'oxydoréduction. Au cours de cette réaction, il se produit l'échange d'un électron ou d'un hydrogène(figure 17) entre une espèce chimique qui les captent (oxydants) et les espèces chimiques qui les cèdent (réducteurs)(Aiche-Iratni, 2016). Un antioxydant est un composé qui réduit la teneur en oxydant c'est donc un réducteur. Il existe un grand nombre de tests utilisés *in vitro* et qui permettent de déterminer cette capacité antioxydante (Aiche-Iratni, 2016).

I.6.1. Capacité de piégeage de radical libre DPPH

Dans notre étude nous avons analysé la capacité de piégeage du radical DPPH pour des concentrations croissantes allant de 100 à 1000 µg/ml d'éthanol, de l'extrait de carpophores de *P.ostreatus* ayant poussé respectivement sur les quatre substrats de culture. Les résultats sont représentés dans les figures 17 -20.

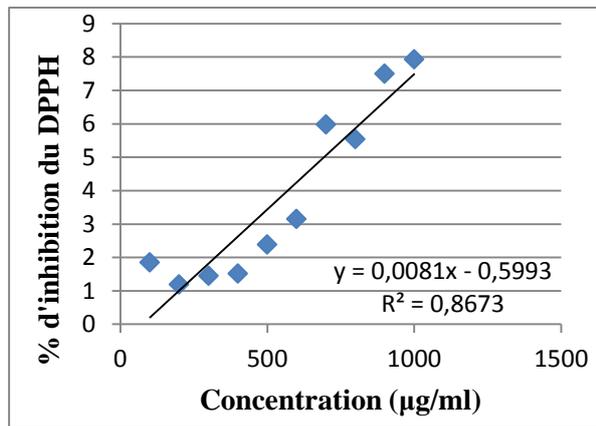


Figure 17: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de carpophores de *Pleurotus ostreatus* local ayant poussé sur grignon d'olive

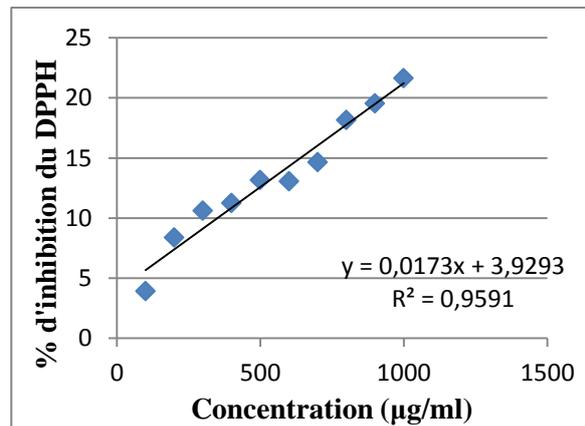


Figure 18 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de carpophores de *Pleurotus ostreatus* local ayant poussé sur marc de café

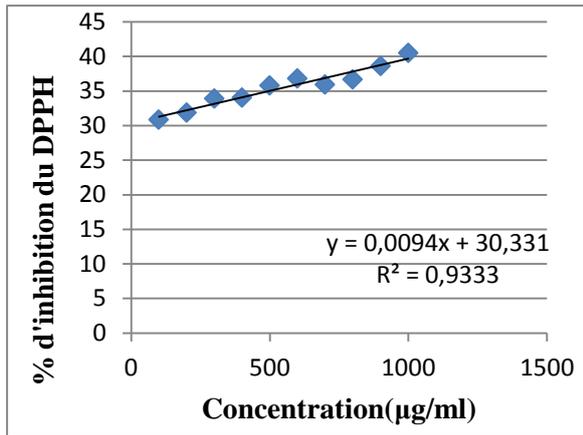


Figure 19: Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de carpophores de *Pleurotus ostreatus* local ayant poussé sur paille de blé

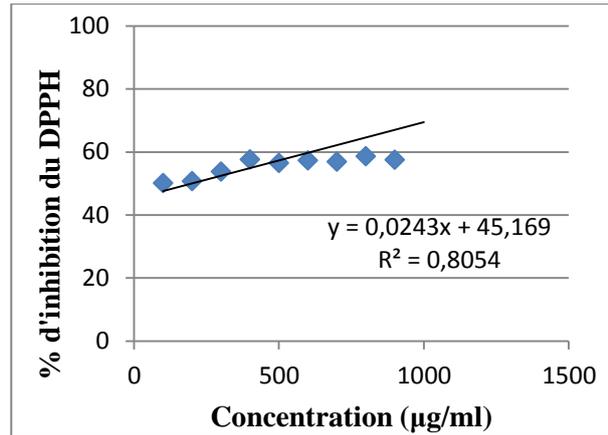


Figure 20 : Pourcentage d'inhibition du DPPH par l'extrait de carpophores de *Pleurotus ostreatus* local ayant poussé sur mélange

L'acide ascorbique (vitamine C) est le standard le plus souvent employé dans la méthode de balayage du radical libre DPPH (figure 21).

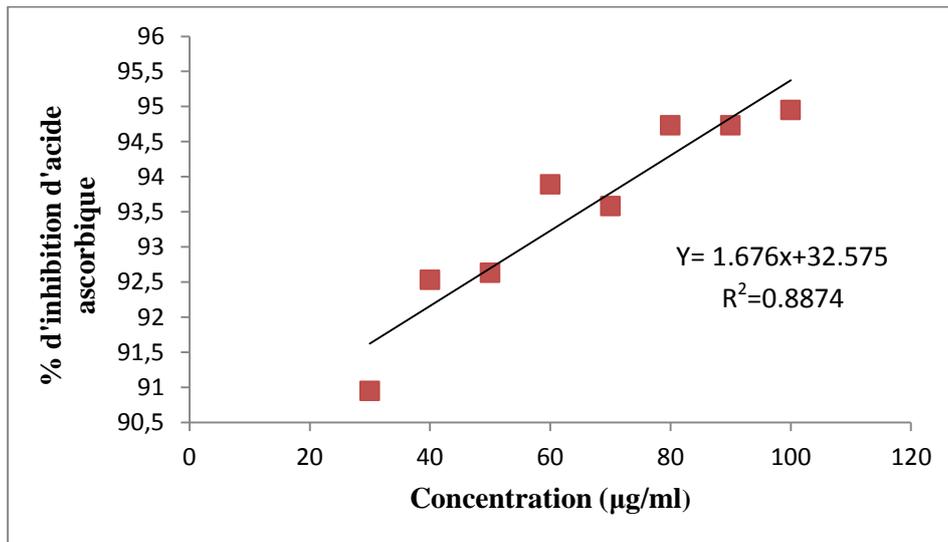


Figure 21: Courbe étalon de l'acide ascorbique (vitamine C).

Après avoir tracé la courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique (vitamine C), nous avons calculé l'IC₅₀ pour chaque composé afin de pouvoir comparer leur pouvoir antioxydant. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 22.

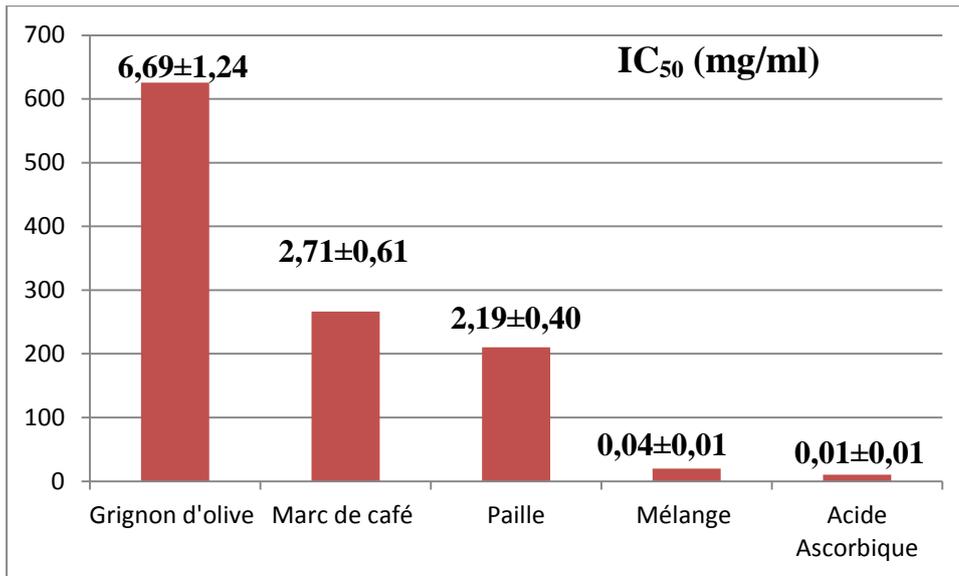


Figure 22 : Valeurs d'IC₅₀ des composées testées comparativement à celui de l'acide ascorbique.

L'activité antioxydante des extraits est exprimée en IC₅₀, ce paramètre a été employé par plusieurs groupes de chercheurs pour présenter leurs résultats, il définit la concentration efficace du substrat qui cause la perte de 50% de l'activité du radical DPPH' (Athamena, 2009). Les valeurs d'IC₅₀ sont représentées dans la figure 22. Elles sont décroissantes en allant de l'extrait issu des carpophores développés sur GO (6,69±1,24 mg/ml) en allant vers celui de l'extrait de champignon ayant poussé sur le substrat mélange M (41±0,01 µg/ml). Cette dernière valeur est la plus proche de celle obtenue avec l'acide ascorbique qui est de 10 µg/ml.

Nous pouvons conclure que l'extrait de carpophores de *P. ostreatus* ayant poussé sur le substrat de culture mélange (GO, MC, PB) à un bon pouvoir anti-radicalaire envers le DPPH' (Figure 22), plus la valeur de l'IC₅₀ est petite plus l'extrait est considéré comme un antioxydant puissant.

Les résultats que nous avons obtenus relatifs à l'extrait aqueux des carpophores de *P. ostreatus* local sont proches de ceux obtenus par Keddar, en 2012, sur l'activité antioxydante que l'huile essentielle de la plante *Daucus .crinitus* (IC₅₀ = 34,02 mg/ml) mais sont faibles comparés à l'activité des extraits aqueux du *Pistacia .lentiscus* (9,86 ± 0,37 µg/ml) obtenus par Aiche-Iratni en 2016.

Nous regrettons de n'avoir pas pu accéder à la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) qui aurait pu nous permettre de vérifier la présence de certaines substances à activité antioxydants puissante signalées par de nombreux chercheurs chez les champignons comestibles, comme la vitamine C, la vitamine E, et quel sont les polyphénols présents dans les extraits aqueux des carpophores du Pleurote local en fonction des substrats de culture. Ces données auraient complété avantageusement ce travail.

I.7. Activités antibactérienne

L'effet antibactérien des extraits de *P. ostreatus* est testé sur 2 souches bactériennes de référence à savoir *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876 (gram +). Les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37°C sont visibles dans les figures 24 à 27. Et synthétisés dans le tableau 8.

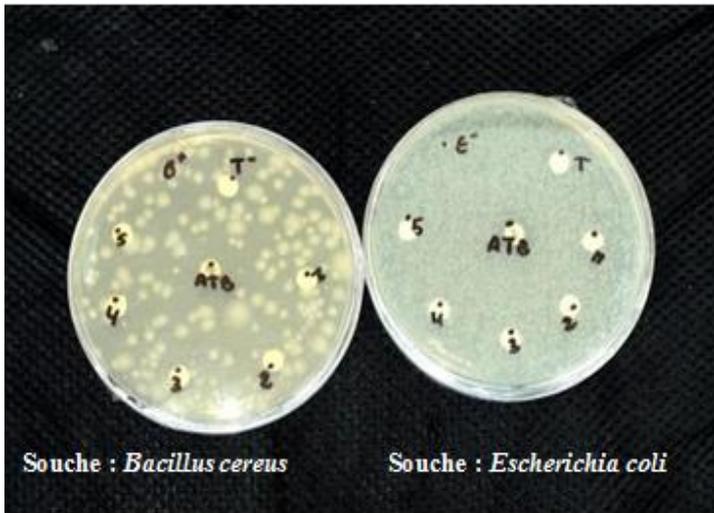


Figure 23 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de *Pleurotus ostreatus* local récolté sur Grignon d'olive



Figure 24 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de *Pleurotus ostreatus* local récolté sur marc de café



Figure 25 Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de *Pleurotus ostreatus* local récolté sur paille de blé

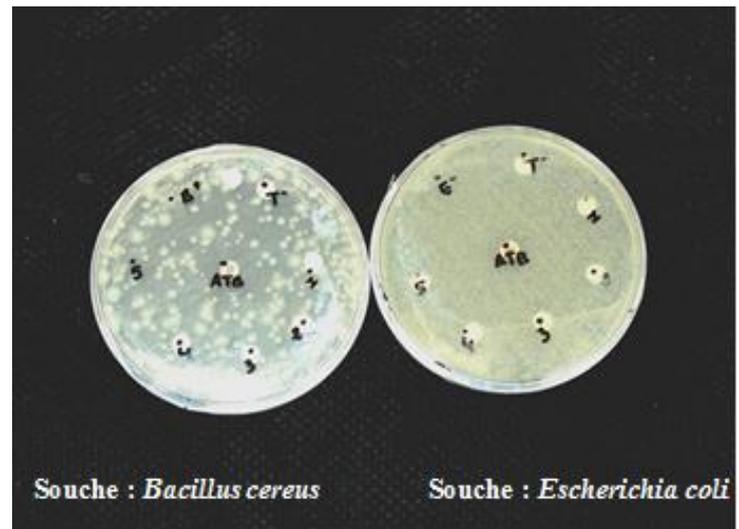


Figure 26 : Activité antibactérienne des extraits aqueux des carpophores de *Pleurotus ostreatus* local récolté sur le substrat mélange (GO-MC-PB)

Les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont présentés dans le tableau 8 :

Tableau 8 : diamètres des zones d'inhibitions en millimètres

Souches bactériennes	Diamètre moyen des zones d'inhibition en mm				
	GO	MC	PB	M	ATB
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	(-)	(-)	(-)	(-)	10,12
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	(-)	(-)	(-)	(-)	18,74

(-) : absence de zone d'inhibition

La lecture du tableau 8 révèle que *Bacillus cereus* ATCC est plus sensible vis-à-vis de la gentamicine (18,74mm) qu'*Escherichia coli* ATCC (10,12mm), en revanche les deux souches bactériennes sont résistantes vis-à-vis des extraits aqueux des carpophores de *Pleurotus ostreatus* local aux concentrations testées.

Notre recherche bibliographique nous permet de dire que l'activité antibactérienne est influencée par la nature du solvant d'extraction ainsi que la souche bactérienne : *P.ostreatus* commercial n'a montré aucune activité antibactérienne envers certaines souches pathogènes comme *E. coli* NCTC 25922, *E. coli* NCTC 9001 et *E. coli* 0157 NCTC 12900, mais une bonne activité contre *E.coli* RCMB (B 004 001 "4") a été observée avec les extraits aqueux (23±3 mm) , mais aucune activité antibactérienne n'a été observée pour des extraits éthanoliques et méthanoliques (Hearst et al, 2014). (NCTC= National Collection of Type Cultures)

Les extraits aqueux de ce champignon ont présenté une activité envers la souche pathogène *Bacillus subtilis* NCTC 10400 avec une zone d'inhibition de 7mm de diamètre ainsi qu'une activité envers *Bacillus subtilis* RCMB (B 00300 1"2") (16mm), mais aucune activité n'a été observée avec les extraits méthanoliques (Hearst et al, 2014) (RCMB= Regional Center for Mycology and Biotechnology, Egypt)

Le facteur génétique doit aussi être pris en considération: Les champignons ayant poussés dans la nature présentent des activités antibactériennes pour pouvoir survivre dans leur milieu alors que les champignons cultivés à partir d'une souche mère ne présentent aucune activité (Lakshmi, 2013), Ce phénomène a été expliqué par cet auteur par une possible perte de gènes déclencheurs d'un mécanisme de toxicité envers les microorganismes. .

L'absence de l'activité antibactérienne peut être également expliquée par le type et le taux de polyphénols présents dans les champignons. Par exemple des flavonoïdes dépourvus des groupements hydroxyles libres ont plus d'activité antimicrobienne par rapport à ceux qui en sont pourvus, ce qui conduit à une augmentation de leur affinité chimique aux lipides membranaires (Zeghad, 2009).

Karou et al (2005) expliquent cette absence d'activité antibactérienne par un mécanisme de toxicité de certains composants du champignon vis-à-vis des microorganismes qui se fait soit par des interactions non spécifiques telles que l'établissement des ponts hydrogènes avec les protéines des parois cellulaires ou les enzymes, la chélation d'ions métalliques, l'inhibition du métabolisme bactérien, la séquestration de substances nécessaires à la croissance des bactéries.

Les extraits que nous avons utilisés n'ont pas pu être stérilisés par manque de filtre millipores. Comme nous pouvons le voir sur les figures 23 à 26, il y a présence de levures contaminantes. Sont-elles à l'origine de cette absence d'activité antibactérienne ?

I.8. Etude statistique

Tableau 9: Tableau d'analyse de la variance des polyphénols totaux dosés

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var. Totale	108,058	11	9,823				
Var. Facteur1	106,09	3	35,363	143,72	0		
Var. Résiduelle 1	1,968	8	0,246			0,496	3,56%

Tableau 10: Test de Newman-Keuls au seuil de 5% pour les polyphénols totaux

F1	Libelles	Moyennes	Groupes homogènes			
4.0	M	18,213	A			
3.0	PB	14,92		B		
2.0	MC	12,253			C	
1.0	GO	10,293				D

Tableau 11: Tableau de variance des flavonoïdes totaux dosés

	S.C.E	DDL	C.M.	TEST F	PROBA	E.T.	C.V.
Var.Totale	26,354	11	2,396				
Var. Facteur1	23,379	3	7,793	20,953	0,00051		
Var.Residuelle	2,975	8	0,372			0,61	26,09%

Tableau 12: Test de Newman-Keuls au seuil de 5% pour les flavonoïdes totaux

F1	Libelles	Moyennes	Groupes Homogènes	
4.0	M	4,603	A	
3.0	PB	2,373		B
2.0	MC	1,253		B
1.0	GO	1,12		B

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le Basidiomycète comestible, *Pleurotus ostreatus*, est cultivé et consommé à travers le monde pour ses bienfaits nutritionnels et ses vertus thérapeutiques et peut être qualifié d'alicament ou aliment fonctionnel.

Notre étude a porté sur les propriétés antioxydantes et antibactériennes des extraits aqueux de carpophores d'une souche locale de *P. ostreatus*, utilisée pour valoriser 3 résidus agricoles, le grignon d'olive, le marc de café et la paille de blé, et le mélange (M) formulé à partir de ces 3 résidus (GO-MC-PB aux taux respectifs de 44% ; 44% et 10%, plus 2% CaCO₃).

L'étude quantitative des polyphénols totaux par la méthode de dosage à l'aide du réactif de Folin-Ciocalteu, des flavonoïdes totaux à l'aide du réactif AlCl₃, et des tanins totaux à l'aide de FeCl₃, a révélé l'influence du substrat de culture sur la concentration en composés phénoliques dans les carpophores récoltés sur les 4 substrats de culture. C'est le substrat formulé (M) qui a permis l'obtention de carpophores les plus riches en polyphénols et à potentiel anti radicalaire (mesuré par la méthode du DPPH) le plus élevé. Cela laisse supposer une corrélation entre la quantité de composés phénoliques et l'activité antioxydante (l'analyse statistique est en cours).

Nous pouvons recommander très favorablement la consommation du champignon *P. ostreatus*, de préférence, qui a poussé sur le mélange de résidus agricoles, car plus riche en antioxydants, en tenant compte du fait que ces derniers contribuent de manière très efficace à la prévention de maladies telles que le cancer et les maladies cardiovasculaires.

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives de recherche :

- les tests antibactériens que nous avons réalisés vis-à-vis de deux bactéries pathogènes référencées, se sont révélés négatifs. Avant de conclure à une absence totale d'activité antibactérienne, d'autres essais doivent être réalisés,
- identifier par HPLC et autres techniques, les molécules actives du Pleurote en relation avec ses substrats de culture,
- sachant que de nombreux déchets agricoles sont disponibles dans notre pays, il faut les exploiter afin de cultiver cette espèce de champignon, voir d'autres espèces, à des fins thérapeutiques et pharmacologiques,
- travailler sur des extraits alcooliques
- travailler sur des champignons cultivés à l'air libre, dans la nature.
- optimiser les proportions en GO, MC et PB afin d'avoir des champignons avec de meilleures activités biologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Aiche-Iratni G. 2016. *Activités biologiques, d'intérêt médical, d'extraits de feuilles de Pistacialentiscus et d'Orignummajorana*. Thèse de Doctorat: Microbiologie : Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques Université de Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou.
2. Appalasaamy S., Lo K. Y., Ch'ng S. J., Nornadia K., Othman A. S., Chan L. K. 2014. Antimicrobial activity of artemisinin and precursor derived from *in vitro* plantlets of *Artemisia annua*L. *BioMed Research International*. 2014:..doi: 10.1155/2014/215872
3. Athamena S. 2009. Etude quantitative des flavonoïdes des graines de *Cuinumcyminum* et les feuilles de *Rosmarinusofficinalis* et l'évaluation de l'activité biologique. Mém . de magister : Biochimie Appliquée. Faculté des Sciencesde l'Université El-HADJ LAKHDAR Batna.
4. Bag G.C, Grihanjali D.P, Bhaigyabati T. 2015. Assessment of total flavonoid content and antioxidant activity of methanolic rhizome extract of three hedychium species of manipur valley. *International Journal of Pharmaceutical sciences Review and Research*. vol. 30, n° 28, p.154-159.
5. Becton Dickinson GmbH , 2013. Mode d'emploi – milieux en boites de Pétri prêts à l'emploi. Germany. p3.
6. Bio-Rad, 2011. Etude de la sensibilité aux agents antimicrobiens. Disques pour antibiogramme, cartouche de 50 disques.
7. Blandeau E.2012. *Etat des lieux du potentiel anticancéreux de neuf champignons macroscopiques*. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie: Département de pharmacie d'Anger.
8. Burnichon N.& Texier A., 2003. L'antibiogramme : la détermination des sensibilités aux antibiotiques. *DES bactériologie*, 29p.
9. Comité de l'Antibiogramme de l'Association Française de Microbiologie, 2015. *Recommandations 2015*, 116p.
10. Dougnon T.V., Johnson R.C., Bankolé H.S., Koudjalé B., Hounmanou G., Baba-Moussa L., Boko M., 2016. Évaluation de la performance de trois marques de disques d'antibiotiques vendues au Benin. *HealthSci. Dis: Vol 17 (4) 71-79*.
11. Ghedadba N, Bousselsela H, Hambaba L, Benbia S, Mouloud Y.2014. Évaluation de l'activité antioxydante et antimicrobienne des feuilles et des sommités fleuries de *Marrubiumvulgare* L. *Phytothérapie*, vol.12, p.15-24.

12. Givelet P.-H., 2011. Compléments alimentaires à base de champignons. Diplôme d'études spécialisées de Docteur en Pharmacie : Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille : Université de Lille p.2. 92.
13. Hearst M, Nelson D, McCollum G , M. Ballard L, Millar B.C, Moore S, McClean S, Moore J.E, Rao1 J.R. 2010. Antimicrobial properties of protein extracts from wild mushroom fungi and native plant species against hospital pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy* . Vol. 2, n° 8, p. 103-107.
14. Hagerman, A.E., and L.C.Bulter. 1989
15. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin.J. Chem.Ecol.151795810.vol. 15. P.1795-1810
16. Iwalokun B., Usen. U, Otunba.A, Olukoya.D.2007.Comparative phytochemical evaluation, antimicrobial and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus*.*African Journal of Biotechnology*, vol. 6, n° 15, p. 1732-1739.
17. Karou D., Dicko M. H., Simporé J., Yameogo S., Sanon S. et Traoré A. S. 2005. Activités antioxydantes et antibactériennes des polyphénols extraits de plantes médicinales de la pharmacopée traditionnelle du Burkina Faso. Maitrise des procédés en vue d'améliorer la qualité des aliments, utilisation des OGM, analyse des risques en agroalimentaire. 8-11 novembre. Ouagadougou.
18. Keddar M. 2012.*Compositions chimique activité antibactériennes, antioxydants des huiles essentielles de quelque Daucus*.Mém. de Master : chimie bio organique et thérapeutique : universitéaboubakerbelkaiedfaculté des sciences.
19. Kim D. O., Chun O. K., Kim Y. J., Moon H. Y., Lee C. Y. (2003) Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. vol 51, n° 22 , p.6509-6515.
20. Lakhtar H.2009.*Culture du Lentinulaedodes (Berk.) Pegler sur résidus oléicoles en fermentation en milieu solide : Transformation des polyphénols des margines*. Mém. DOCTORAT : Biologie des Populations et Ecologie.Faculté des Sciences et Techniques - Saint Jérôme.
21. Lakshmi Priya.J, 2013. Studies On The Antibacterial Activities Of Mushroom. *International Journal OfInovative Research & Development*, Vol. 2, n° 6, p. 862-874.

22. LantoineBriquanne E., 2003. Les statines : effets indésirables et interactions médicamenteuses Thèse présentée pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie Faculté de pharmacie, Université Henri Poincaré de NancyI ,154p.
23. *Les polyphénols en agroalimentaire*.2006.Sous la dir .de SARNI-MANCHADO P et CHEYNIER V. Paris : Lavoisier.
24. Lindequist U, H. J Niedermeyer T, Wolf-Dieter J.The Pharmacological Potential of Mushrooms. *eCAM* , vol.2, n° 3, p.285–299.
25. Mansour-Benamar M.2016.*Valorisation des résidus agricoles par la culture de deux souches de champignons comestibles de genre pleurotus*.Thèse.D.E.S.B : Biologie végétale : Faculté des sciences biologiques et des sciences agronomiques.
26. Mirunalini S, Deepalakshmi K.2014.*Pleurotus ostreatus*: an oyster mushroom with nutritional and medicinal properties. *Journal of biochemistry and technology*, vol. 5, n° 2, p.18-726.
27. NEFZAOUI A. *Valorisation des sous-produits de l'olivier*. In Tisserand J. –L- (ed), Alibés X.(ed).
28. I P., 1993.la culture des champignons. Edition Collection le produit. Ministère de la coopération.
29. Oyetayo V.O, Ariyo O.O .2013.Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fries) Cultivated on Different Tropical Woody Substrates. *Journal of Waste Conversion, Bioproducts and Biotechnology*, vol.1, n° 2, p.28–32.
30. Patel Y, Noraian R, Singh V.K, 2012. Medicinal properties of Pleurotus species (Oyster Mushroom) .*World Journal of Fungal and Plant Biology*, vol. 3, n°1, p01-12.
31. Pedneault K. 2007. *Étude de composés extractibles chez les champignons indigènes du Québec*. Thèse de doctorat : Biologie végétale. Faculté des sciences de l'agriculture et de l'alimentation université LAVAL Québec.
32. Rajarathnam, S. &Bano Z., 1989. Pleurotus mushrooms part III. Biotransformation of naturallignocellulosicwastes: commercial applications and implications. *CritRev Food Sci Nutr.*;28(1):31-113.
33. Roquebert B. &Leleu J., 2010. La transcriptase inverse du VIH-1 : rôle du domaine de connexion et de la RNase H dans la résistance aux antirétroviraux. *Virologie*, 14 (2) : 129-139.
34. Sadegh F, Ebrahim Z, Zeïnab A, Roghayeh P, Ali M.A, Amrollah M, I. 2014. Total Phenolic and Flavonoid contents of aqueous extract of stinging nettle an *in vitro*

- antiproliférative effect on HeLa and BT-474 cell lines. *International Journal Molecules Cells Medicine*. vol 3, p. 7-102.
35. Sansoucy R., 1984. Utilisation des sous-produits de l'olivier en alimentation animale dans le bassin Méditerranéen. *Etude FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Production et Santé Animales*, vol. 43, p148.
36. Wandati T. W, Kenji G. M, Onguso J. M. 2013. Phytochemicals in Edible Wild Mushrooms From Selected Areas in Kenya. *Journal of Food Research*. Vol. 2, n° 3, p.137-144.
37. Wong F.C, Chai T.T, Tan S.L, Yong A.L. 2013. Evaluation of Bioactives and Phenolic Content of Selected Edible Mushrooms in Malaysia. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. Vol. 12, n°6, p.1011-1016.
38. YIM H.S, Chye F.Y, Ho S.K, Ho C.W. 2009. Phenolic profiles of selected edible wild mushrooms as affected by extraction solvent, time and temperature. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*. vol. 2, n° 03, p392-40
39. Younis M. A, Fang-Sheng W, El Shikh H. 2015. Antimicrobial Activity of Extracts of the Oyster Culinary Medicinal Mushroom *Pleurotus ostreatus* (Higher Basidiomycetes) and Identification of a New Antimicrobial Compound. *International Journal of Medicinal Mushroom*, vol.17, n°6, p.579–590.
40. Zeghad N. 2009. *Etude du contenu polyphénolique de deux plantes médicinales d'intérêt économique (Thymus vulgaris, Rosmarinus officinalis) et évaluation de leur activité antibactérienne*. Mém. de magister: Biotechnologie végétale. Faculté des sciences de la nature et de la vie de Constantine.

Résumé

Pleurotus ostreatus est un champignon comestible appartenant aux Basidiomycètes. Il est de plus en plus cultivé pour ses vertus nutritives et médicinales. La poudre obtenue après séchage et broyage des carpophores de la souche locale de *Pleurotus ostreatus* ayant poussé sur quatre substrats, à savoir le grignon d'olives, marc de café, paille de blé et le mélange des trois substrats nous a servi à préparer, dans les mêmes conditions opératoires, des extraits aqueux qui ont été par la suite lyophilisés. Les dosages effectués ont montré que les carpophores récoltés sur le mélange (GO+MC+PB) avaient la teneur la plus élevée en Polyphénols totaux ($3,679 \pm 0,076$ mg EAG/g MS) et Flavonoïdes totaux ($0,798 \pm 0,060$ mg EQ/g MS). Pour les Tanins totaux, les concentrations sont minimales et négligeables. L'activité antioxydante a été mesurée à l'aide du test de piégeage du DPPH, le potentiel antioxydant le plus important est celui du mélange ($IC_{50} = 0,04 \pm 0,01$ mg/ml). Les tests microbiologiques ont démontré que pour tous les substrats de culture, le champignon ne possède aucune activité antibactérienne. La nature du substrat de culture influence l'activité antioxydante qui augmente avec l'élévation du taux en polyphénols totaux.

Mots clés : *Pleurotus ostreatus*, substrats de culture, polyphénols, activité antioxydante, activité antibactérienne.

Abstract

Pleurotus Ostreatus is an edible mushroom which belongs to Basidiomycetes; it is cultivated for its medicinal and nutritional properties. The powder obtained before drying and grinding local strain of *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies cultivated on four different substrates which are pomace olive, coffee grounds, wheat straw and a mixture of both the three is used to prepare, at the same conditions, water extracts which are lyophilized. The dosages carried out showed that the *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies obtained from the mixture (PO+CG+WS) has the highest quantity of total polyphenolic contents ($3,679 \pm 0,076$ mg EAG/g DM) and total flavonoids contents ($0,798 \pm 0,060$ mg EQ/g DM), for total tannin content, it is impossible to determine it. The antioxidant activity was measured by the radical scavenging test of DPPH, the highest antioxidant potential belongs to the mixture fruiting bodies ($IC_{50} = 0,04 \pm 0,01$ mg/ml), microbiological test revealed that all substrate mushrooms' don't have any antibacterial power. Substrates influences antioxidant potential growing up as long as total phenolic contents is high.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, substrates, phenolic contents, antioxidant activity, antibacterial activity.