



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique

Université des frères Mentouri Constantine

Faculté des Sciences de la Nature et de Vie

قسم الميكروبيولوجيا

Département de Microbiologie



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة

كلية علوم الطبيعة والحياة

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances
fongiques**

Intitulé :

**Production de substances bioactives par *Aspergillus repens* sur milieu à base
d'extrait de Figes de Barbarie (*Opuntia ficus-indica*)**

Présenté et soutenu par :

Benkikaia Basma

Chebira Imène

Le : 25/06/2015

Jury d'évaluation:

Président du jury : Mr. DEHIMAT L.

Prof. UFM Constantine.

Rapporteur : Mlle. YUCEF-ALI M.

Dr. UFM Constantine.

Examineur : Mr. KACEM CHAUCHE N.

Prof. UFM Constantine.

Année Universitaire

2014-2015

Remerciements

Nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout au bon Dieu qui nous a donné la force et la volonté d'élaborer ce modeste travail.

*Nous tenons à adresser nos remerciements les plus sincères et chaleureux à **Mme YOUCEF-ALI M** ; docteur à l'université frères Mentouri d'avoir assuré notre encadrement.*

*Nous tenons aussi à exprimer toute notre gratitude à **Mr DEHIMAT L**; doyen de la Faculté des Sciences de la Nature et la Vie pour avoir accepté la présidence de ce jury.*

*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à **Mr KACEM CHAOUCHE N** qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillance et nous en sommes très honoré.*

Enfin, nous remercions toute l'équipe du laboratoire aMyBAM et tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicace

*Je dédie ce travail à mes chers parents, qu'ils trouvent ici le témoignage de
ma profonde gratitude pour leur amour, leur encouragement et leur soutien tout au*

long de mes études, que

D.F.E.U les bénisse.

A mes chers frères Ahmed, Amine et Mohammed.

A tous mes amis

A tous mes collègues de promotion

A tous ceux que j'aime.

Imène

Dédicace

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage ; patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A mes très chers parent qui Dieu me le gardes qui je dois mon éducation et ma réussite.

A mon frère Ramzi

A ma sœur Faiza

A toute ma famille surtout ma nièce Meriem

A tout mes ami surtout Adjial, Manel et Nessrine, et ma binôme Imene.

Basma



Liste des figures

- Figure 1:** Schématisation d'une cladode avec ses différents composants.
- Figure 2 :** Figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) de la région de Hamma Bouziane, Constantine (Algérie).
- Figure 3 :** Variété d'*Opuntia ficus-indica*: **(A)** : épineuse; **(B)**: inerme.
- Figure 4:** Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*.
- Figure 5 :** Structures chimiques des composés (1-2).
- Figure 6:** Lieu d'isolement d'*A. repens* ; rhizosphère de la région d'Ain M'lila.
- Figure 7 :** Figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) de la région de Hamma Bouziane, Constantine.
- Figure 8:** Etapes de préparation du jus de figes de barbarie (*Opuntia ficus-indica*).
- Figure 9:** Milieux de fermentation ;**(A)**: Jus de figes de barbarie ;**(B)**: Milieu CYL.
- Figure 10:** Aspect macroscopique d'*A. repens* sur gélose Sabouraud ; **(A)** : face de la colonie ; **(B)** : revers de la colonie.
- Figure 11 :** Aspect microscopique d'*Aspergillus repens* à grossissement X100 : **(A)** mycélium septé ; **(B)** Tête conidiénne dressée, unisérié ; **(C)** : spores lisses.
- Figure 12:** Développement d'*Aspergillus repens* sur différents milieux ; **(A)** : sur gélose à base d'extrait de figes de barbarie; **(B)**: sur gélose Sabouraud; **(C)**: sur gélose CYA.
- Figure 13 :** Aspects macroscopiques des microorganismes test sur gélose ; **(A)** : *Candida tropicalis* ; **(B)** : *Bacillus sp.* ; **(C)** : *Escherichia coli* ; **(D)** : *Penicillium sp.*
- Figure 14 :** Inhibition, *In vitro*, du développement des microorganismes test par *A. repens*; **(A)** : inhibition du développement d'*E.coli* ; **(B)** : inhibition du développement de *Bacillus sp.* ; **(C)** : inhibition du développement de *C. tropicalis*.
- Figure 15:** Développement d'*Aspergillus repens* sur : **(A)** milieu à base d'extrait de figes de barbarie ; **(B)** milieu CYL.
- Figure 16 :** Filtration des cultures sur papier Wattman Grade1.
- Figure 17:** Décantation dans une ampoule à décanter du filtrat obtenu à partir du milieu à base d'extrait de figes de barbarie.
- Figure 18** Concentration de l'extrait chlorophormique.
- Figure 19** Différents extraits obtenus après concentration ; **(A)** : Extrait issu d'une culture sur milieu à base d'extrait de figes de barbarie ; **(B)** : Extrait obtenu d'une culture sur milieu CYL.

Figure 20 Chromatographie sur couche mince présentant des spots des substances actives produites par *Aspergillus repens* dans différents milieux : **(A)** : Dépôt de l'extrait issu de la culture à base d'extrait de figues de barbarie ; **(B)** : Dépôt de l'extrait issu de la culture CYL.

Liste des tableaux

Tableau 1: Composition chimique du fruit d'*Opuntia ficus indica* .

Tableau 2: Composition chimique du jus des figues de barbarie.

Tableau 3 : Classification des antifongiques selon la cible.

Tableau 4 : Aspect morphologique d'*Aspergillus repens* sur différents milieux.

Tableau 5 : Effet d'*Aspergillus repens* sur les microorganismes test.

1. Introduction

1- Introduction

Les microorganismes sont largement exploités en Biotechnologies pour leur production de différents métabolites primaires et secondaires (Demain, 2000) ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes dans divers domaines (médical, pharmaceutique, agriculture, ...etc). Parmi ces molécules, les antibiotiques et les antifongiques, des substances naturelles bioactives, produites essentiellement par différentes espèces de champignons (Zhang *et al.*, 2006).

En effet, les espèces *Aspergillaires* sont largement exploitées dans la production d'une gamme étendue d'acides organiques (acide citrique, acide gluconique,...), d'enzymes (protéases, lipases, amylases,...) et des métabolites bioactifs (antibiotique, antifongique) (Abracaet *al.*, 2004 ; Varga *et al.*, 2004 ; Hölker *et al.*, 2004 ; Bouchet *et al.*, 2005; Heitman *et al.*, 2007), dont la biosynthèse de ces derniers produits naturels, est habituellement associée au développement et à la différenciation du champignon (Ward *et al.*, 2006).

Comme la plupart des moisissures, *Aspergillus repens* est parmi les espèces dotées d'un pouvoir de production de différents métabolites secondaires, pouvant avoir un effet antimicrobien remarquable (Slacket *al.*, 2009).

Par ailleurs, le figuier de barbarie, qui est une plante originaire des régions aride et semi-aride du Mexique, a été introduite en Afrique du Nord vers le 16^{ème} siècle (Habibi, 2004). Sa remarquable variabilité génétique lui procure une forte adaptabilité écologique, ce qui lui permet de vivre sous différentes conditions climatiques (Stintzing & Carle, 2004). Les températures maximales supportées excèdent les 50 à 58°C, Bien que cette espèce ait une large faculté d'adaptation pour différents sols (acides, calcaires ou pauvres en matière organique), elle a une préférence pour les sols très perméables, sableux ou caillouteux (Nerd *et al.*, 1991 ; Skiredj *et al.*, 1998).

Les figues de Barbarie, constituent une matière première potentiellement importante et abondante pour l'industrie. Sa culture joue un rôle stratégique dans l'agriculture (Habibi *et al.*, 2008). Ces fruits sont également riches en minéraux tels que le magnésium et le calcium (Feugan *et al.*, 2006). La totalité des sucres présents dans le fruit est constituée de glucose et de fructose dans un rapport de 18:1. Ce rapport est considéré comme une spécificité des figues de Barbarie par rapport à celui des autres fruits. La teneur en acides aminés libres (257

mg/100g) est largement supérieure à la teneur moyenne des autres fruits à l'exception des raisins et des agrumes qui contiennent une teneur identique (Stintzing *et al.*, 2001). En plus de ses qualités et de ses valeurs nutritionnelles, le fruit du figuier de barbarie est considéré comme un produit très bon marché dans toutes les régions de l'Algérie, puisque il n'est pas exigeant pour sa culture et occupe des territoires impropres à l'agriculture.

Toutes ces propriétés liées au figuier de barbarie, nous ont laissé penser à utiliser ses fruits comme substrat de production de métabolites secondaires, pouvant avoir des effets biologiques remarquables. De ce fait, l'objectif principal du présent travail, repose sur la production de substances bioactives à partir d'une souche d'*Aspergillus repens* sur un milieu à base d'extrait de figes de barbarie (*Opuntia ficus-indica*). Plusieurs points sont pris en charge dans cette étude pour répondre à cet objectif à savoir ;

- L'étude des caractères morphologiques de la souche *Aspergillus repens* ;
- L'étude de développement de la souche sur différents milieux solides, en particulier, celui à base d'extrait de figes de barbarie ;
- La mise en évidence, *in vitro*, de l'activité antimicrobienne d'*Aspergillus repens*;
- La production de substances bioactives, par fermentation, en erlens, sur milieu liquide à base d'extrait de figes de barbarie;
- L'extraction et la purification des substances bioactives produites;

2. Revue bibliographique

-

2 - Revue bibliographique

2.1 - Figue de barbarie

2.1.1- Les figues de barbarie dans le monde végétal

Le figuier de Barbarie est une plante originaire des zones tropicales du continent Nord-Américain, en particulier du Mexique. Il a été introduit au Nord et au Sud de l'Afrique et tout au long du bassin méditerranéen vers 16^{ème} siècle, comme pour beaucoup d'autres espèces végétales et animales (Araba *et al.*,2000).Le figuier de Barbarie qui est une plante xérophyte, produit des fruits comestibles et du fourrage pour le bétail, ses raquettes sont riches en eau et éléments nutritifs(Arba,2009).Plusieurs noms sont attribués au figuier de barbarie afin de donner une parfaite présentation de cette plante (Oued *et al.*,1990) :

-Nom scientifique : *Opuntia ficus indica*

-Nom berbère : El hendi, sabara, karmoussnsarra

-Nom français : Fiquier de barbarie, le nopal,figuier d'inde

-Nom anglais : Pricklypear

Il est appelé aussi,Cactus-raquette, oponce, figue de chrétien (Felice ,2004).

2.1.2- Morphologie

La raquette (figuier de barbarie) est un arbre à tiges aplaties, appelées cladodes érigées ou retombantes. Elles peuvent être couvertes d'épines ou non, La racineest superficielle, caractérisée par une grande capacité d'absorption d'eau, L'article ou cladode sont des fausses tiges, ayant une longueur de 30 à 50cm et une largeur de15 à 30cm (figure 1). La couleur des cladodes est vert mat. Ils ont la grande capacité d'emmagasiner l'eau, Leurs fleurs ont une couleur jaune à jaune orangée, ayant une longueur de 7 à 10cmsur 3 à 6cm de diamètre. Elle apparaît au sommet des articles terminaux, Les fruits se trouvent à l'extrémité des cladodes. Leurs caractéristiques varient suivant les espèces à savoir : la taille, le poids,la forme ainsi que la couleur(Astier*etal.*, 2004).

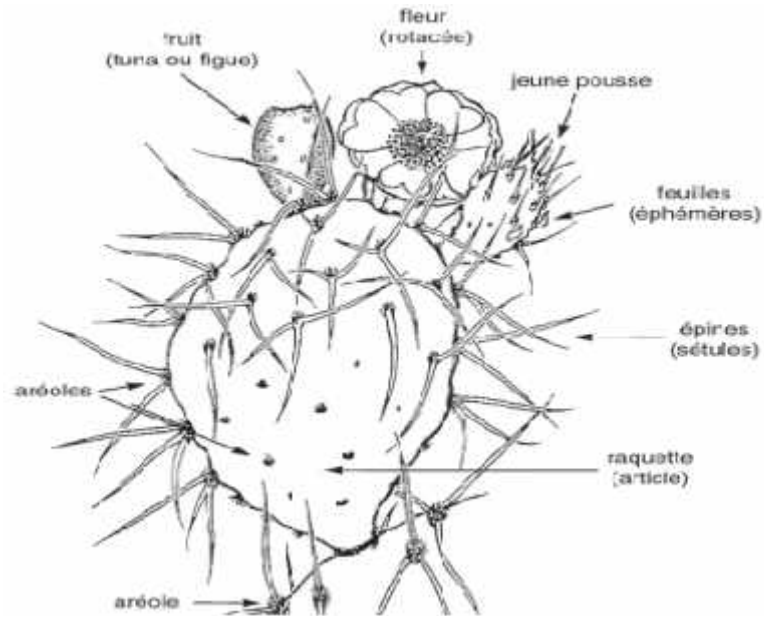


Figure 1: Schématisation d'une cladode avec ses différents composants (Schweizer, 1997).

2.1.3 –Le Figuier de barbarie en Algérie

Les espèces de cactus les plus largement répandues dans les pays du Maghreb, sont *Opuntia dillenii*, *Opuntia vulgaris*, *Opuntia compressa* et *Opuntia ficus indica*. Cette dernière est la principale espèce qui produit les fruits comestibles (Arbaet *al.*, 2000). Deux formes d'*Opuntia ficus indica* (L.) (figure 2) poussent dans plusieurs steppes Algériennes étudiées par Chaouche et Abdul-Hussain, (2008): une inerme et une épineuse (figure 3).

- Les formes inerms présentent des différences au niveau de leurs pores, de la couleur du fruit et de la période de fructification. Les dimensions et le poids du fruit est influencés par la période sèche et par la période de précipitation.
- Les formes épineuses font partie de trois étages bioclimatiques différents et elles diffèrent entre elles par la couleur de la chaire et par la présence des épines (Su et Zhao, 2003).



Figure 2 : Figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*) de la région de Hamma Bouziane, Constantine (Algérie).

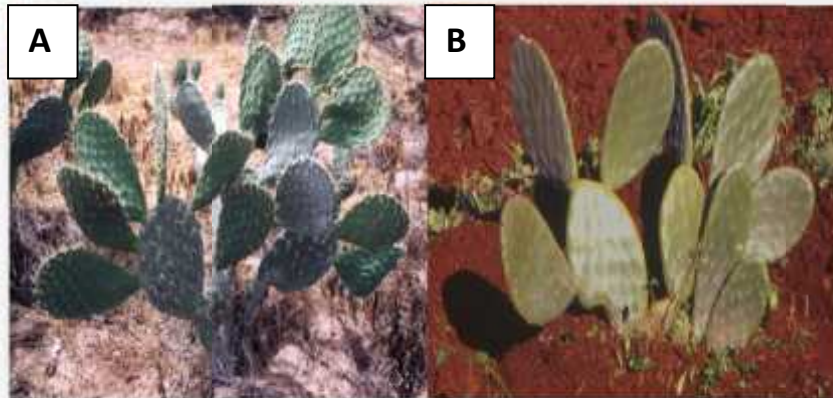


Figure3 : Variété d'*Opuntia ficus-indica*: (A) :épineuse; (B):inermes (Mulas M et Mulas G, 2004).

2.1.4 - Position systématique du figuier de barbarie

Selon Wallace *et al.*, (1997), la position systématique du figuier de Barbarie est la suivante :

Famille : Cactaceae

Sous-famille : Opuntioideae

Ordre : Caryophyllales

Sous-ordre : Portulacineae

Genre : Opuntia

Espèce : *O. Ficus indica*(L.) Mill.

2.1.5–Les Fruits de Figue de barbarie

Ces fruits sont d'une valeur nutritionnelle importante, ils sont sucrés et juteux et semblable à la plupart des fruits comme les oranges, les pommes, les poires, les cerises...etc. (Barbera *et al.*, 1992). Un seul fruit de figue de Barbarie plus au moins gros, pèse entre 30 et 150 g (Loudyi, 1995) et se compose d'environ 48% de pelure, 45% de pulpe et 7% de graines (Hamdi, 1997). La composition chimique de ce fruit est illustrée dans le tableau suivant :

Tableau 1:Composition chimique du fruit d'*Opuntia ficus indica* (Feuganget *al.*, 2006).

Composants du fruit	Pourcentage (%)
Eau	84-90
Cendres	0,3 -1
Sucres totaux	10-17
Sucres réducteurs	4-14
pH	5,3 -7,1
Fibres	0,02-3,15
Acidité titrable (acide citrique)	0,01-0,12
Protéines	0,21-1,6
Lipides	0,09-0,7
Teneur en vitamines et en antioxydants	Par 100g
Vitamine C	12-81 mg
Vitamine E	111-115 µg
Vitamine K1	53 mg
Caroténoïdes totaux	0,29-2,37 g
➤ beta-carotène	1,2 -3,0 µg
Flavonoïdes:	
➤ Dérivés de Kaempférol	0,11-0,38 g
➤ Dérivés de quercétine	0,98-9 g
➤ Dérivés d'isorhamnétine	0,19-2,41 g
Teneur en sels minéraux	(mg/100g)
Calcium (Ca)	12,8 -59
Magnesium (Mg)	16,1 -98,4
Potassium (K)	90-220
Phosphore (P ou PO4)	15-32,8
Fer (Fe)	0,4 -1,5

Par ailleurs, la composition chimique du jus des figes de barbarie sans pelure est représentée dans le tableau 2. Ce jus est obtenu à partir des fruits par des procédés mécaniques, fermentescibles, mais non fermenté, possédant la couleur, l'arome et le gout caractéristique du fruit (Vierling, 2008).

Tableau 2: Composition chimique du jus des figes de barbarie (Hassan et al ,1994).

Composants	Concentration
Glucose	40(g/l)
Fructose	51(g/l)
Protéines	4.2(g/l)
Proline	0.50(g/l)
Acide citrique	1.30(g/l)
Pectine	0.40(g/l)
Cendre	3.80(g/l)
Ca ²⁺	144(mg/l)
Na ⁺	30(mg/l)
K ⁺	1720(mg/l)
Magnésium ²⁺	320(mg/l)
Manganèse ²⁺	1.40(mg/l)
Fe ⁺	1.55(mg/l)
Zn ²⁺	1.70(mg/l)
Cu ²⁺	0.45(mg/l)
Phosphore	36(mg/l)
C:RapportdeN	50(mg/l)

2.1.6 - Utilisation des fruits des figes de barbarie

Le fruit revêt plusieurs vertus thérapeutiques et nutritionnelles dont certaines restent peu connues. En effet, la littérature rapporte que ce fruit est utilisé dans la prévention des maladies telles que le diabète, certains troubles cardio-vasculaires, les infections de l'appareil urinaire et les troubles digestifs (Alimiet al,2010). Outre sa consommation à l'état frais, ce fruit est également utilisé pour la fabrication de jus, de gelées, de confitures. Plusieurs études ont été

menées sur l'huile des graines et l'huile extraite à partir de la pulpe ainsi que les organes floraux (Park, 2001 ; Ennouriet *al.*, 2005).

Le jus de figue de barbarie contient des sucres fermentescibles (Glucose et fructose), il a également été considéré comme une matière première pour la protéine monocellulaire (SCP) produite avec *Candida utilis* (Paredes-López *et al.*, 1976). En outre, il pourrait servir d'alternative à la mélasse, substrat pour la production de levure de boulanger, et ce, en aidant à diminuer les problèmes environnementaux liés à la mélasse (Hamdi, 1997; Sáenz, 2000).

2.2- Les moisissures

2.2.1- Généralité sur les moisissures

Les mycètes sont des microorganismes eucaryotes filamenteux, aérobies strictes et rarement anaérobies (Mathew, 1995 ; Tortora *et al.*, 2003), L'appareil végétatif se compose d'éléments de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés ; le mycélium (Mathew, 1995). Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents s'entourent d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ce fait, les mycètes sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). Tous les champignons sont des chimiohétérotrophes. Ces organismes peuvent souvent utiliser des polymères complexes grâce à des enzymes extracellulaires (Larpen, 1997).

Les mycètes sont principalement des organismes terrestres, bien que certains soient marins ou En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C, cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses (<15°C ou même parfois à <0°C (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003).

2.2.2- Prolifération

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction; la reproduction sexuée (parfaite) et la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative) (Senalet *al.*, 1993). La première est faite par la fusion de deux noyaux haploïdes qui forment un zygote diploïde. Ce dernier est pourvu de parois épaisses qui permettent de survivre pendant qu'il joue un rôle modeste dans la dissémination des champignons. Comparé à la voie asexuée, qui assure un pouvoir de

contamination considérable vu que la dissémination est assurée par le vent pour les champignons à développement aérien et par la microfaune et les eaux de pluie et d'irrigation pour les champignons du sol (Davet, 1996).

2.2.3 -Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Raper et Fennell, 1965) (figure 4). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al*, 1990 ; Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines.

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Morin, 1994). De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines.

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques et de molécules bioactives (Botton *et al*, 1990).

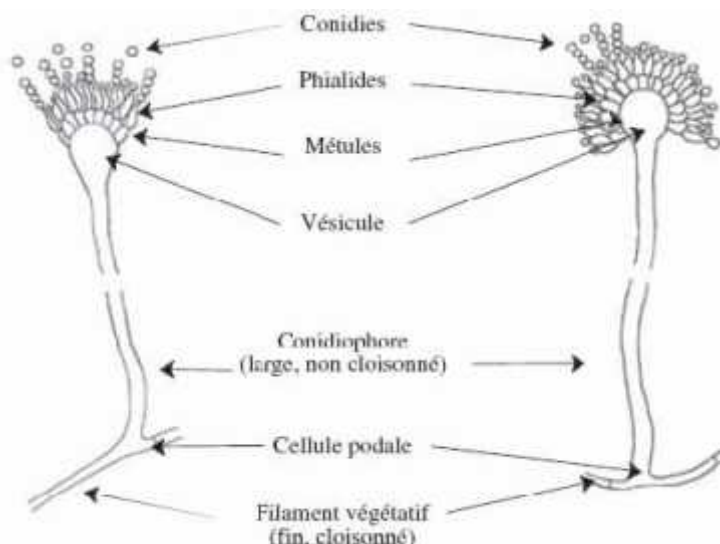


Figure4 :Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*(Raper et Fennell, 1965).

2.2.4 - *Aspergillus repens*

Aspergillus repens, est une espèce osmophile, se développant, principalement, sur substrat à faible activité en eau. Elle développe en culture les deux formes de reproduction, sexuée d'où son nom téléomorphe: *Eurotium repens* et asexuée d'où son nom anamorphe : *Aspergillus repens*(Podojilet *al.*, 1979). C'est une espèce cosmopolite retrouvée dans les bonbons contaminés, les marais salins (Podojilet *al.*, 1979 ; Kelavkaret *al.*, 1993), au niveau de l'éponge *Suberites domuncula*(Smetaninaet *al.*, 2007) et les sols agricoles (Arotupinet *al.*, 2008)avec une fréquence plus élevée dans les régions tropicales et subtropicales.

La souche d'*A.repense* est mésophile. Quoiqu' elle puisse se développer entre 7 et 40°C, la température optimale pour la formation de conidies et d'ascospores est de 25-30°C. Cependant, les températures optimales et maximales pour la germination et la croissance des ascospores sont respectivement de 24°C et 37- 40°C. Les ascospores sont tuées après 10 min d'exposition à 75°C(Gonzalez *et al.*, 1988).

2.3- Métabolites secondaires produits par *Aspergillus repens*

Beaucoup de mycètes et de bactéries peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (Demain, 1999). Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Turner, (1971) a enregistré presque 1000 produits fongiques en 1971. En 1983, le chiffre avait plus que doublé (Turner et Aldridge, 1983).

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres (Gaitatzis et al., 2002). Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier, à la phase de sporulation (Demain et Fang, 2000 ; Calvo et al., 2002). En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe (Calvo et al., 2002 ; Tortora et al., 2003).

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) (Jae-Hyuk et Keller, 2005 ; Keller et Woobok, 2005).

Les *Aspergillus* ont une grande importance économique, écologique et médicale. La production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces d'*Aspergillus* a été détectée chez *A. aculeatus*, *A. ochraceus* et *A. terreus*. Ces derniers, sont considérés comme les producteurs les plus élevés de métabolites secondaires extracellulaires, alors que les producteurs les plus faibles sont *A. tamarii*, *A. rugulosus* et plus d'*A. oryzae* (Abu - Seidah, 2003).

Comme la plupart des moisissures, *A. repens* est capable de produire différents métabolites secondaires, pouvant avoir un effet antimicrobien remarquable, cette production s'effectue par fermentation dans des conditions optimales, à savoir le choix du milieu de culture, de la température, du pH et de l'agitation. Le milieu optimal utilisé pour cet objectif est CYL ajusté à un pH de 6, la température est fixée à 28°C durant toute la période de fermentation, tout en assurant une incubation statique (Slacket al., 2009).

D'après la littérature, plusieurs métabolites secondaires sont produits par *A. repens* comme 1,8-Dihydroxy-6-méthoxy-3-méthyl-9,10-anthracenedione (physcion)(1) et 2,5-dihydroxy-3-(3-méthyl-2-butenyl)-6-[(1E)-1-heptenyl]-benzaldehyde (tetrahydroauroglaucin,(2))(figure 5)



Figure 5 : Structures chimiques des composés (1-2) (Smetanina et al., 2007).

2.4- Mode d'action des molécules antimicrobiennes

2.4.1- Mécanismes d'action des substances antibactériennes

Les facteurs les plus importants de l'activité biologique des composés donnés sont ses propriétés physico-chimiques, sa structure chimique, l'arrangement stérique de ses atomes et la présence des parties bioactives dans sa structure (Betina ,1989).

Biochimiquement, les modes d'action des substances antimicrobiennes peuvent être divisés en quatre catégories (Riley etNorred, 1994) :

- L'interaction avec l'ADN.
- L'inhibition des différentes étapes de la synthèse de protéines ;
- Les effets sur les membranes cytoplasmiques ;
- L'effet sur le métabolisme énergétique.

2.4.2- Mécanismes d'action des substances antifongiques

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques), dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux. Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse.

Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (Bastide *et al.*, 1986). Les différents modes d'action sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Classification des antifongiques selon la cible (Geursenet *al.*, 2008)

structure	Mode d'action	Exemple
Polyènes	Rupture de la membrane	/
Azolés	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Imidazoles, ketonazole, Triazoles, fluconazoles, Itraconazole
Allylamines	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Terbinafine, butenafine
Pyradone	Rupture de la membrane et de la paroi	Ciclipiroxolamine
Morpholine	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol	Amorolfine
Pyrimidine Fluorée	Inhibition de la synthèse de Thymidylate	Flucytosine
Echinocandine	Inhibition de la synthèse du glucane	Caspofungine, Anidulafungine
Autres	Anti-mitotique, rupture du fuseau cellulaire	Griséofulvine

2.5 – Antagonisme dans le sol

Le terme antagonisme est souvent pris dans un sens très large, notamment dans les ouvrages traitant de lutte biologique. Nous utilisons ici dans un sens beaucoup plus restreint, pour désigner la situation où, un organisme exerce un effet inhibiteur sur un autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer. L'antagonisme présente donc une étape bien définie entre l'amensalisme (situation - 0) et la compétition (situation où les deux partenaires sont en difficulté) (Davet, 1996). Beaucoup d'antagonistes existent certainement dans la nature et exercent un contrôle biologique plus ou moins efficace sur les pathogènes des plantes. L'homme a toujours essayé d'augmenter l'efficacité des antagonistes à travers l'introduction de nouvelles grandes populations de ces microorganismes au champ où elle n'existe pas, ou à travers la stimulation de leur croissance en apportant des amendements au sol. Dans les deux cas, le résultat est un accroissement des activités inhibitrices des antagonistes contre les pathogènes. Bien que certains cas de lutte biologique efficace aient été enregistrés, le potentiel d'un contrôle éventuel des maladies avec cette méthode reste actuellement limité car, contrairement au laboratoire et sous serre, les résultats au champ ne sont pas d'habitude d'un succès particulier (Nasraoui, 2006).

Il existe dans le sol de nombreux micro-organismes capables de lutter contre les bio-agresseurs à l'origine des maladies des végétaux, ils appartiennent à divers groupes de bactéries symbiotique mais aussi à des champignons endomycorhizogènes et champignons antagonistes (France, 2005).

Parmi les champignons antagonistes les plus communs, il y a des espèces de *Trichoderma* et *Gliocladium*, particulièrement *T.harzianum* et *G.virens*, qui sont efficaces contre plusieurs pathogènes comme des espèces de *Phytophthora*, *Alternaria*, *Fusarium*. (Dommergues et Mangenot, 1970).

3. Matériel et méthodes

3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'étude de la production de substances bioactives par *Aspergillus repens*, sur milieu à base d'extrait de figues de barbaries (*Opuntia ficus-indica*), récoltées à partir de la région de Hamma Bouziane, Constantine. Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université frèresMentouri.

3.1- Réactivation de la souche

La souche d'*Aspergillus repens* utilisée dans ce travail, est fournie par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Cette souche a été isolée à partir d'un sol rhizosphérique de la région d'Ain M'lila (figure 6) et identifiée au niveau du même laboratoire.



Figure6:Lieu d'isolement d'*A. repens* ;rhizosphère de la région d'Ain M'lila.

La réactivation d'*Aspergillus repens* est effectuée sur milieu Sabouraud (annexe 1) à partir d'un tube de stockage, contenant la gélose Sabouraud inclinée et conservé à +4°C. Le pH du milieu de réactivation est amené à 6 et l'incubation est réalisée à 28°C pendant 6 jours. Cette étape a nécessité des repiquages successifs pour arriver à l'aspect et au développement habituel de cette souche.

3.2- Etude morphologique de la souche

L'étude morphologique d'*Aspergillus repens* est faite sur des cultures pures. Elle repose sur l'observation macroscopique en déterminant les critères morphologiques apparents de la colonie d'une part, et sur l'étude microscopique en observant le mycélium, les fructifications et d'autres critères d'autre part.

3.2.1- Etude macroscopique

L'observation de la moisissure est réalisée sur la face et le revers de la boîte, en se basant sur la détermination de l'aspect macroscopique des colonies observé directement sur la gélose. Il s'agit de la détermination de la forme, la taille, la couleur, le contour et la texture de la souche (Botton *et al.*, 1990).

3.2.2- Etude microscopique

Elle permet de révéler la présence du thalle, sa nature ; septé ou non septé, la nature de la reproduction, sexuée ou végétative, ainsi que les caractéristiques des fructifications des conidiofores et des spores (Cahagnier et Ricard-Molard, 1998). Ces critères sont mis en évidence par l'observation directe du mycélium avec le lactophénol bleu coton (annexe 1).

Cette technique consiste à déposer une goutte de lactophénol bleu coton sur une lame propre, puis un petit fragment du mycélium d'une colonie âgée de 8 jours est dissocié avec la goutte du colorant. La préparation est chauffée légèrement par un passage rapide sur la flamme du bec Bunsen en évitant le séchage complet du colorant. Enfin, cette préparation est recouverte avec une lamelle en empêchant la formation des bulles. L'observation est réalisée sous microscope optique à différents grossissements (10X – 100X) (Botton *et al.*, 1990).

3.3- Etude du développement d'*Aspergillus repens* sur différents milieux

L'étude de développement de la souche en question, est effectuée sur trois milieux différents : à savoir, Sabouraud, CYA et le milieu à base d'extrait de figues de barbarie (annexe 1) et ce, afin de déterminer le milieu le plus adéquat à son développement et d'en étudier son aspect cultural. Les figues de barbarie utilisées dans ce travail, sont récoltées à partir des figuiers de barbarie du genre *Opuntia ficus-indica*, de la région de Hamma Bouziane, Constantine (figure 7). La méthode de préparation du milieu à base d'extrait de figues de barbarie est développée en détail ci-après (section: préparation du milieu de fermentation).

L'ensemencement de la souche sur les trois milieux précédents, est réalisé par la méthode de la pique centrale en prélevant une bouture mycélienne et en la déposant au centre de la gélose (Botton *et al.*, 1990).



Figure 7 : Figuiers de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) de la région de Hamma Bouziane, Constantine.

Cette étude est réalisée dans les mêmes conditions pour les trois milieux, à savoir :

- pH avoisinant de 6 ;
- Température d'incubation : 28°C ;
- Durée d'incubation : 08 jours.

3.4- Etude de l'activité antimicrobienne d'*Aspergillus repens* (test d'antagonisme)

Ce test a pour objectif de rechercher l'activité antifongique et antibactérienne éventuelle d'*Aspergillus repens*, et ce, par la sécrétion de substances actives.

Les microorganismes test utilisés dans ce travail, sont fournis par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), il s'agit d'une levure ; *Candida tropicalis*, d'une moisissure ; *Penicillium sp.* , d'une bactérie Gram négatif ; *Escherichia coli*, et d'une bactérie Gram positif ; *Bacillus sp.* (annexe2).

3.4.1- Réactivation des souches test

La réactivation des souches fongiques et bactériennes est faite sur les milieux SAB et GN (annexe 2) respectivement. L'ensemencement des souches bactériennes et levuriennes est effectué par stries, tandis que la méthode d'ensemencement par pique centrale, est appliquée pour la moisissure et ce, afin de déterminer leurs aspects macroscopiques.

D'un autre côté, une inoculation, des bactéries et levure, sur bouillon a été faite pour le besoin des tests d'antagonisme. L'incubation est effectuée à 28°C pour *Candida tropicalis*, *Penicillium sp.* , et *Bacillus sp.* tandis que pour *Escherichia coli*, la température d'incubation est fixée à 37°C.

3.4.2- Test d'antagonisme

La technique utilisée pour la détermination de l'effet antagoniste d'*Aspergillus repens* est celle de la diffusion sur gélose.

Pour le test antibactérien et antilevurien, la méthode consiste à déposer 0.1ml de suspension de chaque souche ; bactéries et levure préparée comme indiqué précédemment, et à l'étaler sur la surface d'une boîte de Pétri contenant successivement les géloses Muller Hinton et Sabouraud. Après séchage des surfaces (environ 5 minutes), des disques sont prélevés à l'aide d'un perforateur stérile, à partir de la boîte contenant la souche d'*Aspergillus repens* pure, ces disques sont, ensuite, déposés de manière renversée soigneusement au centre de la boîte.

Les résultats sont observés après incubation des boîtes à 28°C pour *C. tropicalis* et *Bacillus sp.* et à 37°C pour *E. coli* pendant 24 à 48 heures. Chaque test est réalisé deux fois dans les mêmes conditions pour confirmer les résultats. L'inhibition, *in vitro*, du développement des microorganismes test, se traduit par la formation d'une zone de lyse autour de l'agent antagoniste. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre près (Prescott *et al.*, 2007).

Cependant, le test d'antagonisme effectué vis-à-vis de *Penicillium sp.* consiste à placer, dans la même boîte de Pétri contenant la gélose SAB, deux pastilles gélosées (6 mm de diamètre), l'une portant l'antagoniste (*A. repens*) et l'autre le *Penicillium sp.*. Les deux pastilles sont placées suivant un axe diamétral à 3 cm et à équidistance du centre de la boîte; les repiquages sont effectués en même temps. L'incubation est réalisée à 28 °C pendant six jours (Hibaret *al.*, 2005). L'évaluation de l'inhibition exercée par l'agent antagoniste est estimée par le calcul du pourcentage d'inhibition de la croissance mycélienne du *Penicillium sp.* (Hmouniet *al.*, 1996) selon la formule suivante:

$$I (\%) = (1 - C_n/C_o) \times 100$$

Où :

C_n : est le diamètre moyen des colonies en présence de l'antagoniste ;

C_o : est le diamètre moyen des colonies témoins.

Le témoin représente un repiquage du pathogène au centre de la boîte.

3.5- Production de substances bioactives par *Aspergillus repens*

La production de substances bioactives a été réalisée par fermentation sur deux milieux liquides, le premier est un milieu synthétique, décrit dans la littérature comme milieu de fermentation pour le genre *Aspergillus*, Czapek Yeast Extract (CYL) (annexe 1), tandis que le deuxième est un milieu naturel, il s'agit du jus des figues de barbarie, dans le but d'évaluer la sécrétion des substances actives par la souche sur ce milieu naturel et d'en comparer les métabolites produits sur ces deux milieux.

3.5.1-Préparation du milieu de fermentation

La préparation du milieu de fermentation à base d'extrait de figues de barbarie, a été réalisée suivant la méthode de Hassanet *al.*, (1994) avec légères modifications. Les fruits de figue de barbarie collectés ont été, d'abord, triés et trincés à plusieurs reprises avec de l'eau de robinet, afin d'éliminer au maximum les épines retrouvées à la surface de l'écorce. Ensuite, ces fruits ont été épluchés et bien séparés de l'écorce (figure 8), pour être enfin, mixés à l'aide d'un mixeur. Le jus a été dilué à 25% de sa concentration initiale avec de l'eau distillée. Le pH du milieu est apporté à 6. Cependant, la préparation du milieu CYL a été effectuée de la manière conventionnelle suivie pour la préparation des milieux de cultures synthétiques dans de l'eau distillée (annexe 1) (figure 9). Les deux milieux de fermentation sont autoclavés à une température et une pression de 120°C et 1 Bar respectivement et ce, pendant 15 minutes.



Figure 8: Etapes de préparation du jus de figues de barbarie (*Opuntia ficus-indica*).



Figure 9: Milieux de fermentation ;(A): Jus de figes de barbarie ;(B): Milieu CYL.

3.5.2- Méthode de culture

La méthode consiste à inoculer deux erlenmeyers de 500ml, (le premier contenant 200ml du milieu CYL et le deuxième 200ml du milieu à base d'extrait de figes de barbarie), par 6 disques prélevés d'une culture pure âgée de 7 jours d'*A. repens* et ce, à l'aide d'un perforateur stérile. Les erlenmeyer ont subi une incubation statique à 28°C pendant 13 jours avec agitation manuelle chaque 24 heures pour renforcer l'inoculum (Slacket *al.*, 2009).

3.6- Extraction, séparation et purification des métabolites secondaires d'*Aspergillus repens*

Après 13 jours d'incubation des deux erlenmeyer (l'un contenant le milieu CYL et l'autre le milieu à base de jus de figes de barbarie), un protocole d'extraction est effectué suivant les méthodes préconisées par la législation communautaire européenne et la méthode de richard et Gallagher, (1979).

3.6.1- Filtration

Les deux cultures sont filtrées à l'aide du papier Wattman N°1, et ce, afin de séparer la biomasse du filtrat, qui sera utilisé, par la suite, pour la recherche des métabolites secondaires.

3.6.2- Extraction

Un volume de 1ml d'HCL est mélangé à 100 ml du filtrat, ce qui acidifie le milieu et ce, afin d'améliorer la décantation. Ensuite, 50 ml de chloroforme sont ajoutés délicatement au mélange précédent. L'homogénéisation de la préparation est obtenue par une agitation magnétique pendant 30 minutes.

Le mélange est, par la suite, transvasé dans une ampoule à décanter et la phase aqueuse est séparée de la phase chloroformique (supposée contenir les substances actives) après une vingtaine de minutes. L'opération est répétée deux fois pour s'assurer de la récupération de tous les métabolites.

La phase chloroformique est récupérée dans un ballon à col rodé pour être ensuite, concentrée à l'aide d'un Rotavapeur à 50°C sous une légère rotation (150 rpm). L'extrait est, enfin, repris dans un volume de 1ml de méthanol.

3.6.3- Séparation

La séparation des métabolites est effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM) sur une plaque de type Merck et de dimensions 20/20cm, revêtue par gel de silice (G-60) qui constitue la phase stationnaire de 0.25 mm d'épaisseur. Par ailleurs, l'éluant (phase mobile) est composé de chloroforme et de méthanol (96/4 V/V).

La plaque est divisée en deux parties: une pour le dépôt de l'extrait méthanolique de la culture CYL et l'autre pour l'extrait provenant de la culture sur milieu à base d'extrait de figes de barbarie. En effet, 10µl des deux extraits sont déposés en chacun des deux points, préalablement marqués à 1 cm du bord inférieur et espacés horizontalement de 2cm l'un de l'autre. La révélation est réalisée par la lumière UV (254 nm). Les rapports frontaux (R_f) ou vitesses de déplacements des molécules séparées, sont déterminés par la relation suivante:

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le constituant}}{\text{Distance parcourue par l'éluant}} \quad (\text{sans unité})$$

4. Résultats et Discussion

4- Résultats et Discussion

Ce travail repose sur la production de métabolites bioactifs par *Aspergillus repens*, sur milieu à base d'extrait de figes de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) collectés à partir de la région de Hamma Bouziane.

4.1- Réactivation d'*Aspergillus repens*

Après 7 jours d'incubation à 28°C, la souche a montré un bon développement sur milieu Sabouraud (figure 10, tableau 3). Cette constatation a été obtenue après plusieurs repiquages successifs.

4.2- Etude morphologique de la souche

4.2.1- Etude macroscopique

L'étude des caractères macroscopiques d'*A. repens* sur gélose SAB, a montré que la colonie se présente sous une forme irrégulière avec un centre élevé, de couleur jaune, d'un contour blanc et d'une texture duveteuse. Le revers est en général incolore à jaune, il peut brunir ou rougir avec l'âge (figure 10).

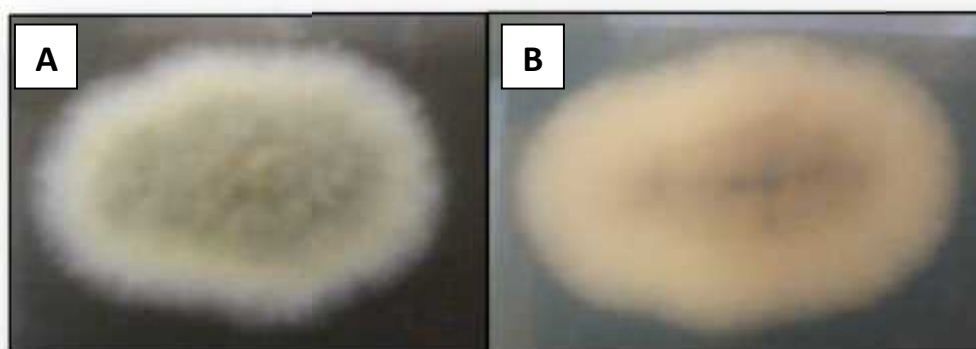


Figure 10: Aspect macroscopique d'*A. repens* sur gélose Sabouraud ; (A) : face de la colonie ; (B) : revers de la colonie.

4.2.2- Etude microscopique

L'étude des caractères microscopiques d'*Aspergillus repens* a révélé que le talle hyalin est sépté, la tête conidienne est bisériée, la forme de la tête du conidiophore est dressée, les spores lisses et globuleuses (figure 11).

Ces résultats corroborent ceux de Botton *et al.*, (1990), qui identifie le genre *Aspergillus* par le thalle à mycélium sépté, portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules par une tête conidiène unisériée ou bisériée et par des spores pouvant être unicellulaires, globuleuses, hyalines et lisses.

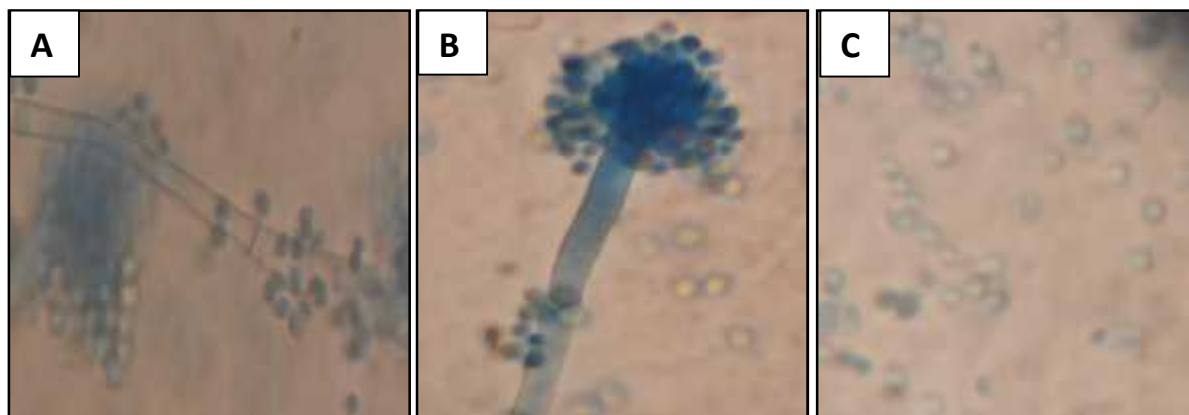


Figure 11 : Aspect microscopique d'*Aspergillus repens* à grossissement X100 : (A) mycélium sépté ; (B) Tête conidiène dressée, unisériée ; (C) : spores lisses.

4.3- Etude du développement d'*Aspergillus repens* sur différents milieux

La culture d'*Aspergillus repens* sur différents milieux de culture en l'occurrence, Sabouraud, CYA et une gélose à base d'extrait de figues de barbarie, a pour but de suivre le développement de la souche sur ces milieux et d'en déduire le milieu le plus adéquat à sa croissance.

Après incubation de 8 jours à 28°C, la souche a montré un très bon développement sur la gélose à base d'extrait de figues de barbarie, notant une croissance plus rapide en comparaison aux deux autres milieux. Des études menées par Hassan *et al.* (1994) concernant la production de *Cryptococcus curvatus* sur milieu à base de figues de barbarie du genre *Opuntia*, a montré un bon développement de cette levure sur le milieu en question. Par ailleurs, des différences ont été constatées dans l'aspect macroscopique de la colonie pour chaque milieu (figure 12, tableau 3).



Figure 12: Développement d'*Aspergillus repens* sur différents milieux ; (A) : sur gélose à base d'extrait de figues de barbarie; (B): sur gélose Sabouraud; (C): sur gélose CYA.

Tableau 4 : Aspect morphologique d'*Aspergillus repens* sur différents milieux.

Milieu de culture	Couleur / face	Couleur / revers
Gélose CYA	Vertfoncé avec un contour blanc	Marron
Gélose Sabouraud	Verte jaunâtre, avec un contour blanc	Brune, marron
Gélose à base d'extrait de figues de barbarie	Beige claire avec un centre foncé et un contour blanc	Marron claire

Ces résultats correspondent à ceux établis par Biofarma, (2002), qui a montré que parmi les caractères cultureux du genre *Aspergillus*, la température idéale pour le développement est entre 22°C à 28°C; en conséquent, la couleur des colonies se montre par une teinte caractéristique, elle peut être brune, verte, jaune ou noir, selon les espèces ; le revers est en général incolore à jaune, il peut brunir ou rougir avec l'âge.

4.4-Etude de l'activité antimicrobienne d'*Aspergillus repens* (test d'antagonisme)

4.4.1- Réactivation des microorganismes test

L'activité antimicrobienne d'*Aspergillus repens* a été testée sur différents microorganismes à savoir, une levure (*Candida tropicalis*), une moisissure (*Penicillium sp.*), une bactérie Gram positif (*Bacillus sp.*) et enfin, une bactérie Gram négatif (*Escherichia coli*). Les tests

d'antagonismes réalisés pour cet objectif, ont été effectués nécessairement sur des cultures jeunes (figure 13).

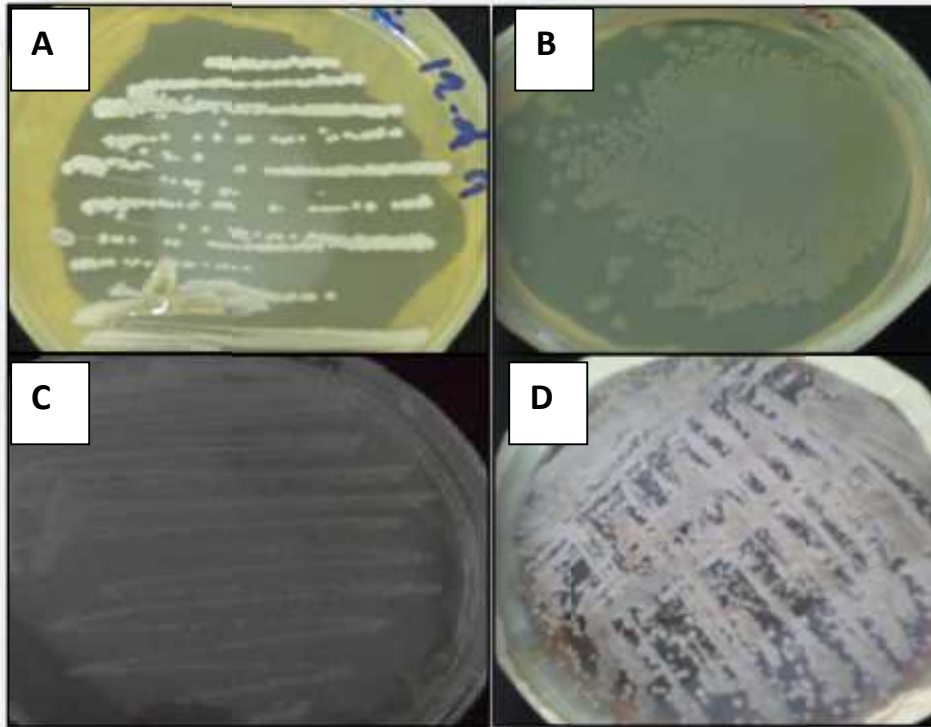


Figure 13 : Aspects macroscopiques des microorganismes test sur gélose ; (A) : *Candida tropicalis* ; (B) : *Bacillus* sp. ; (C) : *Escherichia coli* ; (D) : *Penicillium* sp.

Par ailleurs, l'observation microscopique des microorganismes test réactivés, a confirmé les caractères fournis par le laboratoire fournisseur.

4.4.2-Test d'antagonisme

Le test d'antagonisme, effectué par la méthode de diffusion sur gélose, a montré la capacité d'*Aspergillus repens* à produire des substances biologiques actives à effet antimicrobien sur la plupart des microorganismes test (figure 14), avec des différences notées dans le diamètre de la zone de lyse (tableau 4). En effet, le groupe d'*Aspergillus* est connu pour sa capacité à produire une panoplie de métabolites secondaires à effet antimicrobien et particulièrement antibactérien (Botton *et al.*, 1990). Cependant, peu d'études se sont consacrées à la caractérisation de l'effet antifongique par la production de métabolites secondaires du groupe *Eurotium* (Gao *et al.*, 2012).

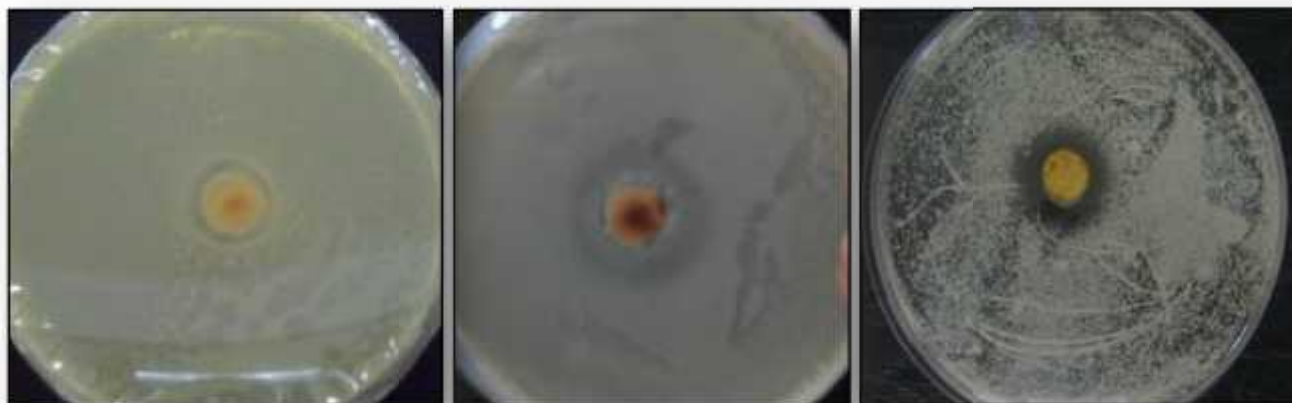


Figure 14 : Inhibition, *In vitro*, du développement des microorganismes test par *A. repens*; (A) : inhibition du développement d’*E.coli* ; (B) : inhibition du développement de *Bacillus sp.* ; (C) : inhibition du développement de *C. tropicalis*.

Tableau 5 : Effet d’*Aspergillus repens* sur les microorganismes test.

Agent antagoniste	Microorganismes test			
	<i>E. coli</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Penicillium sp.</i>
<i>Aspergillus repens</i>	+ (3mm)	++ (9mm)	++ (8mm)	- (0mm)

4.5-Production de substances bioactives par *Aspergillus repens*

Après incubation de la souche pendant 13 jours à 28°C sur les deux milieux (Milieu à base d’extrait de figues de barbarie et le milieu CYL), un développement d’*A. repens* a été observé sur les deux milieux: cependant, le développement est beaucoup plus important sur le milieu à base d’extrait de figues de barbarie que celui observé sur le milieu CYL (figure 15). Cette constatation peut être expliquée par la richesse du fruit utilisé par les éléments nutritifs, notamment, les sucres, estimés à 91(g/l) (Hassan *et al.*, 1994). De plus, l’étude effectuée par El Kossori *et al.* (1998), concernant l’analyse des principaux constituants des graines des figues de Barbarie, a montré une quantité importante de polysaccharides, cellulose et hémicelluloses. Les graines d’*Opuntia ficus indica* contiennent une réserve de protéines ayant une masse moléculaire de 6,5 kDa (Uchoa *et al.*, 1998). En complément, les résultats obtenus par Hassan et ses collaborateurs, (1994) ont montré que la culture de la levure *Cryptococcus curvatus* sur un milieu liquide, à base de jus de figues de barbarie (genre épineux, *Opuntia*), dilué à 25% a aboutit, à la production d’une biomasse de 11 g/l après une durée

d'incubation de 35 heures. Cependant, la littérature ne fournit pas assez d'informations concernant l'utilisation des figues de barbaries comme substrat de fermentation, pour la production de métabolites secondaires par les moisissures.



Figure 15: Développement d'*Aspergillus repens* sur : (A) milieu à base d'extrait de figues de barbarie ; (B) milieu CYL.

4.5- Extraction, séparation et purification des métabolites d'*Aspergillus repens*

4.5.1-Filtration

La figure 16 montre l'opération de filtration séparant la biomasse du filtrat.



Figure 16 : Filtration des cultures sur papier Wattman Grade1.

4.5.2- Extraction

Le mélange (chloroforme, HCL, filtrat) est bien agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 30 min. la séparation de la phase aqueuse de celle chloroformique est obtenue après avoir laissé le tout se décanter dans une ampoule à décantation (figure 17), deux phase sont obtenues et nettement séparées ; une aqueuse en haut de l'ampoule et l'autre chloroformique en dessous de celle-ci.

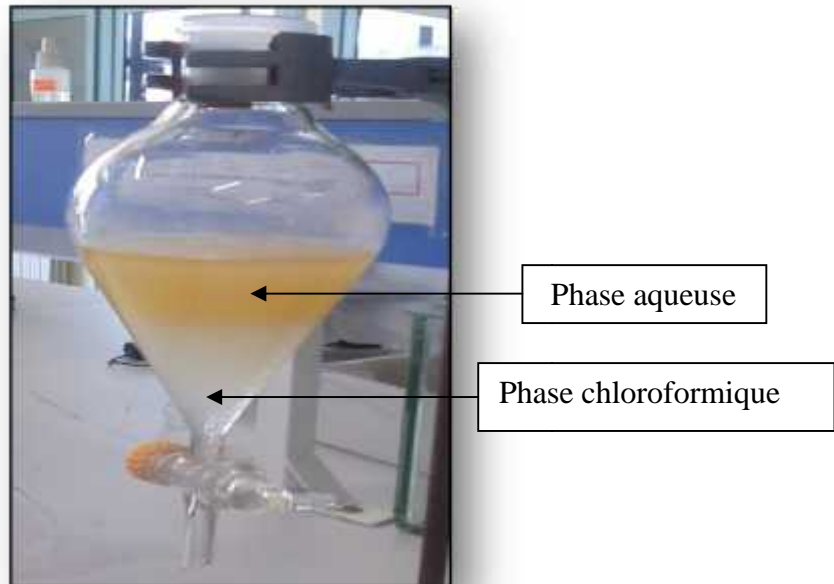


Figure 17: Décantation dans une ampoule à décanter du filtrat obtenu à partir du milieu à base d'extrait de figues de barbarie.

La phase chloroformique supposée contenir les substances actives est concentrée par évaporation au Rotavapeur à 50°C avec une légère rotation (150 rpm) (figure 18), ceci a permis d'obtenir l'extrait recherché qui se représente sous forme d'un film de couleur foncée sur la paroi du petit récipient à col rodé. Par ailleurs, une différence de couleur entre les deux extraits a été constatée, en effet, l'extrait provenant de la culture à base de figues de barbarie, s'est présenté avec une couleur nettement foncée par rapport à l'extrait provenant de la culture sur milieu CYL (figure 19).



Figure 18 Concentration de l'extrait chloroformique.

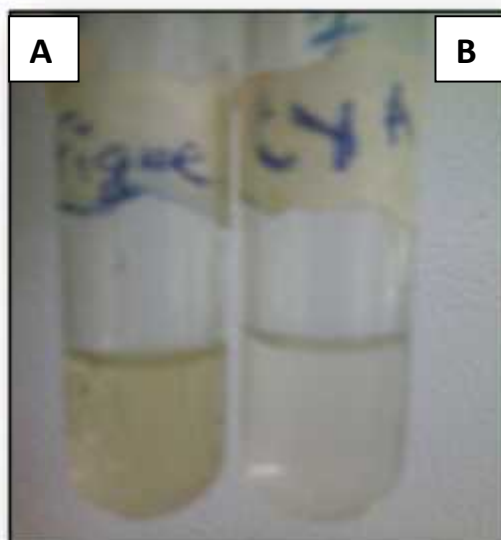


Figure 19 Différents extraits obtenus après concentration ; **(A)** : Extrait issu d'une culture sur milieu à base d'extrait de figues de barbarie ; **(B)** : Extrait obtenu d'une culture sur milieu CYL.

4.5.3- Séparation par chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince a permis de séparer les différents métabolites sécrétés par *Aspergillus repens* (figure 20). La CCM est appliquée sur deux extraits différents ; un issu d'une culture de CYL et l'autre d'une culture à base d'extrait de figues de barbarie.

La révélation par la lumière UV (254 nm) a montré que l'extrait provenant du milieu CYL contient 3 types de molécules dont les R_f sont estimés à: 0.14, 0.26 et 0.97 (2 extraits du même échantillon). Par ailleurs, l'extrait provenant de milieu à base d'extrait de figues de

barbarie a subi une séparation donnant aussi trois types de molécules dont les R_f sont : 0.15, 0.13 et 0.96 cependant la concentration de ces dernières molécules est très importante.

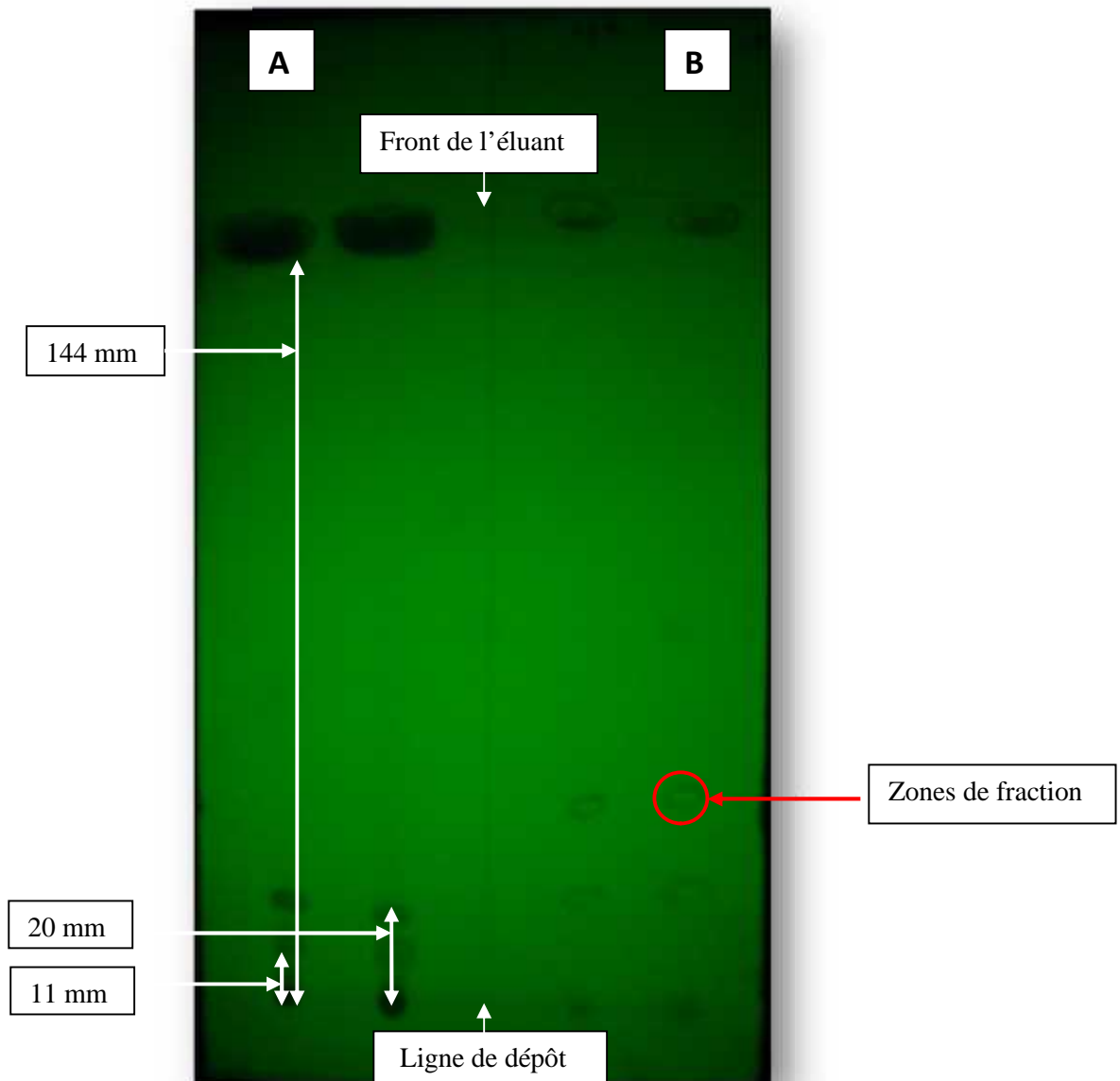


Figure 20 Chromatographie sur couche mince présentant des spots des substances actives produites par *Aspergillus repens* dans différents milieux : **(A)** : Dépôt de l'extrait issu de la culture à base d'extrait de figes de barbarie ; **(B)** : Dépôt de l'extrait issu de la culture CYL.

Sur un autre volet, cette étude a permis d'établir une comparaison très pointue et importante quant au comportement de la souche dans les deux milieux de production. En effet, la corrélation entre la biomasse et la quantité des substances secrétées est un rapport proportionnel. La souche *Aspergillus repens*, donne une biomasse importante sur le milieu à base d'extrait de figes de barbarie comparativement à sa croissance sur le milieu CYL, par

conséquent, la quantité de substances produites était importante elle aussi et vis-versa. La littérature consultée, n'a pas fourni d'informations précises et convaincantes par rapport à ce point. Cependant, notre résultat est significatif quant à la possibilité d'utilisation des figes de barbaries comme substrat de fermentation, d'un coté, pour les résultats prometteurs obtenus dans cette étude et d'un autre coté, pour l'abondance des figes de barbaries dans la pluparts des régions Algériennes et du fait qu'ils sont un produit de valeurs nutritives importantes et très bon marché vu, son coût faible comparativement aux autres fruits.

À la fin de cette étude, nous considérons que ce résultat est premium et qui nécessite un approfondissement pour arriver au bout de cette recherche.

5. Conclusion et perspectives

5- Conclusion et perspectives

Dans ce travail, la capacité de la souche *Aspergillus repens* à produire des molécules bioactives a été testée sur un milieu naturel, à base d'extrait de figes de barbarie et sur un milieu synthétique, CYL.

À cette fin, des tests d'antagonismes et de production de substances antimicrobiennes sur milieu à base d'extrait de figes de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) ont été étudiés.

L'identification morphologique de la souche *A. repens* a confirmé les caractères fournis par le laboratoire fournisseur.

Par ailleurs, l'étude de la capacité d'*Aspergillus repens* à se développer sur différentes géloses, en particulier, celle à base d'extrait de figes de barbarie, a montré un très bon développement sur cette gélose, notant une croissance importante et plus rapide en comparaison aux autres milieux utilisés à savoir ; Sabouraud et CYA.

L'étude de l'activité antimicrobienne de cette souche sur différents microorganismes test, a révélé son pouvoir à développer un effet antimicrobien variable mais effectif sur ; *Candida tropicalis*, *Bacillus sp.* et *Escherichia coli*.

La fermentation sur milieu synthétique CYL et sur milieu naturel, à base de l'extrait de figes de barbarie, a permis d'évaluer la croissance et d'en détecter les substances actives d'*Aspergillus repens*, permettant de conclure que la souche se développe nettement mieux sur milieu à base d'extrait de figes de barbarie en comparaison au milieu CYL.

Les substances actives sont recherchées dans le filtrat par extraction par solvants organiques et leur séparation est obtenue par la technique de la chromatographie sur couche mince.

La révélation par la lumière UV (254 nm) a montré que l'extrait provenant du milieu CYL contient trois types de molécules dont les R_f sont estimés à : 0.14, 0.26 et 0.97. Par ailleurs, l'extrait provenant du milieu à base d'extrait de figes de barbarie a subi une séparation donnant aussi trois types de molécules dont les R_f sont égales à : 0.15, 0.13 et 0.96 cependant, la concentration de ces dernières molécules était importante.

Au terme de cette étude nous nous fixons quelques points en perspectives :

- Optimisation de la production des molécules bioactives produites par *Aspergillus repens* sur le milieu naturel à base de l'extrait des figues de barbarie de la région de Constantine ;
- Valorisation des déchets des figues de barbaries, tels que les écorces et les graines ;
- Identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises (HPLC, CPG, MS ...etc).
- Production des substances bioactives à l'échelle industrielle (*Scall-up*).

6-Abstract

6-Abstract

The objective of this work is based on the production of antimicrobial substances by the strain *Aspergillus repens* on medium, extract of prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), harvested from Hama Bouziane region, Constantine. The morphological study of the producing strain, *A. repens* (provided by the LaMyBAM) has confirmed the characters provided by the laboratory supplier. In addition, the study of the development of *Aspergillus repens* on different culture media namely; Sabouraud, CYA, and the prickly pear extract agar, showed that its growth is favored on the medium of prickly pears, due to the significant development of colonies observed on this Agar in comparison to the SAB and CYA environments.

Furthermore, the study of the antimicrobial activity of *Aspergillus repens* on different test organisms, revealed its antimicrobial power on *Candida tropicalis*, *Escherichia coli* and *Bacillus sp.*

On another aspect, fermentation on synthetic medium CYL and the prickly pear extract-based medium, allowed to assess growth and detect the active substances of *Aspergillus repens* to conclude, as the strain develop significantly better on the prickly pear extract medium. Indeed, the separation of the active substances is obtained by the technique of thin layer chromatography, which showed after the revelation by light UV (254 nm) that the extract from the CYL medium contains three types of molecules which Rf are estimated at 0.14, 0.26 and 0.97. Furthermore, the extract medium extract of prickly pear suffered a separation giving also three types of molecules whose Rf are estimated at 0.15, 0.13 and 0.96, however, the concentrations were important. It is worth noting that when the strain is grown on the prickly pear juice-based medium, it arrives at a perfect development, while producing a high concentration of active biological substances.

Keywords: *Aspergillus repens*, prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), antimicrobial activity, bioactive substances, fermentation, CCM

مطبخ 7

7-ملخص

يركز هذا العمل على إنتاج المواد المضادة للميكروبات وذلك باستخدام عينة فطرية *Aspergillus repens* مزروعة على وسط يحتوي على مستخلص التين الشوكي مقطوف من منطقة حامة بوزيان قسنطينة.

المورفولوجية للسلالة أكدت أنها تنتمي الي نوع *Aspergillus repens* (LaMyBAM).

بالإضافة إلى ذلك، دراسة النمو لهذه السلالة على ثلاثة أوساط صلبة مختلفة (Sab CYA، جيلوز مستخلص التين) بينت أنها نمت بشكل أكبر في وسط التين الشوكي مقارنة بالأوساط الأخرى.

من جهة أخرى، إختبارنشاط التضاد للجراثيم لهذه السلالة على بعض الكائنات الحية الدقيقة كشفت فعاليتها على *Condida tropicalis*، *Escherichia coli*، *Bacillus sp*.

من خلال عملية التخمير التي أجريت CYL و آخر طبيعي مستخلص من التين الشوكي لدراسة التطور و الكشف عن المواد الأيضية الفعالة استخلصنا أن تطور هذه السلالة كان أفضل في وسط مستخلص التين الشوكي.

تم فصل المواد الأيضية الفعالة المتحصل عليها باستعمال تقنية كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة و بعد تعريضها للأشعة فوق بنفسجية (254nm) UV أعطت ثلاث أنواع من الجزيئات من المستخلص CYL R_f : 0.14 0.26 : 0.97 من جهة أخرى أعطت ثلاث أنواع من الجزيئات من مستخلص التين الشوكي ذات R_f : 0.13 0.15 0.96 : بتركيز معتبرة.

من خلال هذه الدراسة لاحظنا أن زراعة هذا الفطر *Aspergillus repens* على وسط مكون من مستخلص التين الشوكي يعطي نموا جيدا للفطر و ينتج موادا أیضية فعالة بتركيز كبيرة.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus repens* × التين الشوكي (*opuntia ficus indica*)، كروماتوغرافية الطبقة الرقيقة، المواد البيولوجية الفعالة، التخمير.

8- Références Bibliographiques

8- Références bibliographique

- 1- Abu-Seidah A.A. (2003). Secondary metabolites as co-markers in the taxonomy of *Aspergillus*. *Acta. Microbiologica. Polonica*.52: 15-23.
- 2- Alimi H., Hfaiedh N., Bouoni Z., Hfaiedh M., Sakly M., Zourgui L., Rhouma, K.B. (2010). Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis root extract in rats. *Phytomedicine*, 17, 1120-1126.
- 3- Araba A., Elaich A., Sarti B., Belbahri L., Boubkraoui A., Ait Hammou A., Zemmouri A et Sbaa H. (2000). Valorisation de figuier de Barbarie en élevage. *Transfert de Technologie en Agriculture*, 68, 1-4.
- 4- Arba, M. (2009). Le cactus *opuntia*, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc. *Culture, Itinéraire Technique et Productivité*, 4, 215-223.
- 5- Arotupin, D.J., Akinyosoye, F.A., Onifade, AK. (2008). Purification and characterization of pectinmethylesterase from *Aspergillus repens* isolated from cultivated soil. *African.J Biotechnol.* 7:1991-1998.
- 6- Bastide A., M. de Méo., M. Andriantsoa, M. Laget & G. Duménil., (1986). Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique *mircen J. 2* : 453-466.
- 7- Betina V. (1989) bioactive molecules, mycotoxins- chemical, biological and environmental aspects. Amsterdam. *Elsevier science publishers*, V9.
- 8- Biofarma.(2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale*. N°25 Mars.
- 9- Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy PH., Larpent, J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., VAYSSIER, Y., VEAU P.(1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, Paris : Masson., ISBN : 2-225-81987-4.
- 10- Cahagnier B., Richard-Molard D. (1998). Analyse mycologique in *Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, p 140-158
- 11- Chaouche, F. Z et Abdul Hussain M. S. (2008). Contribution à l'étude de l'*Opuntia* et perspectives d'amélioration, dans le milieu steppique. *Agricultura-Stiin si practic*, 1-2, 65-66.
- 12- Calvo A.M., Wilson R.A., Bok J. W and Keller N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.*N° 66, 447-459.

- 13- Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&.
- 14- Davet Pierre. (1996). Vie microbienne du sol et production végétale. [En ligne]. Paris ; INRA. [consulte le 10 mai 2011]. Disponible sur le web : <[http:// google livre.fr](http://google.livre.fr)>. ISBN : 2-73800648-5.
- 15- Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire*. (edn) Lavoisier. Paris. Mic 007. P 195-199.
- 16- Demain A., Aharowitz Y., Martin J.F.(1983) Metabolic control of secondary biosynthetic pathway. *Biotechnology serie*.
- 17- Dommergues Y., Mangenot F., (1970). Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie édit. Paris 796 pp.
- 18- Droming E. (2008). Microbiologie : baccillus creus. Medicales internationals. P 30, 51, 105.
- 19- El Kossori R.L., Villaume C., El Boustani E., Sauvaire Y., Méjean L., (1998). Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus-indica*sp.). Pl. Food Hum. Nutr. 52, 263–270.
- 20- Felice, M.S. (2004) Prickly pear cactus, *Opuntia* spp. - A spine-tingling tale. Weed Tech. 18:869-877.
- 21- Feugang J. M., Konarski P., Zou D., Stintzing, F- C., Zou C. (2006). Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. *Frontiers in Bioscience*, 11, 2574-2589.
- 22- Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blocker, H; Hofle, G. and Muller, R.(2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel Type of Modular polyketide synthase. *J Biol Chem* 277, 13082-13090.
- 23- [Gao J.](#), [Radwan M.M.](#), [León F.](#), [Wang X.](#), [Jacob M.R.](#), [Tekwani B.L.](#), [Khan S.I.](#), [Lupien S.](#), [Hill R.A.](#), [Dugan F.M.](#), [Cutler H.G](#) and [Cutler S.J.](#) (2012). Antimicrobial and antiprotozoal activities of secondary metabolites from the fungus *Eurotium repens*. *Med. Chem. Res.* 21: 3080–3086.
- 24- Geursen R., Heer P., Kirkness B., Loewenstein P., Mees S., Muschart J. M., Pickaert M. (2008). Mycoses.Des médicaments au service de l'humanité :1-3.

- 25- Gimeno I., Vila M. (2002) Recruitment of two *Opuntia* species invading abandoned olives groves. *Acta Oecologica* 24:239-246.
- 26- Gonzalez H., Resnik S.L and Vaamonde G. (1988). Influence of temperature on growth rate and lag phase of fungi isolated from Argentine corn. *Int. J. Food microbial.* 6: 179-183.
- 27- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaires*, (edn). Paris : dunod. KELLER, N-P and Woobok, J. Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi, (edn) Warfe. 2005.
- 28- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B., Pegler D.N. (1995). *Ainswrth and Bisby's Dictionary of fungi*. Eighth ed, 616pp. CAB International: Wallingford, Oxon.
- 29- Hamdi M. (1997). Prickly pear cladodes and fruits as a potential raw material for the bioindustries. *Bioprocess Biosyst Eng* 17, 387-391.
- 30- Hassan M., Blanc P.J., Pareilleux A., Goma G. Production of single-cell oil from pricklypear juice fermentation by *Cryptococcus curvatus* grown in batch culture. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Vol 10, 1994.
- 31- Hendey, K.H and Cole C.E. (1993). Areviws of mycotoxins in indoor air. *J.Toxical. Environ. Health.* 38 (2): 183- 198.
- 32- Hennequin C., Lavarde V. (1998). Infection à *Penicillium*. *Encycl. Med. Chir.* Elsevier. Paris. Heritage Series.
- 33- Hibar K., Daami-Remadi M., Khiaaareddine H., et El Mahjoub M. (2005). Effet inhibiteur *in vitro* et *in vivo* de *Trichoderma harzianum* sur *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici* *Biotechnol. Agron. Soc Environ.* 9 (3) 163-171.
- 34- Hmouni A., Hajlaoui M.R and Mlaiki M. (1996). Résistance de *Botrytis cinerea* aux benzimidazoles et aux dicarboximides dans les cultures abritées de tomate en Tunisie. *OEPP Bulletin* 26, 697–705.
- 35- Jae-Hyuk Y and Keller N.P.(2005) Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi . *Ann. Rev. Phytopathol.* 43: 437- 458.
- 36- Kelavkar U.P and Chhatpar H.S. (1993). Polyol concentrations in *Aspergillus repens* grown under salt stress. *World. J Microbiol. Biotechnol* 9. 579-682.
- 37- Kelavkar U., Pandya S and Chhatpar, H.S. (1993). Salt Stress and Respiration in *Aspergillus repens*. *Current. Microbiol.* 26 : 23-29.
- 38- Larpent, Jean- Paut. (1997) *Microbiologie alimentaire, technique de laboratoire*. Paris : Lavoisier, Technique & Documentation. ISBN : 2-7430-01550.

- 39- Loudyi D.W. (1995). Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc. *Options Méditerranéennes*, 13, 47- 62.
- 40- Mathiew R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- 41- Morin O., (1994), *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir.(Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
- 42- Mulas M. & Mulas G. (2004). Potentialités d'utilisation stratégique des plantes des genres *Atriplex* et *Opuntia* dans la lutte contre la désertification. Université des études de Sassari. Groupe de recherche sur la désertification. Short and Medium -Term Priority Environmental Action Program (SMAP), 112 p.
- 43- Nasraoui B.(2006). Les champignons parasites des plantes cultivées. Centre universitaire Tunis.450.
- 44- Oued Zenati., Dr. Kaddem Salah-Eddine. (1990). Les plantes médicinales en Algérie, 3^{ème} édition page : 73.
- 45- Perscott, L-M; Harley, J-P ; Klein, D-A.(2007). *microbiologie*. Bruxelles : de boeck, 2^{ème} édition .ISBN : 978-2-8041-4256-8.
- 46- Pitt J.I., (1988). Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor,London.
- 47- Podojil M., Sedmera P., Vokoc J., Betina V., Barathovx H., Durackova Z., Hoarcova K and Nemeč P. (1979). *Eurotium (Aspergillus) repens* Metabolites and Their Biological Activity. *Folia. Microbiol.* 23 : 438-443.
- 48- Raper K., Fennell D.J. (1995). The genus *Aspergillus*. Baltimore: Williams and Wilkins editors.
- 49- Richard J.L., Gallagher R.T. (1979). multiple toxin production by an isolate of *Aspergillus flavus*. *Mycopathologia*, V 67, 3. page: 161-163.
- 50- Rily R.T, Gallagher, W-P. (1996). Mechanisms of mycotoxicity. Berlin: *the mycota*, V16. Springer Verlage.
- 51- Roquebert M.F. (1998). Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification", in "Moisissures des aliments peu hydratés". Ed. Tec & Doc, 39-95.
- 52- Santé Canada.(2006). Les bacteries pathogènes d'origine hydrique : microorganismes préoccupants courants et émergents. Rocommandations pour la qualité de l'eau potable au (document technique). Canada. Disponible sur le web : <[http:// www.agrireseau.gc.ca/bovinsboucherie/documents/pathogenes-pathogenes-fra.pdf](http://www.agrireseau.gc.ca/bovinsboucherie/documents/pathogenes-pathogenes-fra.pdf)>

- 53- Scheinvar L. (1995). Taxonomy of utilized *opuntias*. In: Barbera G., Inglese P and E. Pimienta-Barrios (eds.). Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO.. Rome (Italy): 20-27.
- 54- Schweizer M. (1997). Docteur Nopal, le médecin du bon dieu Ed ABP, Paris.
- 55- Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert, J., Lepoivre PH., Steyn P. S.(1980) The biosynthesis of mycotoxins. Acad. Press. N. Y. and London.
- 56- Simon P., Meunier R. (1970). *Microbiologie industrielle et génie biochimique*. Paris : Masson et C^{ie} éditeur,.
- 57- Smetanina O.F., Kalinovskii A.I., Khudyakova Yu V., Slinkina N.N., Pivkin M.V and Kuznetsova T.A. (2007). Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. Chemistry of Natural compounds. 43: 395-398.
- 58- Su Y., Zhao H. (2003). Soil properties and plant species in an age sequence of *Caragana microphylla* plantations in the Horqin Sandy land, North China. *Ecological Engineering*, 20, 223-235.
- 59- Steyn P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins. Academic Press, New York. pp. 1-4.
- 60- Tortora J., Funk B.F and Case Ch.I. (2003). *Introduction à la microbiologie* , (edn) Canada.
- 61- Turner W.B and Aldridge D.C. (1983). Fungal metabolites II; *Academic Press, Inc*: London, New York. ISBN: 2-7613-1345-3.
- 62- Vierling E. (2008). Aliments et boissons. *Filières et produits*. 3^{ème} édition. Pays-Bas. CRDP. ISBN: 978-2-86617-528-3.
- 63- Uchoa A.E., Souza P.A. S., Zarate R. M. L., Gomes-Filho E. and Campos F. A. P. (1998). Isolation and characterization of a reserve protein From the seeds of *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae). *Braz. J. Med. Biol.Res.*, **31**, 757-761.
- 64- Wallace R. S., Dickie S.L. (1997). Systematic implications of chloroplast DNA sequences variation in the Opuntioideae. In D. R. Hunt and N. P. Taylor [eds.], Studies in the Opuntioideae (Cactaceae), David Hunt, The Manse, Chapel Lane, Milborne Port Sherborne, UK: 9–24.
- 65- Yiannikouris A., Jouany J.P. (2002). Mycotoxin in feed and their fate in animals. *Anim. Res*, N°:51, 2002.page: 81-99.

9-ANNEXES

9- Annexes

Annexe 01 : Composition des milieux de culture et des colorants

➤ Gélose Sabouraud (Dellaras, 2007)

Pour 1 litre :

Peptone de viande (bovin ou porcin)	3 g.
Peptone de caséine (bovin)	3 g.
Peptone de soja	3 g.
Extrait de levure	2 g.
Extrait de malt	1 g.
Glucose	19 g.
Phosphate monopotassique	0.5 g.
Phosphate disotique	0.5 g.
Agar	13 g.

➤ Czapek Yeast Extract Liquide (CYL)

La préparation du milieu CYA nécessite la préparation préalable des trois solutions ; A, C et Cu + Zn.

Composition pour un litre :

Saccharose	30
Extrait de levure	5 g.
Solution A	50mL.
Solution C	50mL.
Solution Cu + Zn	1 ml.

Eau distillée	1L.
---------------	-----

○ Solution A :

Na NO ₃	20 g.
--------------------	-------

KCl	5 g.
-----	------

MgSO ₄ 7H ₂ O	5 g.
-------------------------------------	------

FeSO ₄ 7H ₂ O	0.1 g.
-------------------------------------	--------

Eau distillée	1L.
---------------	-----

○ Solution C :

K ₂ HPO ₄	10 g.
---------------------------------	-------

Eau distillée	1L.
---------------	-----

○ Solution Cu + Zn :

ZnSO ₄ 7H ₂ O	1 g.
-------------------------------------	------

CuSO ₄ 5H ₂ O	0.1 g.
-------------------------------------	--------

Eau distillée	100mL.
---------------	--------

Pour Czapek Yeast Extract Agar (CYA), on met 15 g d'agar pour solidifie le milieu CYL

➤ **Gélose Nutritif (GN) :**

Peptone	5g.
---------	-----

Extrait de levure	3 g.
-------------------	------

Agar	15g.
------	------

Eau distillée	1000mL.
---------------	---------

➤ **Lactophénol bleu coton**

Solution saturée de bleu coton

Bleu d'aniline	10mL.
----------------	-------

Glycérol	10mL.
Eau	80mL.
Lactophénol	100mL.

Annexe 02 : Microorganismes test

➤ *Bacillus sp.*

Les *Bacillus*, classés dans le nouveau genre *Bacillus* avec plus de 90 espèces, sont des bactéries saprophytes, sporulées. Elles vivent naturellement dans les sols dans lesquels elles peuvent survivre très longtemps grâce à leurs spores ; certaines espèces sont trouvées dans l'eau douce, d'autres dans l'eau de mer. Il existe des espèces thermophiles, acidophiles, psychrophiles, alcalinophiles (Dromigny, 2008).

Les *Bacillus* font partie du règne des *Bacteria*, embranchement des *Firmicutes*, classe des *Bacilli*, ordre des *Bacillales*, famille des *Bacillaceae* et genre des *Bacillus*. (Delarras, 2007).

Les *Bacillus* sont rarement commensales chez l'Homme ; ils ne sont pas pathogènes en générale pour l'Homme et pour les animaux sauf pour *Bacillus anthracis* et *Bacillus cereus* (Delarras, 2007).

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli appelée également colibacille, c'est une bactérie de la famille des *enterobacteriaceae*, Gram négatif, mobile, ne possède pas de désaminase (Guiraud, 1998). la plupart des souches d'*E. coli* ne sont pas pathogènes, certaines peuvent causer de graves maladies diarrhéiques chez les êtres humains. Les *E. coli* pathogènes sont subdivisés en six groupes en fonction de leurs caractéristiques sérologiques et de leur virulence : entérohémorragique, entérotoxinogènes, entéroagglutinant et d'adhésion diffuse (santé canada, 2006).

➤ *Candida tropicalis*

Candida tropicalis est une levure unicellulaire qui appartient au genre *Candida*, la famille *Cryptococcaceae* et le groupe deutéromycètes (champignons Imparfait). *C. tropicalis* pousse bien à 25° C et 37° C dans le sang et bouillons de Sabouraud. L'examen microscopique

montre que les cellules rondes ou ovales, *C. tropicalis* assimile, tréhalose, de saccharose, de galactose et de glucose, maltose, saccharose, galactose, cellobiose, xylose et tréhalose et fermenté glucose, maltose.

C. Tropicalis se trouve dans l'environnement et dans les cultures courantes de nez, gorge, peau, et tube digestif des individus en bonne santé. Il est susceptible d'infecter le patient simultanément ou successivement (Michael et Gelfand, 1989).

➤ ***Penicillium sp.***

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988).

Les *Penicillium* sont très rarement incriminés en pathologie animal et humaine, parce que la température de croissance de la plupart des espèces est inférieure à 30°C (Hennequin et Lavarde, 1998).

Les infections sont habituellement provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires des espèces de *Penicillium* sont responsables de Kératomyose (inflammation de la cornée), d'otomyose (inflammation de l'oreille externe), d'onychomyose (infection des ongles) et par fois d'infections profondes (Hennequin et Lavarde, 1998).

<p>Nom et prénom : Benkikaia Basma Chebira Imène</p>	<p>Date de soutenance : 25/ 06/ 2015.</p>
<p>Thème : Production de substances bioactives par <i>Aspergillus repens</i> sur milieu à base d'extrait de Figues de Barbarie</p>	
<p>Résumé :</p> <p>L'objectif de ce travail, repose sur la production de substances antimicrobiennes par la souche <i>Aspergillus repens</i> sur un milieu, à base d'extrait de figues de barbarie (<i>Opuntia ficus-indica</i>), récoltées de la région de Hamma Bouziane, Constantine.</p> <p>L'étude morphologique de la souche productrice, <i>A. repens</i> (fournie par le LaMyBAM) a confirmé les caractères cités par le laboratoire fournisseur. En outre, l'étude du développement d'<i>Aspergillus repens</i> sur différents milieux de culture à savoir ; Sabouraud, CYA, et la gélose à base de l'extrait de figues de barbarie, a montré que sa croissance est favorisée sur le milieu à base de figues de barbarie, en raison du développement important des colonies observé sur cette gélose, en comparaison aux milieux SAB et CYA.</p> <p>Par ailleurs, l'étude de l'activité antimicrobienne d'<i>Aspergillus repens</i> sur les différents microorganismes test, a révélé son pouvoir antimicrobien sur <i>Candida tropicalis</i>, <i>Escherichia coli</i> et <i>Bacillus sp.</i></p> <p>Sur un autre volet, la fermentation sur le milieu synthétique CYL et sur le milieu à base d'extrait de figues de barbarie, a permis d'évaluer la croissance et d'en détecter les substances actives d'<i>Aspergillus repens</i> permettant de conclure, que la souche se développent nettement mieux sur le milieu à base d'extrait de figues de barbarie.</p> <p>En effet, la séparation des substances actives est obtenue par la technique de la chromatographie sur couche mince, qui après révélation par la lumière UV (254 nm) a montré que l'extrait provenant du milieu CYL contient trois types de molécules dont les R_f sont estimés à 0.14, 0.26 et 0.97. Par ailleurs, l'extrait provenant de milieu à base d'extrait de figues de barbarie a subi une séparation donnant aussi trois types de molécules dont les R_f sont estimés à 0.15, 0.13 et 0.96 cependant, les concentrations étaient importantes. Il est à noter que lorsque la souche est cultivée sur le milieu à base du jus de figues de barbarie, elle arrive à un développement parfait, tout en produisant une concentration importante de substances biologiques actives.</p>	
<p>Mots clés : <i>Aspergillus repens</i>, figuier de barbarie (<i>Opuntia ficus-indica</i>), Activité antimicrobienne, substances bioactives, fermentation, CCM.</p>	
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri, Constantine.</p>	
<p>Jury d'évaluation :</p> <p>Président du jury : Mr. DEHIMAT L. Prof. UFM Constantine.</p> <p>Rapporteur : Mlle. YUCEF-ALI M. Dr. UFM Constantine.</p> <p>Examineur : Mr. KACEM CHAOUCHE N. Prof. UFM Constantine.</p>	