



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 la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة
و الحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

**Spécialité : Microbiologie, Option : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production
de substances fongiques**

Intitulé :

**Etude de quelques métabolites secondaires des souches du
genre *Aspergillus* ayant une activité biologique.**

**Présenté et soutenu par : Kahlouche Louiza
Meziane Loubna**

le : 12/06/2017

Jury d'évaluation :

Président :	Mme. LEGHLIMI Hind	M.C. Univ. Mentouri Constantine.
Reporteur :	Mme. GHORRI Sana	M.A.B Univ. Mentouri Constantine.
Examinatrice :	Mme. BENSLAMA Ouided	M.C.B Univ. D'Oum El Bouaghi.
Tutrice :	Mme. BRAMKI Amina	Doctorante Univ. Mentouri Constantine.

**Année universitaire
2016 - 2017**

*A cœur vaillant rien d'impossible
A conscience tranquille tout est accessible
Quand il y a la soif d'apprendre
Tout vient à point à qui sait attendre
Quand il y a le souci de réaliser un dessein
Tout devient facile pour arriver à nos fins
Malgré les obstacles qui s'opposent
En dépit des difficultés qui s'interposent
Les études sont avant tout
Notre unique et seul atout
Ils représentent la lumière de notre existence
L'étoile brillante de notre réjouissance
Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal
Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal
Espérant des lendemains épiques
Un avenir glorieux et magique
Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis
Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri
Aujourd'hui, ici rassemblés auprès des jurys,
Nous prions dieu que cette soutenance
Fera signe de persévérance
Et que nous serions enchantés
Par notre travail honoré*



nous remercions et dédions ce travaille à ... 

Remerciements

Nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage et la volonté nécessaire pour réaliser ce modeste travail.

Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs remerciements à notre encadreur **Mme. GHORRI Sana**, Maitre assistante à l'université Mentouri Constantine qui nous a fait l'honneur de réaliser ce travail sous sa direction, nous lui adresse toute notre reconnaissance pour sa patience, sa disponibilité et sa participation active lors de la rédaction de ce mémoire.

Nous adressons nos remerciements à **Mme. LEGHLIMI Hind**, Maitre de conférences à l'université Mentouri Constantine d'avoir accepté de présider le jury.

Nous remercions également **Mme. BENSLAMA Ouided**, Maitre de conférences à l'université d'Oum El Bouaghi d'avoir accepté de juger ce modeste travail et participer au jury.

L'appui, le soutien et les encouragements que **Mlle BRAMKI Amina**, nous a apportés tout au long de cette période, sa détermination, son zèle, son attention aiguë aux tout petits détails, sa stimulation, sa rigueur fort utile son aimable aide, sa gentillesse, sa sympathie et ses encouragements mais toujours bien assortie de ses nombreuses autres qualités humaines, ont une plus-value inappréciable et déterminante dans l'achèvement de cette étude. Dans la préparation de ce manuscrit, qu'elle l'a supervisé avec attention.

Nous aimerons simplement dire que **Mlle BRAMKI Amina** nous a beaucoup donné, bien loin au-delà de ce que nous pouvons attendre. Qu'elle en soit infiniment remerciée !

Sans oublier de remercier **Mr. SEDIK Toumi** pour son assistance technique, sa disponibilité et pour toutes les lumières qu'il a toujours bien voulu nous apporter.

Nous remercions toute personne, amis et proches, qui nous a soutenue et encouragée tout au long de la réalisation de ce mémoire.

Un grand merci à tous.

Dédicace

A Ma très chère mère ZAHIA affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.

A mon très cher père SALAH aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation

A mes très chers frères IMED et ISSAM les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous

A toute ma famille mes tantes mes oncles mes cousins mes cousines et mes meilleurs ami(e)s

A ma chère binôme MEZIANE Loubna

*A tous ceux qui m'aiment et me sont chers ©
Je dédie ce travail*

KAHLOUCHE Louiza

Dédicace

Je dédie ce travail

*À mes chers parents, mon père LAZHAR, et ma mère LINDA qui
m'ont accompagnés et soutenus durant cette année de formation,
Puisse Dieu, le tout puissant, vous préserver et vous accorder santé,
longue vie et bonheur.*

À mes sœurs FADILA et KATR-EN-NADA

À mon frère MOHAMED NADIR

Que dieu vous protège

À ma tante SABAH et son mari SALAH

Mes cousines AMEL et SABRINA

Mon cousin MEROUANE

À ma chère binôme KAHLOUCHE Louiza

À mes amies : Amína, Hadjer et Ryma.

Loubna MEZIANE

Liste des abréviations

ATCC	American Type Culture Collection
AW	Activity water (activité de l'eau)
BLSE	bêta-lactamases à spectre étendu
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CMB	Concentration Minimale Bactéricide
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CYL	CzapekdoxYeastLiquid.
DMSO	dimethylsulfoxide
NAG	Nacétylglucosamine
NAM	N-acétylmuramique
NRRL ARS)	ARS Culture Collection (culture collection of the Agricultural Research Service ARS)
PDA	Potato Dextrose Agar
RF	Rapport Frontale (Facteur de Rétention)
TSA	Trypto-caséine Soja Agar

Liste des figures

Figure 1 Structure d'un hyphes et son développement vers la formation d'un mycélium	03
Figure 2 Principaux caractères morphologiques du genre <i>Aspergillus</i>	05
Figure 3 Comparaison entre la date de mise d'antibiotique sur le marché et apparition des premières résistance	12
Figure 4 Principaux Mécanisme de résistance de l'antibiotique (guide de résistance. Adapté de : Yim G., <i>Attack of the Superbugs: Antibiotic Resistance</i> , www.scq.ubc.ca.)	14
Figure 5 Principe de la plaque de couche mince.....	20
Figure 6 Aspect macroscopique des trois souches fongiques sur milieu PDA âgées de 7 jours.....	22
Figure 7 Aspect microscopique des trois souches fongiques à grossissement X40.....	22
Figure 8 L'aspect macroscopique des bactéries tests	23
Figure 9 Aspect microscopique des bactéries tests	23
Figure 10 Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres d'agar.....	24
Figure 11 Développement des trois souches du genre <i>Aspergillus</i>	25
Figure 12 Etapes d'extraction des métabolites des souches du genre <i>Aspergillus</i>	26
Figure 13 Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques.....	27
Figure 14 Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits.....	28
Figure 15 Chromatographie sur couche mince.....	33
Figure 16 Chromatographie sur couche mince présentant des spots des substances actives produites par les trois souches d' <i>Aspergillus</i>	33
Figure 17 Plaque chromatographique présentant des fractions des substances actives grattées.....	34

Liste des tableaux

Tableau 01 :Principales familles d'antibiotiques, spectre et leur mode d'action	09
Tableau 02 :Les différentes bactéries tests et leurs milieux sélectifs	16
Tableau 03 : Aspect macroscopique des trois souches du genre <i>Aspergillus</i> sur milieu PDA.....	21
Tableau 04 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques du genre <i>Aspergillus</i> par la technique des cylindres.....	24
Tableau 05 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits fongiques par la technique des disques.....	27
Tableau 06 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits fongiques par la technique des puits.....	28
Tableau 07 :Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche <i>Aspergillus sp1</i> (Exprimés en mm).....	30
Tableau 08 :Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche <i>Aspergillus sp2</i> (Exprimés en mm).....	31
Tableau 09 :Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche <i>Aspergillus sp3</i> (Exprimés en mm).....	31
Tableau 10 : Concentrations minimales bactéricides des trois extraits fongiques sur les bactéries tests.....	32

Annexe

Tableau 11 : Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus sp1*

Tableau 12 : Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus sp2*

Tableau 13 : Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus sp3*

Table des matières :

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

1.	Introduction.....	1
2.	Synthèse bibliographique.....	3
	2.1 Généralités sur les mycètes.....	3
	2.2 Les <i>Aspergillus</i>	4
	2.1.1 Caractères morphologiques.....	4
	2.1.1.1 Caractères macroscopiques.....	4
	2.1.1.2 Caractères microscopiques.....	5
	2.2.2 Taxonomie.....	6
	2.2.3 Production des métabolites secondaires.....	7
	➤ Les métabolites secondaires des <i>Aspergillus</i>	7
	2.3 Les antibiotiques.....	7
	2.3.1 Définition.....	7
	2.3.2 Histoire et importance.....	7
	2.3.3 Classification des antibiotiques.....	8
	2.3.4 Mécanismes d'action.....	9
	2.3.4.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne.....	9
	2.3.4.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique.....	10
	2.3.4.4 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes.....	11
	2.3.4.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN.....	11
	2.3.4.6 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN.....	11
	2.3.5 Résistance des bactéries aux antibiotiques.....	12
	2.3.5.1 Définition.....	12
	2.3.5.2 Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne.....	13
	➤ Diminution de la perméabilité.....	13
	➤ Modification de la cible des antibiotiques.....	13
	➤ Production d'enzymes inactivant les antibiotiques.....	13
	➤ Le mécanisme d'efflux actif.....	14

3.	Matériels et méthodes.....	15
	3.1 Réactivation des souches fongiques : les <i>Aspergillus</i>.....	15
	3.2 Etude morphologique des espèces fongiques.....	15
	3.2.1 Observation macroscopique.....	15
	3.2.2 Observation microscopique.....	15
	3.3 Réactivation des souches bactériennes.....	16
	3.4 Etude morphologique des espèces bactériennes.....	16
	3.4.1 Observation macroscopique.....	17
	3.4.2 Observation microscopique.....	17
	3.5 La mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar.....	17
	3.5.1 Préparation de la suspension bactérienne.....	17
	3.5.2 Le test de la technique des cylindres d'agar.....	17
	3.6 Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les Souches d'<i>Aspergillus</i>.....	18
	3.6.1 Préparation du milieu de fermentation.....	18
	3.6.2 Extraction des métabolites à partir du milieu de fermentation.....	18
	3.7 Étude de l'activité antibactérienne.....	18
	3.7.1 Préparation des extraits.....	18
	3.7.2 Méthode des disques.....	18
	3.7.3 Méthode des puits.....	19
	3.8 La détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	19
	3.9 La séparation des métabolites secondaires par CCM.....	19
4.	Résultats et discussion.....	21
	4.1 Etude morphologique des espèces fongiques.....	21
	4.1.1 Aspect macroscopique.....	21
	4.1.2 Aspect microscopique.....	21
	4.2 Réactivation des souches bactériennes.....	23
	4.3 La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres.....	24
	4.4 Fermentation et extraction des métabolites secondaires.....	25
	4.4.1 Extraction des substances actives des souches du genre <i>Aspergillus</i>.....	25
	4.5 Test d'activité antibactérienne.....	26

4.5.1 Etude de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques.....	26
4.5.2 Etude de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits.....	28
4.6 La détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	30
4.7 Séparation des métabolites par la chromatographie sur couche mince (CCM).....	32
5 Conclusion.....	36
Résumé.....	38
Abstract	39
ملخص.....	40
Référence bibliographique.....	41
Annexe	

Introduction

1.Introduction

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques. Dès lors, la quête des substances anti-infectieuses est devenue un intérêt de santé publique. À partir d'une succession d'observation et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne puis Fleming, la quête a abouti à la découverte des antibiotiques. Depuis cette découverte, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne (Moroh, 2013).

L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes de ces molécules ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (El Amri *et al.*, 2014).

La résistance des bactéries aux antibiotiques constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Chaque jour, de nouveaux mécanismes de résistance voient le jour et se propagent à l'échelle mondiale, compromettant notre capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes. (Azoun, 2016). Aussi, au vu de la propagation du ce phénomène et du nombre limité d'antibiotiques en cours de développement, la découverte de nouveaux agents antibactériens, est devenue plus qu'indispensable. Pour être innovants et contourner les mécanismes de résistance bactériens, les antibiotiques de demain devront viser de nouvelles « cibles » d'action chez les bactéries.

Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou chercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par : l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées, la réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connue, la synthèse de nouveaux dérivés ou l'obtention de nouvelles substances produites par de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques (Kitouni, 2007).

Les champignons représentent une immense source de substance bioactives avec des propriétés stimulant l'immunité qui en font des suppléments naturels très puissants dans les

traitements. Ainsi, les activités des diverses espèces de champignons méritent d'être étudiées afin d'établir d'autres substances fongiques plus puissantes qui peuvent être des thérapies fiables pour les humains (Hu *et al.*, 2002).

Dans ce cadre, s'inscrit notre travail, qui consiste à étudier quelques métabolites secondaires secrétés par trois souches du genre *Aspergillus* qui est connu par sa capacité à sécréter une panoplie de ces derniers constitués principalement de substances biologiquement actives. Plusieurs points sont pris en charge dans cette étude pour répondre à cet objectif en l'occurrence :

- ✓ Étude des caractères phénotypiques des souches fongiques et bactériennes ;
- ✓ Mise en évidence de l'effet antibactérien des souches fongiques ;
- ✓ Production par fermentation et extraction des substances antibactériennes ;
- ✓ Etude de l'activité antibactérienne des extraits fongiques par différentes méthodes ;
 - ✓ Détermination de la concentration minimales inhibitrice et la concentration minimale bactéricide des extraits fongiques ;
 - ✓ Séparation des métabolites par la chromatographie sur couche mince.

Synthèse bibliographique

2. Synthèse bibliographique

2.1. Généralités sur les mycètes

Les champignons sont des microorganismes eucaryotes, aérobies strictes et rarement anaérobies, ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement ; Ils peuvent être uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques et d'autres microscopiques, d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ce sont des organismes à mode de reproduction sexuée ou asexuée (Mathew, 1995 ; Leveau et Bouix, 1993 ; Tortora *et al.*, 2003 ; Tabuc, 2007).

Ce groupe d'organisme ubiquistes comprend environ 120000 espèces, présentant des structures et caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Senal *et al.*, 1993 ; Kirk *et al.*, 2001).

D'un point de vue morphologique, un mycète est constitué d'un thalle formant l'appareil végétatif (Hawksworth *et al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'une structure de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés : le mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des champignons les hyphes sont divisés par des cloisons (**Figure 01**) ou Septa contenant un seul noyau, on les appelle des hyphes segmentés ou septés. Chez certaines classes de mycètes, les hyphes sont dépourvus des cloisons et ont l'aspect d'une longue cellule continue à noyaux multiples ; ils sont donc appelés cénocytes (Tortora *et al.*, 2003).

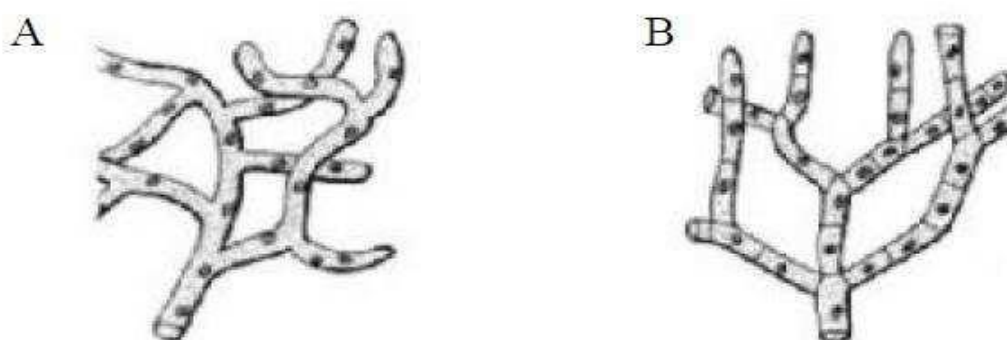


Figure 01 : Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonnée (Chabasse *et al.*, 2002).

Les champignons sont majoritairement mésophiles, leur température optimale est de 15 à 30°C. Il existe des champignons qui se développent dans des conditions extrêmes. C'est le cas par exemple des champignons dits thermorésistants pouvant se développer jusqu'à 80°C (Conner et Beuchat, 1987). La majorité des moisissures se développe à une activité d'eau AW située entre 0,85 et 0,99 (Pitt et Hocking, 1997).

2.2 Les *Aspergillus*

Les *Aspergillus* sont des moisissures omniprésentes, largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissibles par le courant d'air, de plus la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2010).

Près de 300 espèces composent ce genre, il est fréquemment rencontré dans l'air (2 à 8% des spores isolées dans l'air), le sol, les caves humides, sur les céréales, les légumes, les fruits moisissés et les matières organiques en décomposition (Savalle, 2015).

Les *Aspergillus* peuvent présenter à la fois des formes sexuées (champignons parfaits) et des formes asexuées (champignons imparfaits).

Même si ce genre inclut les principaux agents pathogènes de champignons filamenteux de l'homme ; la plupart des membres sont des microorganismes utiles dans la nature pour la dégradation des polysaccharides végétaux et sont d'importance industrielle pour la production d'enzymes. Parmi eux, *A. niger*, *A. oryzae* et *A. sojae*. (Latgé, 1999 ; Brookman et Denning, 2000 ; Ward *et al.*, 2006)

2.2.1 Caractères morphologiques

2.2.1.1 Caractères macroscopiques

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques additionnés d'antibiotiques. Ils sont cependant, pour la plupart, inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est en effet avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 h selon les espèces) que ces colonies vont prendre teinte caractéristique : brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. (Botton *et al.*, 1990).

2.2.1.2 Aspect microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un thalle végétatif formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. L'identification du genre *Aspergillus* reposera sur la mise en évidence des têtes aspergillaires à l'examen microscopique des colonies.

Sur le mycélium d'*Aspergillus* prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés, appelés conidiophores. Ils se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle s'accrochent des cellules conidiogènes appelées phialides. Les phialides peuvent être portées par des petits articles appelés métules (tête bisériée) ou bien insérées directement sur les vésicules (tête unisériée). La conidiogénèse correspondant à une reproduction asexuée qui s'effectue sur le mode blastique phialidique, par bourgeonnement à l'apex des phialides. Les conidies restent accolées les unes aux autres en chaîne ramifiée, la plus jeune étant à la base de la chaîne, à côté de la phialide. (**Figure 02**) (Chabasse *et al.*, 2002 ; 2008).

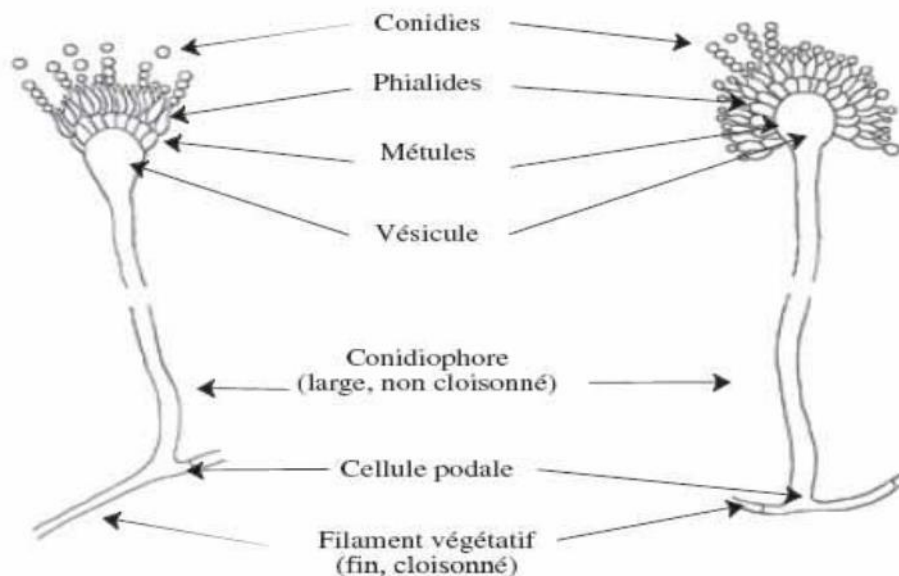


Figure 02 : Principaux caractères morphologiques du genre *Aspergillus* (Raper et Fennell, 1965).

2.2.2 Taxonomie

Les champignons sont classés en fonction de leur morphologie et la diversité des types de cycles de reproduction, en incluant la formation de spores sexuées différentes (Scriban, 1993 ; Madigan et Martinko, 2007) ; mais il n'existe pas encore une classification universelle.

En effet, selon Botton *et al.* (1990) et Guiraud (1998), la classification des *Aspergillus* est comme suit :

Règne : **Fungi**
Division : **Eumycota**
Classe : **Deuteromycetes**
Ordre : **Moniliales**
Famille : **Moniliaceae**
Genre : ***Aspergillus***

Cependant, Webster et Weber en 2007 donnent une autre classification où le genre *Aspergillus* appartient au phylum des Ascomycota, classe des Plectomycetes de l'ordre des Eurotiales et de la famille des Trichomaceae.

2.2.3 Production des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même. Ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Les microorganismes produisent leurs métabolites secondaires après avoir terminé leur phase de croissance et avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase (Tortora *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressives et toxiques. (Demain *et Fang*, 2000).

Les moisissures produisent des métabolites secondaires dont certains, les mycotoxines, peuvent représenter un risque pour la santé humaine.

Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations, d'induire un effet toxique (Reboux *et al.*, 2006). Ils se distinguent des métabolites primaires comme par exemple les produits de la glycolyse, qui sont primordiaux pour tout être vivant.

➤ Les métabolites secondaires des *Aspergillus*

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.

En effet, la souche d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a été décrite pour sa capacité à produire la melleine, le 4-hydroxymelleine (Moore *et al.*, 1972), l'acide pénicillique et la 5,6-dihydroacide pénicillique (Obana *et al.*, 1995), l'asperlactone et l'isoasperlactone (Torres *et al.*, 1998), la xanthoméganine, la viomelleine et la vioxanthine (Richard *et al.*, 1999 ; Frisvad et Thrane, 2002), mais aussi les ochratoxines (Taniwaki *et al.*, 2003).

2.3 Les antibiotiques

2.3.1 Définition

Un antibiotique est une substance thérapeutique qui a pour but de lutter contre des bactéries responsables d'infection, exerçant une action toxique. Cette dernière peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique et réversible, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible (Abdelaziz, 2006).

Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration.

Ils sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol ou certains champignons ; extraits de substances d'organismes vivants, leur origine est dite naturelle mais ils peuvent aussi être synthétisés de façon totale ou partielle (origine semi-synthétique) (Ait-Mouhoub, 2015).

2.3.2 Histoire et importance

L'histoire des antibiotiques a commencé en 1877, Pasteur et Joubert observent qu'une bactérie se développe moins dans un bouillon envahi de moisissures. Cette remarque entraîne progressivement l'utilisation des moisissures pour lutter contre les infections microbiennes (Moroh, 2013).

Synthèse bibliographique

En 1897, Ernest Duchesne, médecin français fut le premier biologiste qui évoqua l'existence d'un antagonisme entre les moisissures et les bactéries. En observant ce phénomène, il avait là les prémices de l'antibiothérapie.

En 1928, Alexander Fleming étudiait l'effet antibactérien des lysozymes (présents dans la salive et les larmes) sur des *Staphylocoques*. Il a la mauvaise surprise de constater que ses boîtes à pétri sont contaminées par des moisissures d'un blanc verdâtre et cotonneuses, le *Penicillium notatum*, utilisé car étudié dans un laboratoire voisin. Ses cultures sont désormais inutilisables, mais avant de s'en débarrasser, Fleming va constater que les *Staphylocoques* ne se développent pas à proximité du champignon. Pour lui, il semble que le champignon synthétise une substance qui bloque le développement de la bactérie et l'appelle alors la « pénicilline » (Brezinski, 2006).

En 1932 Josef Klarer et Fritz Mietzsch synthétisent la sulfonamidochrysoïdine, un colorant rouge bordeaux. Et c'est le premier antibiotique connu, la sulfanilamide (sulfamide). Il a été isolé en 1935. Ils l'ont utilisé dans la lutte pour les infections cutanées. Peu de temps après, Gerhard Domagk découvrit que ce colorant était efficace in vivo dans les infections à *Streptocoques*. En 1935, ce produit sera commercialisé sous le nom de Pron-tosil® (El Abdani, 2016 ; Battraud, 2017).

En 1939, le chimiste Chain et le clinicien Florey s'associent pour former le groupe d'Oxford afin de reprendre les travaux du Dr Fleming. Ils arrivent à fabriquer la pénicilline à échelle industrielle à partir de 1943 (Ait-Mouhoub, 2015).

La fin de la Seconde Guerre mondiale vit l'apparition d'un autre antibiotique célèbre, la streptomycine. Produite par un micro-organisme vivant dans le sol, *Streptomyces griseus*, cette substance fut découverte par Waksman en 1943. Elle se révéla efficace contre les bactéries de certaines infections courantes, de la méningite et, surtout, de la tuberculose.

À partir de là, les chercheurs du monde entier n'eurent de cesse de trouver de nouveaux antibiotiques et de créer des variétés de semi-synthèse à partir des souches existantes, dans le but d'une plus grande efficacité.

2.3.3 Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon leurs origines, modes d'action, spectres d'activité ou natures chimique. Le classement selon cette dernière nous permet de

Synthèse bibliographique

distinguer plusieurs familles d'antibiotique, répertoriées dans le tableau suivant (**Tableau 01**) (Smaoui, 2010).

Tableau 01 : Principales familles d'antibiotiques, spectre et leur mode d'action

Famille	Antibiotiques	Spectre
BETA-LACTAMINES	Pénicillines G Pénicillines V Oxacilline (mécicilline) Ampicilline Amoxicilline Carbénicilline Ticarcilline Pipéracilline	Etroit (Cocci a gram positif et a gram négatif, bacilles a gram positif) Etroit (Cocci a gram positif) Large
AMINOSIDES	Streptomycine Neomycine Kanamycine Nétilmycine Tobramycine Gentamicine Amikacine	Large
TETRACYCLINES	Tétracycline Chlortétracycline Oxytétracycline Doxycycline Minocycline	Large
PHENICOLES	Thiamphénicol Chloramphénicol	Large
SULFAMIDES	Sulfadiazine Sulfamoxole Sulfisoxazole Sulfaméthoxazole	Large
DIAMINOPYRIMIDINES	Triméthoprim	Large
QUINOLONES	Acide naldixique Acide oxolinique Enoxacine Norfloxacine Ciprofloxacine Ofloxacine	Etroit (bacilles a gram négatif) Large

2.3.4 Mécanismes d'action

Afin de pouvoir exercer son activité antibactérienne, un antibiotique doit :

- ✓ Atteindre sa cible, et donc pénétrer la membrane externe, la paroi, et la membrane cytoplasmique.
- ✓ Persister à des concentrations suffisantes.
- ✓ Reconnaître la cible.

Les cibles décrites jusqu'à présent sont la paroi, la membrane, les ribosomes et l'acide nucléique des micro-organismes (Ziai, 2014).

2.3.4.1 Les antibiotiques qui ciblent la paroi bactérienne

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) (Bégué et Astruc, 1999). Trois modes d'action sont utilisés par les antibiotiques :

- ✓ Inhibiteurs de la transpeptidase.
- ✓ Inhibiteurs de la polymérisation du peptidoglycane.
- ✓ Inhibiteurs de la formation d'acide N-Acétyle Muramique.

2.3.4.2 Les antibiotiques qui ciblent la membrane plasmique

Certains antibiotiques ont pour cible la membrane plasmique bactérienne avec une action bactéricide. Ces antibiotiques de type polypeptidique présentent une toxicité lors de leur administration. Ce sont des molécules naturelles produites par des bactéries du genre *Bacillus*. On peut les diviser en deux sous familles.

✓ **Les polypeptides tensio-actifs** : Ces antibiotiques agissent comme des détergents par leur caractère amphiphile et s'insèrent parmi les phospholipides membranaires, cette insertion perturbe la perméabilité de la membrane bactérienne entraînant la mort cellulaire.

✓ **Les polypeptides non tensio-actifs** : En s'insérant dans la membrane plasmique, la gramicidine forme des canaux et augmente la perméabilité de la membrane. (Bourinbaiar et Coleman, 1997).

2.3.4.3 Les antibiotiques qui ciblent les ribosomes

La plupart des antibiotiques qui ont pour cible les ribosomes interfèrent avec la synthèse protéique en induisant des erreurs de synthèse ou en inhibant cette synthèse. La cellule bactérienne est ainsi dans une incapacité de synthétiser des protéines qui lui sont vitales (Le Minor et Véron, 1989 et Houvenaeghel, 1992 et Thévenot, 2003).

Trois modes d'action sont utilisés par ces antibiotiques :

- ✓ Inducteur d'erreurs de décodage.
- ✓ Inhibition de l'élongation par le site P.
- ✓ Inhibition de l'activité de la peptidyl transférase.
- ✓ Inhibition de la fixation de l'ARN de transfert.

2.3.4.4 Les antibiotiques qui ciblent l'ARN

Pour ce mode d'action, on dénombre la famille des rifamycines, composée des rifamycines A, B, C, D, E, S et SV. En se liant à l'ARN polymérase, ces antibiotiques bloquent la formation de la chaîne d'ARN messager et par conséquent on assiste à un arrêt de la synthèse protéique (Méningocoque) (Tenstet, 2010).

2.3.4.5 Les antibiotiques qui ciblent l'ADN

L'ADN est la cible des quinolones, qui forment une large famille d'antibiotiques de synthèse et dérivent de l'acide nalidixique.

Ces antibiotiques possèdent une région qui se lie par liaison hydrogène à l'ADN bactérien. Il s'agit de la région de la molécule qui comporte le groupe carbonyle de la quinone. Cette molécule établit également une interaction spécifique avec les enzymes de type topoisomérase. Ce sont des enzymes qui permettent le déroulement de l'ADN pour sa transcription ou l'enroulement de l'ADN après sa transcription. Elles contrôlent donc plus loin la synthèse des protéines ou encore la division cellulaire de la bactérie. L'interaction des quinolones avec ces enzymes se fait par les radicaux qui jouxtent la quinone (Moroh, 2013).

2.3.5 Résistance des bactéries aux antibiotiques

2.3.5.1 Définition

La plupart des antibiotiques sont issus de la nature, certaines bactéries ont donc déjà acquis des résistances avant même d’avoir été exposées aux antibiotiques : il s’agit de la résistance naturelle. Cette résistance est présente d’emblée dans toutes les bactéries de la même espèce. A l’inverse, la résistance acquise est secondaire à l’exposition à un antibiotique qui exerce une pression de sélection (Moreliere, 2014).

Cette résistance est aujourd’hui un phénomène planétaire et les multirésistances sont préoccupantes, pas uniquement dans les établissements de soins. Elles ont disséminé dans les populations (Hugues, 2008). Durant ces dernières années, on compte un peu moins d’une dizaine d’espèces bactériennes concernées par la résistance aux ATB. La figure 03 témoigne bien de la réalité, à chaque antibiotique utilisé en médecine humaine est apparu des souches bactériennes résistantes.

Développement des résistances:



Figure 03 : Comparaison entre la date de mise d’antibiotique sur le marché et apparition des premières résistances. Source : ANSM

2.3.5.2 Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne

Ils peuvent être regroupés en quatre grands types :

➤ Diminution de la perméabilité

Par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leurs synthèses par les quelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie, citons par exemple le cas de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à L'imipenème causée par la perte d'une porine spécifique aux carbapénèmes (Lozniewski et Rabaud, 2010).

➤ Modification de la cible des antibiotiques

Il existe différents mécanismes de modification de la cible de l'antibiotique. Tout d'abord, la modification structurelle de la cible entraînant une perte d'affinité dans le couple cible-antibiotique. L'antibiotique ne pouvant pas se fixer correctement à sa cible, son action sera limitée. L'exemple le plus important concerne la résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* (Geslin , Buu-Hoi , Frémaux , Acar, 1995).

➤ Production d'enzymes inactivant les antibiotiques :

Production de bêta-lactamases par exemple codées par des plasmides ou des éléments génétiques transposables. Le nombre des bêta-lactamases plasmidique est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêtalactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tel que l'acide clavulanique, Sur un plan pratique, les bêta-lactamases peuvent être regroupées en 4 catégories :

A/ Les pénicillinases sensu stricto ; chez *Staphylococcus aureus*, elles inactivent la pénicilline G, les pénicillines A...etc. Elles sont par contre sans action sur la pénicilline M (oxacilline ou méticilline) ainsi que sur les céphalosporines. Ces pénicillinases sont inductibles et codées par des plasmides ou des transposons.

B/ Les bêta-lactamases à spectre élargi ; ces bêta-lactamases, codées par des plasmides, entraînent une résistance (ou une diminution d'activité) vis-à-vis des pénicillines G, des pénicillines M, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des céphalosporines de 1ère et de 2ème génération (sauf les céphamycines). Les bêtalactamases à spectre élargi sont bien inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam.

C/ Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) ; ces bêta-lactamases dérivent des enzymes précédentes par mutation des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi. Le profil de résistance conféré est identique à celui conféré par les bêta-lactamases à spectre élargi mais, il s'étend aux céphalosporines de 3ème génération et à l'aztréonam. Les bêta-lactamases à spectre étendu restent sensibles aux inhibiteurs.

D/ Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs ; les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivent de certaines bêta-lactamases à spectre élargi par mutations ponctuelles. Le profil de résistance conféré est identique à celui des bêta-lactamases à spectre élargi mais ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam (El Abdani, 2016).

➤ Le mécanisme d'Efflux actif

Il s'agit d'un système d'exportation de l'antibiotique en dehors de la bactérie, d'un mécanisme actif, la bactérie synthétise des protéines d'export qui vont emporter l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie. Ainsi il ne peut pas se fixer à sa cible et est inefficace. On connaît ce mécanisme notamment pour les tétracyclines (Poole, 2005).

Ce sont des mécanismes de transport membranaire universellement répandus chez des organismes vivants. Ils ont un rôle clé dans la physiologie bactérienne : préserver l'équilibre physico-chimique du milieu intracellulaire en s'opposant à l'accumulation de substances naturelles ou synthétiques toxiques transport de substances nutritives et export de substances toxiques (Sibylle, 2011).

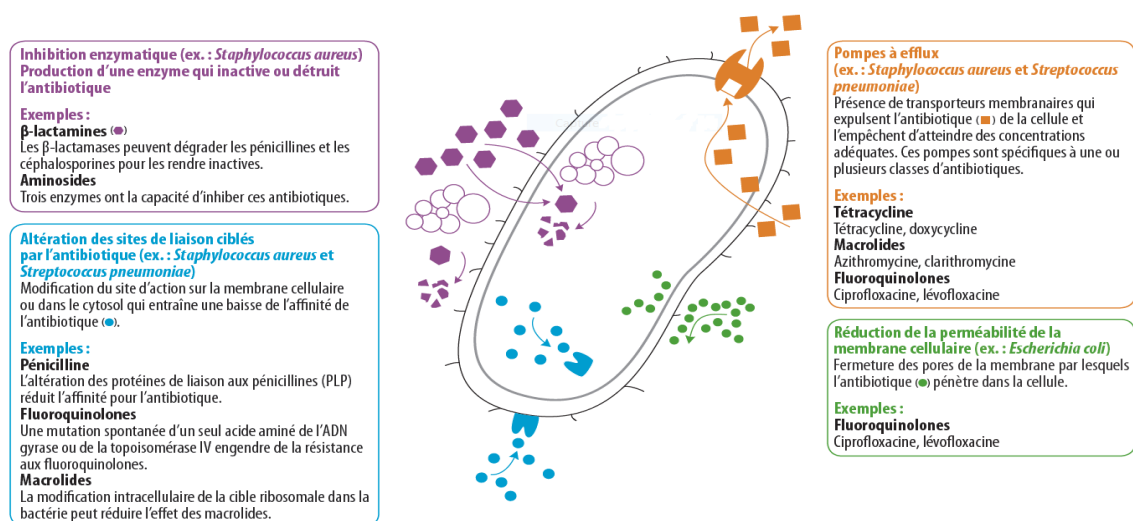


Figure 04 : Principaux Mécanisme de résistance de l'antibiotique (guide de résistance. Adapté de : Yim G., *Attack of the Superbugs: Antibiotic Resistance*, www.scq.ubc.ca.)

Matériel
Et
Méthodes

3. Matériel et méthodes

Notre travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne des extraits de trois souches fongiques du genre *Aspergillus*. Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) situé à Chaaba.

Les souches fongiques et les six bactéries tests utilisées dans ce travail ont été fournies par le laboratoire LaMyBAM.

3.1. Réactivation des souches fongiques

La réactivation de ces souches se fait sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Annexe 01), à partir des cultures conservées, par la technique de touche centrale. Le pH du milieu est amené à 7 et l'incubation est réalisée à 28°C pendant 7 jours.

3.2. Etude morphologique des espèces fongiques

L'identification est faite sur des cultures pures. Elle repose sur l'observation des critères macroscopiques et microscopiques.

3.2.1. Observation macroscopique

Après incubation, l'aspect macroscopique des colonies est observé directement sur boîtes. D'après Guiraud, (1998) les principaux caractères culturels à étudier sont : la vitesse de croissance des colonies, la couleur des colonies, leur variation en fonction du temps, la texture de la surface, la couleur de l'envers des boîtes, l'odeur des colonies et le changement de la couleur du milieu utilisé.

3.2.2. Observation microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu de Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 suffit pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

Selon (Badill *et al.*, 1987) les critères d'identification microscopique sont : le thalle (septé ou siphonné), l'aspect, la forme et la taille des spores, et la présence ou l'absence des formes productrices (les chlamydospores).

3.3. Réactivation des souches bactériennes

Le support microbien utilisé est composé de six souches bactériennes, quatre souches ATCC (American Type Culture Collection), qui sont en l'occurrence :

- *Escherichia coli* (ATCC, 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC, 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Et deux souches cliniques à savoir :

- *Streptococcus sp.*
- *Klebsiella sp.*

La réactivation des bactéries est faite par ensemencement sur des milieux sélectifs pour chaque bactérie (tableau 02) selon la méthode des quadrants. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Tableau 02 : Les différentes bactéries tests et leurs milieux sélectifs

Bactérie	Milieu sélectif (annexe 01)
<i>E. coli</i>	Hecktoen
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose au citrimide
<i>S. aureus</i>	Chapman
<i>B. subtilis</i>	Gélose TryptoneSoja (TSA)
<i>Streptococcus sp</i>	TSA
<i>Klebsiella sp</i>	Hecktoen

3.4. Etude morphologique des espèces bactériennes

La pureté des souches bactériennes a été vérifiée par repiquage sur boîte contenant un milieu sélectif. L'observation macroscopique détermine les critères morphologiques alors que l'observation microscopique n'a été faite qu'après la coloration de Gram afin de déterminer

Le type de chaque bactérie (Gram positif ou négatif).

3.4.1. Observation macroscopique

L'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé, âgées de 24h, est observé directement à l'œil nu (Guiraud, 1998).

3.4.2. Observation microscopique

Par ailleurs, l'examen microscopique des bactéries a englobé la technique de coloration de Gram classique décrite par Delarasse (2007) (Annexe 03).

L'observation est faite au grossissement X 40, puis à immersion X 100.

3.5. La mise en évidence de l'activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar

Ce test a pour objectif de rechercher l'activité antibactérienne des souches d'*Aspergillus* sur le développement des bactéries tests : *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *Streptococcus sp*, *Klebsiella sp* (Annexe 02).

3.5.1. Préparation de la suspension bactérienne

La suspension bactérienne est préparée à partir de colonies viables fraîchement identifiées dans des tubes à essai stériles contenant de l'eau physiologique. La turbidité est ajustée à 0.5 Mac Ferland (Annexe 1).

3.5.2. Le test de la technique des cylindres d'agar

Cette technique consiste à déposer des cylindres d'agar, prélevés à partir des colonies fongiques pures âgées de 14 jours, sur la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller-Hinton (Annexe 1)ensemencée préalablement par les bactéries tests. Les boîtes de Pétri sont mises à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une pré diffusion des substances bioactives, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures (Gungi *et al.*, 1983).

3.6. Production et extraction des molécules bioactives élaborées par les Souches d'*Aspergillus*

3.6.1 Préparation du milieu de fermentation

La production de molécules bioactives à partir des espèces d' *Aspergillus* a été effectuée par fermentation sur milieu Czapek dox liquide (CYL) (**Annexe 1**) additionné de 2.5% extrait de levure, ce dernier a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des métabolites (Rojas *et al.*,2005, Pamel *et al.*, 2010).

Des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture, ont été inoculées par quatre disques de culture âgées de 7 jours puis incubées à 28°C pendant 14 jours (Tuomi *et al.*,2001 ; Ghorri, 2015).

3.6.2. Extraction des métabolites à partir du milieu de fermentation

Après 14 jours d'incubation, les métabolites secondaires ont été extraits à l'aide du chloroforme. Un volume de ce dernier, équivalent à celui du milieu de culture a été rajouté puis le tout a été mixé à l'aide d'un ultraturax, pour bien extraire les métabolites, ensuite la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu à travers du papier filtre type Wattman N° 01.

Dans une ampoule à décanter, le mélange a été transvasé et les deux phases : la phase organique et la phase chloroformique (supposée contenir les sous-produits métaboliques) ont été séparées.

L'opération a été répétée plusieurs fois pour s'assurer de la récupération de toutes les substances actives après avoir filtré à l'aide d'un papier filtre Wattman n°01.

A l'aide d'un Rotavapeur (BUCHI) à 45°C avec une légère rotation, la phase chloroformique a été évaporée à sec.

3.7. Etude de l'activité antibactérienne

3.7.1. Préparation des extraits

Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 100 mg/ml.

37.2. Par la méthode des disques

Afin de déterminer l'activité antibactérienne des extraits obtenus, un volume de 10µl de Chaque extrait a été déposé à l'aide d'une pipette sur les disques stériles (6 mm de diamètre). Puis placés, après séchage, à la surface des géloses préalablement inoculés avec les bactéries tests (Hazalin *et al.*, 2009). Après, les boites ont été mises pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

3.7.3. Par la méthode des puits

Cette technique consiste à perforer la gélose Muller-Hintonensemencée avec les bactéries tests à l'aide d'un perforateur de façon à obtenir des puits de 3mm de diamètre. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 20µl d'extrait, ensuite les boites sont laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C. La mesure des zones d'inhibition autours des puits est effectuée après 18 h à 24 h d'incubation (Tortorano *et al.*, 1979).

NB : pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, les diamètres des zones claires autour des cylindres d'agar, des disques et des puits révélant l'activité antibactérienne des souches fongiques ont été mesurés. Les tests ont été effectués en triplicata (Yamaç et Bilgili, 2006).

3.8 La détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), Il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu. Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 100 à 0,097 mg/ml pour les extraits. Ce test a été réalisé par la technique des disques (décrite en 3.7.2).

Pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîteensemencée est incubée 24 heures à 37°C (Harrar, 2012).

3.9. La séparation des métabolites secondaires par CCM

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des métabolites secondaires et leur identification avec une bonne

Synthèse bibliographique

précision. Elle se fait sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de chaque extrait chloroformique concentré. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'éluion constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1) respectivement (Multon, 1982) (**Figure 05**).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 15 cm à partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ($\lambda = 254$ et 365 nm). Les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hintonensemencée avec la bactérie-test pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Après pré-diffusion à $+4^{\circ}\text{C}$ et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

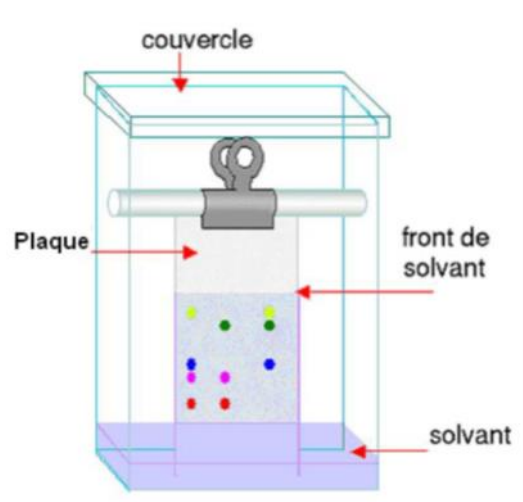


Figure 5 : Principe de la chromatographie sur couche mince

Résultats
Et
Discussion

4. Résultats et discussion

Ce travail porte sur la production des substances antibactériennes secrétées par trois souches du genre *Aspergillus*.

4.1. Etude morphologique des espèces fongiques

4.1.1. Aspect macroscopique

Après 07 jours d'incubation à 28°C, les souches ont montré un bon développement sur milieu PDA, les colonies se présentent sous la forme irrégulière, présentant un centre élevé, un contour blanc et une texture duveteuse sur la gélose, le revers se présente sous une coloration beige, marron, jaune et verte (**Tableau03**), (**Figure 06**). Ces résultats sont conformes à ceux établis par Chabasse *et al.* En 2002, qui ont montré que la température idéale pour le développement des espèces du genre *Aspergillus* est entre 22°C à 25°C ; en conséquent, la couleur des colonies développant 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.

4.1.2. Aspect microscopique

Toutes les moisissures ont été soumises à étude microscopique réalisée par une observation des cultures pures âgées de 07 jours au grossissement X40 et X100. Cette observation étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

L'observation microscopique des trois souches a révélé que le thalle est hyalin, le mycélium non cloisonné, la tête conidiennne est bisériée, la forme de la tête du conidiophore est dressée, ramifiée, terminée en vésicule, les spores lisses et globuleuses (**Figure 07**).

Tableau 03 : Aspect macroscopique des trois souches d'*Aspergillus sp* sur milieu PDA.

	Diamètre (mm)	Couleur / face	Couleur / revers
<i>Aspergillus sp1</i>	65.20	Blanc, jaune, gris, beige	Jaune, marron, Rose
<i>Aspergillus sp2</i>	35.75	Blanc	Blanc, beige, marron,
<i>Aspergillus sp3</i>	39.00	Blanc, jaune	Beige

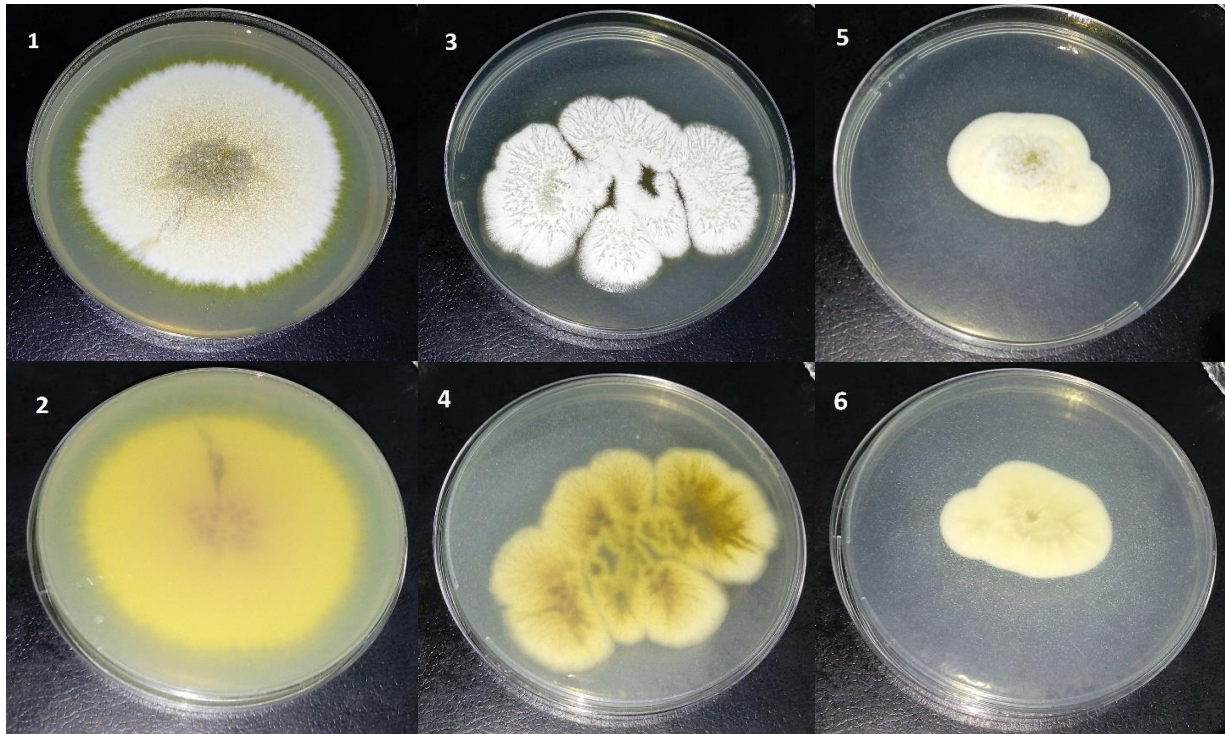


Figure 06 : Aspect macroscopique des trois souches fongiques sur milieu PDA âgées de 7 jours. (1). Face d'*Aspergillus sp1* ; (2). Revers d'*Aspergillus sp1* ; (3). Face d'*Aspergillus sp2* ; (4). Revers d'*Aspergillus sp2* ; (5). Face d'*Aspergillus sp3* ; (6). Revers d'*Aspergillus sp3*.

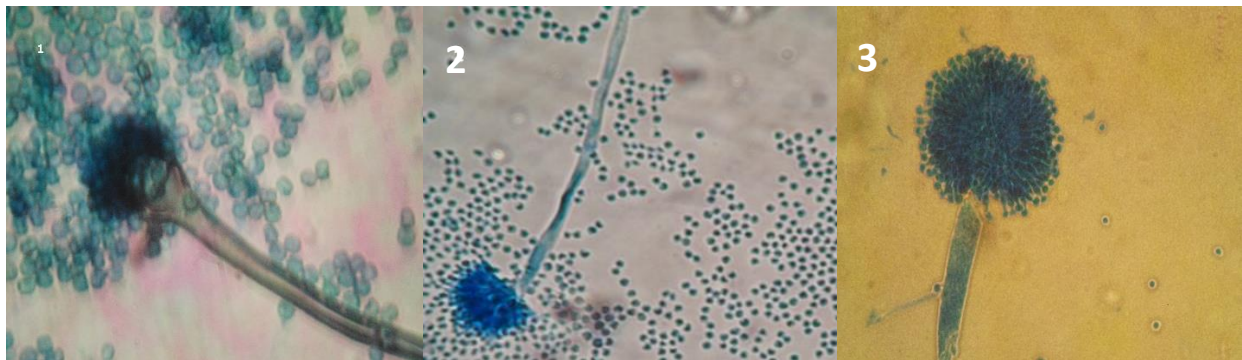


Figure 07 : Aspect microscopique des trois souches fongiques à grossissement X40. (1) *Aspergillus sp1* ; (2). *Aspergillus sp2* ; (3). *Aspergillus sp3*.

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

4.2. Réactivation des souches bactériennes

Après 24 h d'incubation, les bactéries tests ont montré un bon développement sur leurs milieux sélectifs (**Figure 08**).

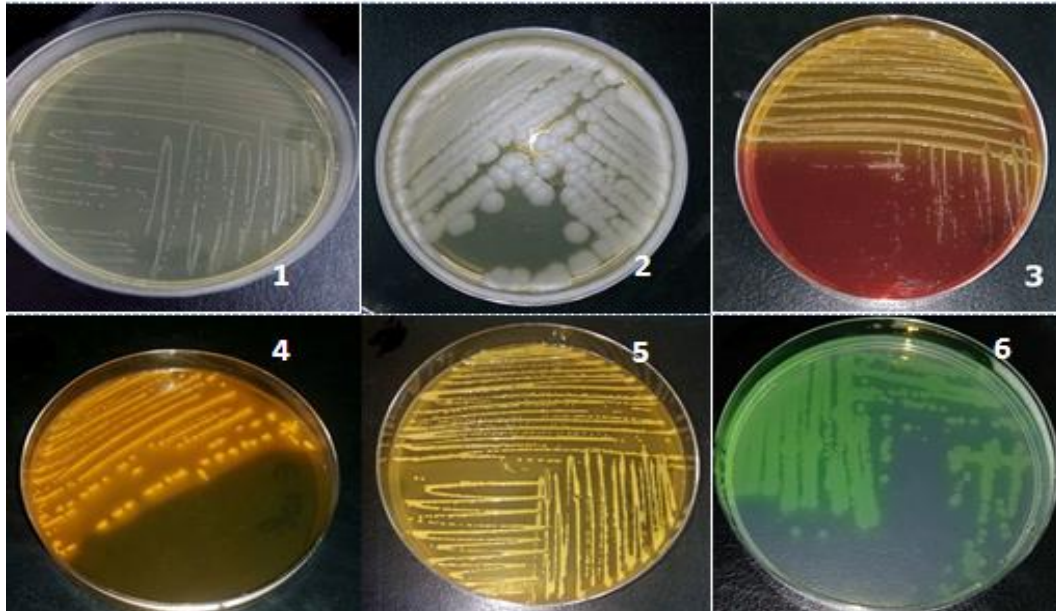


Figure 08 : L'aspect macroscopique des bactéries test : (1). *Streptococcus sp* ; (2). *Bacillus subtilis* ; (3). *Staphylococcus aureus* ; (4). *Escherichia coli* ; (5). *Klebsiella sp*; (6). *Pseudomonas aeruginosa*.

Par ailleurs, l'observation microscopique des bactéries réactivées effectuée après une coloration de Gram, a confirmé la pureté des souches tests fournies. (**Figure 09**)

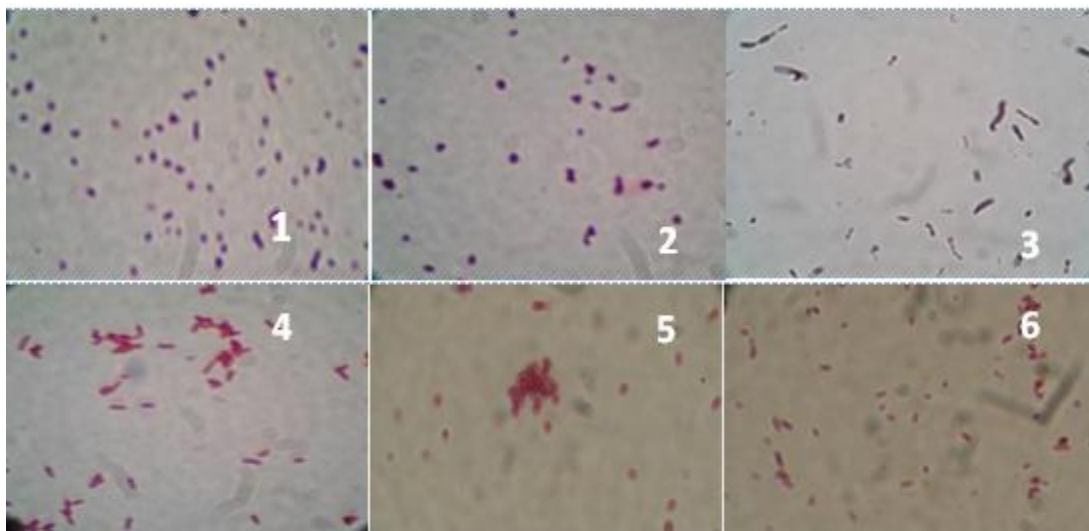


Figure 09 : Aspect microscopique des bactéries test : (1). *Streptococcus sp* ; (2). *Bacillus subtilis* ; (3). *Staphylococcus aureus* ; (4). *Escherichia coli* ; (5). *Klebsiella sp* ; (6). *Pseudomonas aeruginosa*.

4.3. La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres d'agar

Le test d'antagonisme par la technique des cylindres d'agar a montré la capacité des trois souches du genre *Aspergillus* à produire des substances biologiques actives à effet antibactérien sur deux bactéries tests (**figure 10**), avec des différences notées dans les diamètres des zones d'inhibition (**tableau 04**).

Tableau 04 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques du genre *Aspergillus* par la technique des cylindres

	<i>Aspergillus sp1</i>	<i>Aspergillus sp2</i>	<i>Aspergillus sp3</i>
<i>Streptococcus sp</i>	20,00 ± 2,00	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	33,67 ± 2,03	33,00 ± 2,65	31,33 ± 3,21
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Klebsiella sp</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

*(-) : Diamètre de la zone d'inhibition ≤ 6 mm

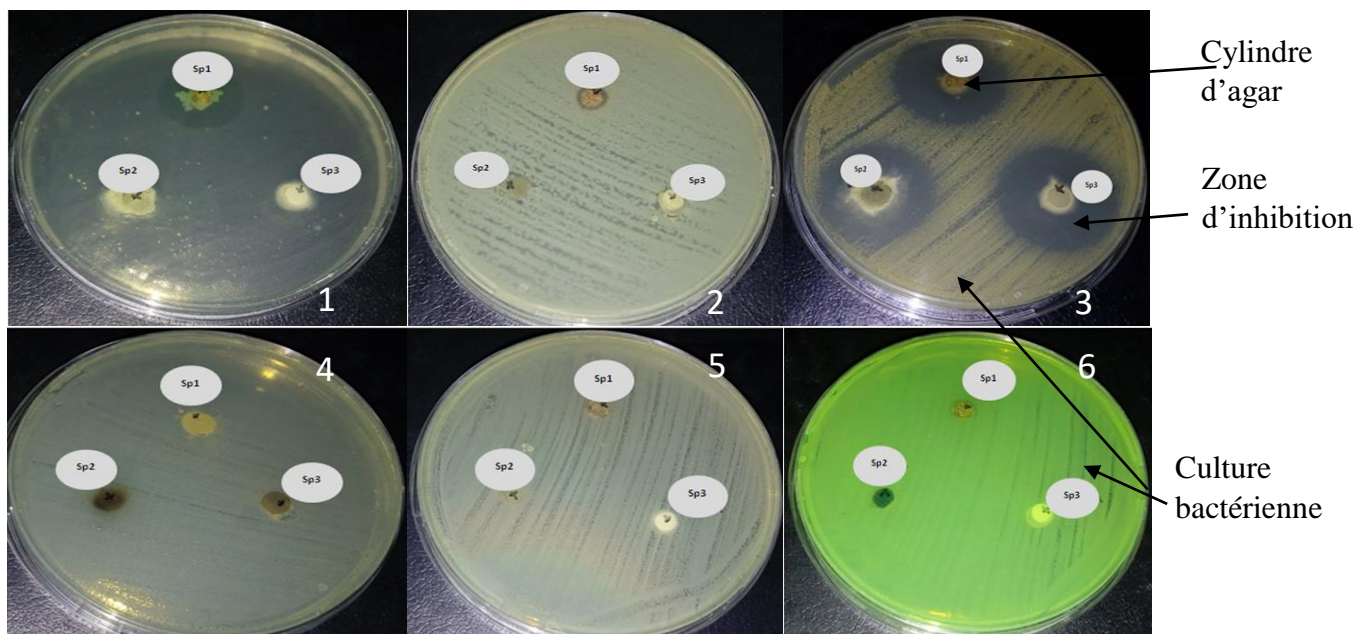


Figure 10 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres d'agar. : (1) *Streptococcus Sp*, (2) *Bacillus subtilis*, (3) *Staphylococcus Aureus*, (4) *Escherichia coli*, (5) *Klebsiella sp*, (6) *Pseudomonas aeruginosa*.

Les zones d'inhibition les plus fortes ont été observées contre *S. aureus* avec des diamètres de 33.67, 33 et 31.33 mm pour les trois souches fongiques *Aspergillus sp 1*, *Aspergillus sp2* et *Aspergillus sp3* respectivement. En revanche *streptococcus sp* a montré une sensibilité uniquement avec *Aspergillus sp1* avec un diamètre de 20mm.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les quatre souches testées *B. subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella sp.* et *P. aeruginosa*.

En effet, ces souches sont connues par leur production de substances à effet antibactérien (Madki *et al.*, 2010 ; Maria *et al.*, 2005). Ces métabolites secondaires biologiquement actifs, sont synthétisés en fin de croissances (Attalah et Kacem-Chaouche, 1992).

4.4. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Sur un autre volet, la production de molécules bioactives par les trois souches du genre *Aspergillus*, a été effectuée par fermentation sur milieu Czapeck liquide (CYL) (Annexe 1). L'étude de l'activité antibactérienne de ces molécules, a été réalisée en testant les extraits chloroformiques sur les bactéries tests.

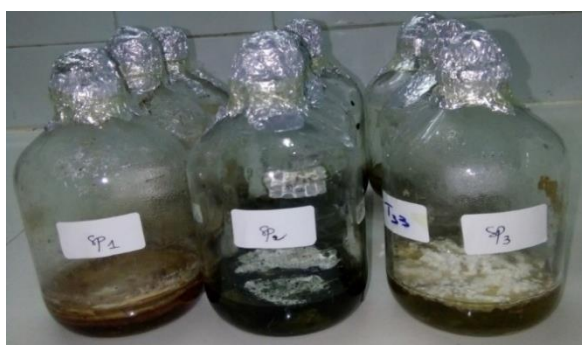


Figure 11 : Développement des trois souches du genre *Aspergillus* (sp1, sp2, sp3).

4.4.1. Extraction des substances actives des souches du genre *Aspergillus*

Après fermentation de 14 jours, le contenu de chaque flacon a subi une extraction par du chloroforme (CHCl_3), puis une filtration avec du papier Wattman n°1 et une décantation avec une ampoule à décante où deux phases sont obtenues et nettement séparées ; une organique en haut de l'ampoule et l'autre chloroformique en dessous de celle-ci.

La phase chloroformique contenant les biomolécules est évaporée à sec à 45 °C avec une légère rotation à l'aide d'un rot à vapeur. Enfin et une fois sec, l'extrait a été remis en

suspension dans du DMSO et placé dans un flacon en verre pour tester l'activité antibactérienne des souches fongiques (Gengan *et al.*, 1999) (**Figure 12**).



Figure 12 : Etapes d'extraction des métabolites des souches du genre *Aspergillus* : (1). Extraction par le chloroforme ; (2). Filtration ; (3). Décantation, (4) évaporation.

4.5. Test de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches fongiques a été testée par deux méthodes : la première c'est celle des disques et la deuxième c'est celle des puits.

La méthode utilisée pour étudier l'activité antibactérienne est la diffusion sur gélose Mueller-Hinton. Grâce à sa spécificité et à sa composition, ce milieu, souvent rencontré dans la littérature, permet une bonne croissance aux bactéries-tests tout en offrant des résultats clairs. L'ensemencement a été réalisé par écouvillonnage afin d'assurer une distribution uniforme de l'inoculum sur la gélose et faciliter la diffusion des molécules actives (Horikawa *et al.*, 1999 ; Woo *et al.*, 2002).

4.5.1. Etude de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques

Après la diffusion des composés antibactériens sur gélose, des zones d'inhibition différentes apparues sur les boîtes (**Figure 13**). Le tableau ci-dessous présente les différents diamètres.

Résultats et discussion

Tableau 05 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits fongiques par la technique des disques

	<i>Aspergillus sp1</i>	<i>Aspergillus sp2</i>	<i>Aspergillus sp3</i>
<i>Streptococcus sp</i>	16,00 ± 0,14	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	12,50 ± 0,07	26,00 ± 0,14	10,00 ± 0,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,00 ± 0,00	18,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00
<i>Escherichia coli</i>	11,50 ± 0,07	11,50 ± 0,21	-
<i>Klebsiella sp</i>	8,50 ± 0,07	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

*(-) : Diamètre de la zone d'inhibition ≤ 6 mm

Les résultats de la technique des disques ont montré que, les trois extraits fongiques possèdent une activité antibactérienne contre la plupart des bactéries tests avec des zones d'inhibition considérables allant de 10 à 26 mm, et ce, en utilisant la concentration de 100 mg/ml, pour les trois souches fongiques.

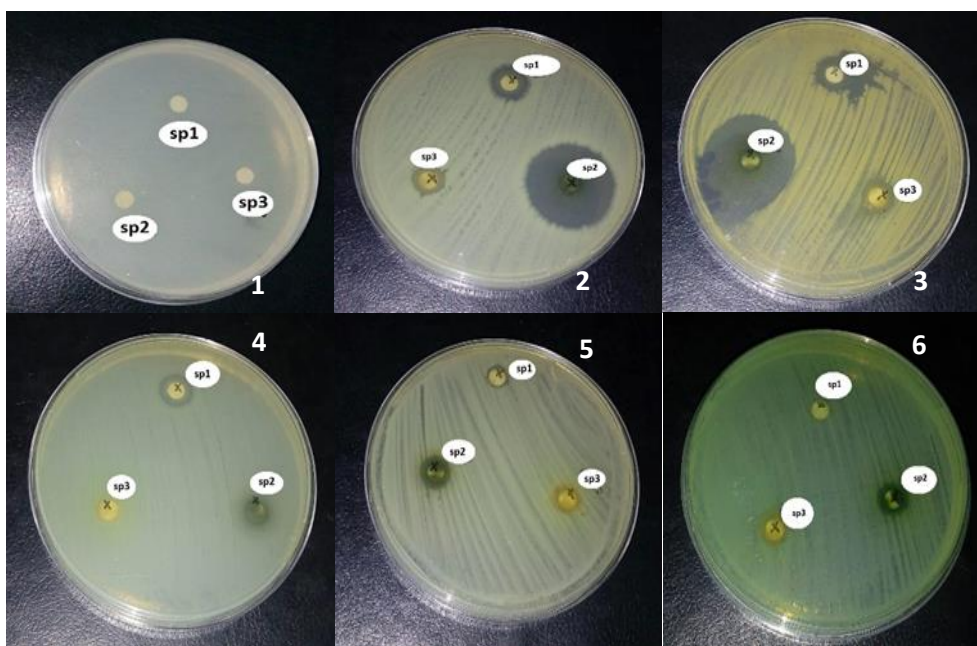


Figure 13 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques. : (1) *Streptococcus Sp*, (2) *Bacillus subtilis*, (3) *Staphylococcus Aureus*, (4) *Escherichia coli*, (5) *Klebsiellasp*, (6) *Pseudomonas aeruginosa*

Les souches bactériennes *B. subtilis* et *S. aureus*, appartenant au groupe Gram + montrent une sensibilité considérable avec les trois souches fongiques où les diamètres allant de 10 à 26mm pour la première bactérie et de 10 à 18mm pour la seconde. Cependant *E. coli* a montré une sensibilité avec *Aspergillus sp1*. et *Aspergillus sp2*. avec un diamètre de 11.5mm pour chaque extrait. Les souches *Streptococcus sp*. *Klebsiella sp*. montrent une sensibilité seulement avec *Aspergillus sp1*. donnant des zones d'inhibition de 8.5 et 16mm de diamètre

Résultats et discussion

respectivement. La souche bactérienne *P. aeruginosa* a été la plus résistante quel que soit l'extrait fongique utilisé.

4.5.2. Etude de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits

Après 24H d'incubation, les trois souches du genre *Aspergillus* ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries tests et ce, par l'apparition des zones d'inhibition pour l'ensemble des souches bactériennes (**Figure 14**). Le tableau 06 montre les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus par les souches fongiques.

Tableau 06 : Résultats de l'activité antibactérienne des extraits fongiques par la technique des puits

	<i>Aspergillus Sp1</i>	<i>Aspergillus Sp2</i>	<i>Aspergillus Sp3</i>
<i>Streptococcus sp</i>	22,00 ± 0,00	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	12,50 ± 0,70	23,00 ± 0,00	10,00 ± 01,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	13,50 ± 0,70	14,00 ± 0,70	11,00 ± 0,00
<i>E. coli</i>	15,00 ± 0,57	13,50 ± 0,21	-
<i>Klebsiella sp</i>	7,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

*(-) : Diamètre de la zone d'inhibition ≤ 6 mm

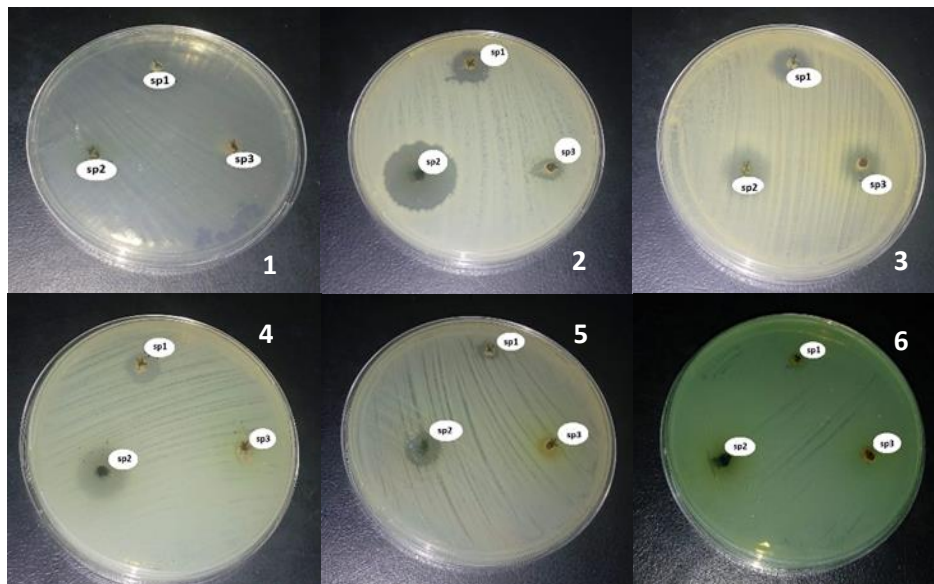


Figure 14 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits : (1) *Streptococcus Sp*, (2) *Bacillus subtilis*, (3) *Staphylococcus Aureus*, (4) *Escherichia coli*, (5) *Klebsiella sp*, (6) *Pseudomonas aeruginosa*.

Résultats et discussion

Les résultats de la technique des puits ont montré une activité considérable des trois extraits chloroformiques vis à vis les bactéries tests. Les diamètres des zones d'inhibition varient de 7 à 26mm.

Les souches bactériennes *B. subtilis* et *S. aureus* montrent encore une sensibilité considérable avec les trois souches avec des diamètres allant de 10 à 23mm pour la première bactérie et de 11 à 14mm pour la seconde. *E. coli* a montré une sensibilité avec *Aspergillus sp1* et *Aspergillus sp2* avec un diamètre de 15mm pour le premier extrait et de 13.5mm pour le second. *Klebsiella spa* montrée une sensibilité avec les deux extraits *Aspergillus sp1* et *Aspergillus sp2* avec des diamètres de 7 et 11 respectivement. *Streptococcus sp.* montre une sensibilité seulement avec *Aspergillus sp1* donnant une zone d'inhibition de 22mm de diamètre. *P. aeruginosa* a montré une résistance avec les trois souches fongiques.

Les résultats des deux techniques sont relativement semblables ce qui confirme le pouvoir du genre *Aspergillus* de produire des substances antibactériennes.

Les résultats rassemblés dans les tableaux (04, 05,06) et les figures (13 ,14) montrent que tous les extraits possèdent une activité antibactérienne sur la majorité des souches bactériennes testées.

En effet Botton *et al* en 1990 ont montré que les espèces du genre *Aspergillus* sont connues pour leur production de substances à effet antibactérien.

L'activité antibactérienne contre les bactéries tests à coloration de Gram positive apparaît plus importante que celle contre les bactéries à coloration de Gram négative. Cela est lié avec les résultats obtenus par Prabavathy et ValliNachiyar en 2012.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes différents morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composants structurels lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Kumara *et al.*, 2010).

4.6. La détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

Les trois extraits antibactériens ont été évalués afin de déterminer leur concentration minimale inhibitrice et bactéricide en utilisant la méthode des disques, contre les deux souches bactériennes les plus sensibles ; *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. En effet après ensemencement et incubation à 37°C pendant 24H, les trois extraits fongiques ont montré une activité antibactérienne considérable avec les différentes concentrations, les résultats obtenus sont récapitulés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 07 : Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp1* (Exprimés en mm)

Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	10,50 ± 0,71	12,50 ± 0,00
50	9,00± 0,00	9,00± 0,00
25	-	-
12.5	-	-
6,25	-	-
3,125	-	-
1,562	-	-
0,781	-	-
0,390	-	-
0,195	-	-
0,097	-	-

(-) : Absence de la zone d'inhibition

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de la concentration 25 mg/ml, aucune zone d'inhibition n'est enregistrée donc il n'y'a aucun effet antibactérien, de ce fait la CMI de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp1*. est égale 50mg/ml pour les deux souches bactériennes.

Résultats et discussion

Tableau 08 : Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp2* (Exprimés en mm)

Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	1800 ± 00,00	26,00 ± 0,14
50	12,50 ± 0,71	14,5 ± 0,71
25	9,00 ± 00,00	9,5 ± 0,71
12,5	8,00 ± 00,00	8,50 ± 0,71
6,25	-	-
3,125	-	-
1,562	-	-
0,781	-	-
0,390	-	-
0,195	-	-
0,097	-	-

(-) : Absence de la zone d'inhibition

Dans le cas de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp2.*, les zones d'inhibition sont apparues à partir de la concentration 100mg/ml jusqu'à la concentration 12.5mg/ml, pour les deux bactéries tests. Par conséquent la concentration 12.5mg/ml est considérée comme la CMI.

Tableau 09 : Activité antibactérienne de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp3.* (Exprimés en mm)

Concentration (mg/ml)	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	12,50 ± 3,53	11,50 ± 2,12
50	11,50 ± 0,00	10,50 ± 0,71
25	10,00 ± 1,41	10,00 ± 0,00
12.5	8,00 ± 0,00	9.33 ± 0,57
6,25	7,00 ± 0,00	9,00 ± 0,00
3,125	-	-
1,562	-	-
0,781	-	-
0,390	-	-
0,195	-	-
0,097	-	-

(-) : Absence de la zone d'inhibition

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de la concentration 3.125mg/ml, aucune zone d'inhibition n'est enregistrée donc il n'y'a aucun effet antibactérien, de ce fait la CMI de l'extrait chloroformique de la souche *Aspergillus sp3.* est égale 6.25mg/ml pour les deux espèces bactériennes.

Pour la détermination des concentrations minimales bactéricides (CMB) un prélèvement à l'anse est réalisé autour chacun des disques ne présentant aucune culture visible. Chaque prélèvement est déposé en strie sur gélose Mueller-Hinton. La boîte ensemencée est incubée 24 heures à 37°C (Harrar, 2012).

Les résultats des CMB sont récapitulés dans le tableau 10.

Tableau 10 : Concentrations minimales bactéricides des trois extraits fongiques sur les bactéries tests

Souche bactérienne	<i>Bacillus subtilis</i>			<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>sp1</i>	<i>sp2</i>	<i>sp3</i>	<i>sp1</i>	<i>sp2</i>	<i>sp3</i>
CMB (mg/ml)	100	50	100	100	50	50

Selon le tableau ci-dessus, les résultats montrent que les CMB ont varié de 50 mg/ml à 100 mg/ml. Cela montre la plus forte activité inhibitrice pour les trois extraits fongiques contre les deux bactéries.

En comparant les trois composés, nous avons pu observer la plus forte activité bactéricide pour l'extrait de la souche fongique *Aspergillus sp2.*, et la plus faible activité pour l'extrait de la souche *Aspergillus sp1.*

Ces résultats sont conformes avec, Phainuphong *et al.*, en 2017, qui ont trouvé que l'acide pénicillique isolée d'*Aspergillus sclerotiorum* a une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* avec des valeurs de CMI de 128 mg / ml.

4.7. Séparation des métabolites par la chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des métabolites secondaires et leur identification avec une bonne précision.

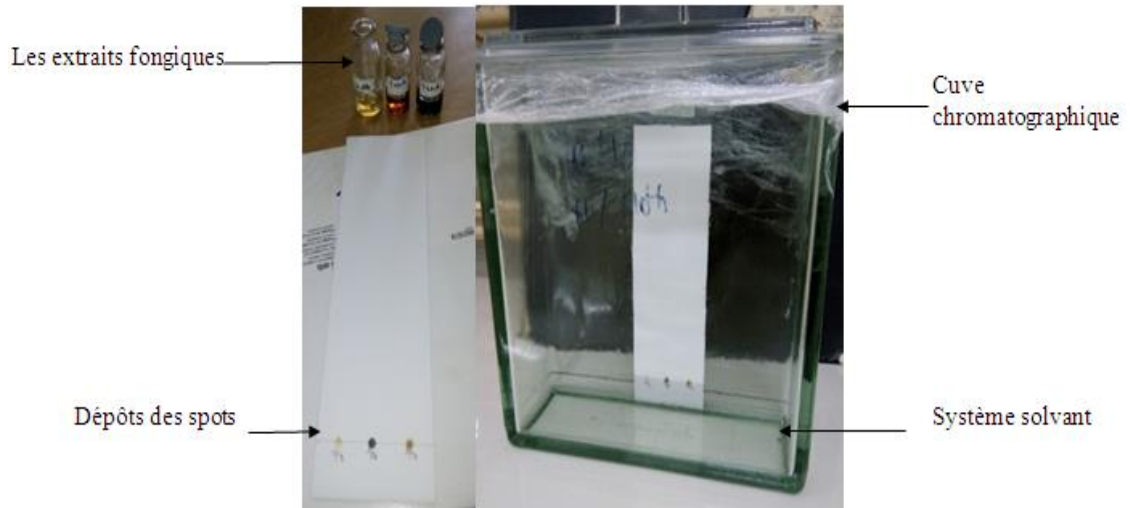


Figure 15 : Chromatographie sur couche mince : 1). Dépôt des extraits sur la plaque de CCM ; 2). Migration des spots sur la plaque de CCM.

La plaque de silicagel a été révélée par la lumière UV à deux différentes longueurs d'onde (254nm, 365nm) et aussi observée à lumière visible (**Figure 16**)

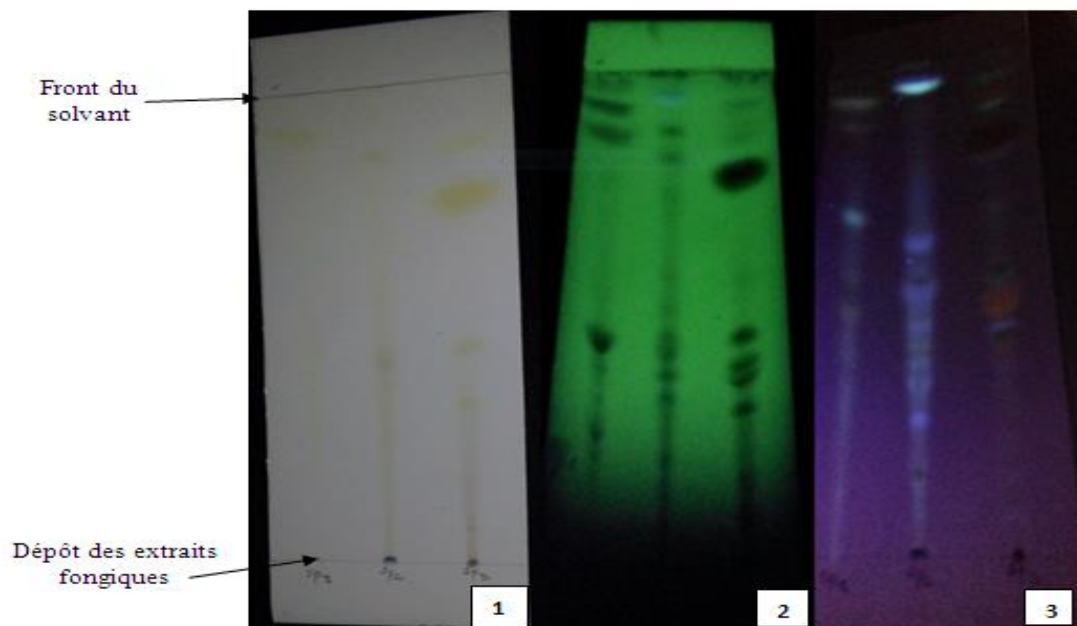


Figure 16 : Chromatographie sur couche mince présentant des spots des substances actives produites par les trois souches d'*Aspergillus sp.* : (1). Plaque chromatographique observée par lumière visible ; (2). Plaque chromatographique observée par lampe à UV a (254nm) ; (3). Plaque chromatographique observée par lampe à UV à (365nm)

Résultats et discussion

La chromatographie sur couche mince des extraits des souches fongiques a permis de séparer plusieurs métabolites, apparus sous formes de taches fluorescentes après révélation sous lumière UV pour la caractérisation et la purification, le résultat a montré que les composés antibactériens actifs avaient plusieurs points fluorescents sombres sous une lumière UV et avaient des valeurs Rf différentes.

La révélation des plaques CCM des extraits fongiques par les différentes radiations UV et à lumière visible a montré l'apparition de 15 spots pour la souche *Aspergillus sp1*, 28 spots pour la souche *Aspergillus sp2* et 33spots pour la souche *Aspergillus sp3*. (**Tableau13, 14, 15**) (Annexe04).

Les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hintonensemencée avec la bactérie-test pour mettre en évidence leur activité antibactérienne (**Figure17**). Après pré-diffusion à +4°C et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.



Figure 17 : Plaque chromatographique présentant des fractions des substances actives grattées

Les résultats montrent que cinq fractions du premier extrait (n°2, 4, 5, 7 et 8), trois fractions du deuxième (n°9, 11 et 12) et une fraction (n°30) du troisième extrait, seulement ont présenté une activité contre les deux bactéries (Annexe04).

Ce test a montré la capacité des fractions des trois souches du genre *Aspergillus* à produire des substances biologiquement actives. L'utilisation de chromatographie sur couche mince pour séparer et purifier les substances actives a permis l'obtention de spots purs. Cette pureté est démontrée par son application sur ces deux bactéries les plus sensibles aux substances antibactériennes.

Résultats et discussion

En effet, les espèces du genre *Aspergillus* sont connues par leur production de ce type de métabolites à effet antibactérien, En 2000, Irobi *et al.*, ont travaillé sur l'espèce fongique *Aspergillus quadrilineatus* et ils ont trouvé que cette dernière ayant une activité antimicrobienne remarquable contre *S. aureus* et *B. subtilis*, en 2002, Niede *et al.*, ont montré que l'*A. fumigatus* ayant une activité antimicrobienne remarquable contre *S.aureus*, *Candida albicans* et *Micrococcusluteus*, en outre Barakat et Gohar en 2012, ont montrés que l'*A. terreus* ayant une activité antibactérienne considérable par rapport à certains antibiotiques classiques.

En conclusion, les champignons ont évolué au fil du temps. Ils constituent une source potentielle pour renforcer la lutte de l'homme contre les bactéries de plus en plus résistantes aux antibiotiques, ce qui constitue un problème majeur de santé publique.

Conclusion générale

Et

Perspectives

5. Conclusion générale et perspectives

Ce présent travail a été réalisé dans la conception de la recherche de nouvelles molécules à effet antibactérien. En effet, trois souches fongiques du genre *Aspergillus*, fournie par le laboratoire LaMyBAM, ont été testées contre six bactéries dont trois à Gram+ ; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* et *Bacillus subtilis*, et trois à Gram- ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella sp.*

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des *Aspergillus* est réalisée par la technique des cylindres d'agar. Cette dernière a montré un effet antibactérien plus au moins considérable contre les bactéries tests.

Les substances actives sont recherchées dans le filtrat de fermentation après une extraction par le chloroforme, et leur séparation est réalisée par la technique de la chromatographie sur couche mince.

La révélation des chromatogrammes par les différentes radiations UV et à lumière visible a montré que les extraits des souches fongiques contiennent 15 composés pour la première souche, 28 composés pour la seconde et 33 composés pour la dernière qui apparaissent sous forme de taches distinctes.

Le test de l'effet antibactérien des différents spots a prouvé que les extraits fongiques contiennent des fractions actives.

Les bactéries à Gram+ sont avérées les plus sensibles aux extraits fongiques, avec des concentrations minimales inhibitrices varient entre 6.25 et 50 mg/ml, et des concentrations minimales bactéricides varient entre 100 et 50 mg/ml.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives :

- Ultra-purification et identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises « HPLC, CPG ...etc. »
- Etude de l'activité antibactérienne des métabolites secondaires *in vivo*.

Conclusion

- L'élongation des tests antimicrobiens des extraits fongiques sur une gamme plus large des souches tests « levures, champignons...etc. »
- Etude du mécanisme d'action de ces substances sur les microorganismes tests.

Résumé

Résumé

Le présent travail a été effectué dans le but d'étudier l'activité antibactérienne des métabolites bioactifs de trois souches du genre *Aspergillus* fournies par le laboratoire LaMyBAM.

La mise en évidence de cette activité a été réalisée par la technique des cylindres d'agar, vis-à-vis de six souches bactériennes dont trois à coloration Gram+ ; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et *Streptococcus sp.* et trois à coloration Gram- ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *klebsiella sp.* Les résultats montrent que les 3 souches fongiques présentent une activité antibactérienne considérable. En effet l'évaluation de cette dernière a été effectuée après une fermentation sur milieu CYL et une extraction par le chloroforme, suivant deux techniques différentes ; la technique des disques et technique des puits. Les résultats montrent que les extraits des souches fongiques ont une bonne activité inhibitrice sur la plupart des bactéries tests où *S. aureus* et *B. subtilis* sont avérées les plus sensibles, ces deux bactéries ont été utilisées pour chercher les CMI et les CMB des extraits chloroformiques, en testant 11 différentes concentrations de 0,097 à 100 mg/ml. Les résultats montrent que les valeurs de CMI sont : 50, 12.5, et 6.25 mg/ml pour les extraits chloroformiques des souches *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2* et *Aspergillus sp3* respectivement. Tandis que les CMB varient entre 100 et 50 mg/ml pour les deux bactéries. La chromatographie sur couche mince des substances bioactives des 3 souches fongiques a permis de séparer plusieurs métabolites, la révélation par les différentes radiations UV et à lumière visible a montré l'apparition de 15 spots pour la souche *Aspergillus sp1*, 28 spots pour la souche *Aspergillus sp2* et 33spots pour la souche *Aspergillus sp3*. Ces spots sont grattés pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Les résultats montrent que cinq fractions du premier extrait, trois fractions du deuxième et une fraction du troisième extrait, seulement ont présenté une activité antibactérienne contre les deux bactéries.

Mots clés : *Aspergillus*, activité antibactérienne, CMI, CMB, CCM

Abstract

The present research sets out to study the antibacterial activity of the bioactive metabolites of three strains of the *Aspergillus* genus provided by the LaMyBAM laboratory.

The demonstration of this activity was carried out by the technique of agar cylinders, with respect to the bacterial strains, three of them were Gram+; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus sp.* and the other three were Gram-; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella sp.* The results show that the 3 fungal strains exhibit a considerable antibacterial activity. Indeed, the evaluation of this latter was carried out after fermentation on CYL medium and extraction by chloroform, according to two different techniques; the disk technique and the well technique. The results show that the extracts of the fungal strains have good inhibitory activity on most of the test bacteria where *S. aureus* and *B. subtilis* are found to be the most sensitive, these two bacteria have been used to search for MIC and The MBC of the chloroform extracts, by testing 11 different concentrations of 0.097 to 100 mg / ml. The results show that the MIC values are: 50, 12.5, and 6.25 mg / ml for the chloroform extracts of the strains *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2* and *Aspergillus sp3* respectively. While MBC vary between 100 and 50 mg / ml for both bacteria. The thin-layer chromatography of the bioactive substances of the 3 fungal strains enabled the separation of several metabolites, revealing by the different UV rays and visible-light showed the appearance of 15 spots for the *Aspergillus sp1* strain, 28 spots for the *Aspergillus sp2* strain and 33 spots for the *Aspergillus sp3* strain. These spots are scraped to demonstrate their antibacterial activity. The results show that five fractions of the first extract, three fractions of the second and a fraction of the third extract, only showed antibacterial activity against both bacteria.

Key words: *Aspergillus*, antibacterial activity, MIC, MBC, TLC.

المخلص

أُجري هذا البحث من أجل دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للمركبات النشطة بيولوجيا لثلاث سلالات من جنس *Aspergillus* المقدمة من طرف المختبر LaMyBAM. تمت عملية الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا بتقنية أسطوانات الأغار على ستة سلالات بكتيرية ثلاثة منها موجبة الغرام *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus: streptococcus sp*, و *Bacillus subtilis* وثلاثة أخر سلبية الغرام *Pseudomonas aeruginosa*, *klebsiella sp*: أظهرت النتائج أن السلالات الفطرية الثلاثة تبدي نشاط مضاد للبكتيريا معتبر. وبالفعل تم إجراء تقييم لهذا الأخير بعد عملية التخمير في الوسط CYL وعملية استخلاص بواسطة الكلوروفورم، وفقا لاثنتين من التقنيات المختلفة تقنية الأقراص وتقنية الأبار. بينت النتائج أن هذه السلالات لديها نشاط مثبط على معظم السلالات البكتيرية حيث البكتيريا *B. subtilis* و *S. aureus* كانت الأكثر حساسية، واستخدمت هاتان الأخيرتان للبحث على التركيز الأدنى المثبط (CMI) و التركيز الأدنى القاتل (CMB)، عن طريق اختبار 11 تركيزا مختلفا من 100-0.097 ملغ / مل. وأظهرت النتائج أن قيم CMI هي: 50، 12.5، و 6.25 ملغ / مل لمستخلصات الكلوروفورم للسلالات *Aspergillus sp1*، *Aspergillus sp2* و *Aspergillus sp3* على التوالي. في حين CMB تختلف ما بين 100 و 50 ملغ / مل لكل من البكتيريا المختبرة. كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة سمحت بفصل المواد الأيضية المتحصل عليها والكشف عنها باستعمال الأشعة فوق البنفسجية والضوء المرئي وبينت النتائج أن السلالة الأولى تحتوي على 15 بقعة، الثانية على 28 بقعة والأخيرة على 33 بقعة وقد تم كشط هذه البقع لتسليط الضوء على نشاطهم المضاد للبكتيريا. وبينت النتائج أن خمسة بقع من السلالة الأولى، ثلاث بقع من الثانية وبقعة واحدة من الثالثة، فقط أظهرت وجود نشاط مضاد ضد كل من البكتيريا المختبرة.

الكلمات المفتاحية: التركيز الأدنى المثبط، التركيز الأدنى القاتل، النشاط المضاد للبكتيريا *Aspergillus* كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Abdelaziz.Wided (2006). Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Thèse de Magister. Université des frères Mentouri. Constantine

Ait-Mouhoub, S. E. (2015). L'automédication aux antibiotiques en médecine générale : étude quantitative auprès de patients. Thèse de doctorat. universite de picardie jules verne faculte de medecine d'amiens

Attalah M and Kacem –Chaouche N. (1992). Production of ochratoxin A in a semisynthetic: « in the second Regional Mycoligical Conf. *RMC 2* ». Cairo. Egypt.

Azounsafa (2016). Le, p. e. s. p. épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au chu de Marrakech.

B

Badillet G., de Briève C., Guého E., (1987), Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris

Barakat K.M. et Gohar Y. M., (2012). Antimicrobial Agents Produced by Marine *Aspergillus terreus* var. *africanus* Against Some Virulent Fish Pathogens. *Indian J Microbiol.*; 52(3): 366–372.

Battraud Paul (2017). La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité ? thèse pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie. Université de Lille 2.

Bégué, P. and J. Astruc (1999). Pathologie infectieuse de l'enfant, Masson 612 pages.

Bennett, J. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.

Sibylle Bevilacqua. (2011). Évaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le coût des antibiotiques au CHU de Nancy. (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de doctorat. École Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement P :19

Référence bibliographiques

Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.

Bourinbaiar, A. S. and C. F. Coleman (1997). "The effect of gramicidin, a topical contraceptive and antimicrobial agent with anti-HIV activity, against herpes simplex viruses type 1 and 2 in vitro." *Archives of Virology* 142 : 2225-2235.

Brezinski Claude (2006). *Histoires de sciences : Inventions, découvertes et savants*. p. 186. (Editions Le Harmattan).

Brookman J.L., Denning D.W., (2000). Molecular genetics in *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 3(5); 468-474.

C

Cahagnier B., Richard-Molard D., (1998). Analyse mycologique in *Moisissures des aliments peu hydratés*, Ed. Tec & Doc, p 140-158

Chabasse D., Bouchara J-P ; De gentile L., Brun S., Cimmon B., Penn P.(2002). Cahier de formation les moisissures d'intérêt médicale.

Chabasse D, et al. (2008). Moisissures, dermatophytes, levures : du prélèvement au diagnostic: Biomérieux Education.

Conner D.E., Beuchat L.R. (1987). Heat resistance of ascospores of *Neosartorya fischerias* affected 129 by sporulation and heating medium. *International Journal of Food Microbiology* 4,303-312.

D

Demain A and Fang A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 69 : 1-39.

Dellaras, Camille. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire, d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Paris : Edition Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-0945-8

E

El amri et al. J. Appl. Biosci. (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées.

EL Abdani Saïd (2016). Évolution de la résistance bactérienne aux antibiotiques et conseils en antibiothérapie. Thèse de doctorat. universite mohammed v-rabat faculte de medecine et de pharmacie -rabat-.

F

Frisvad, J.C. and Thrane, U. (2002).Mycotoxin production by commonfilamentousfungi. In: Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (Eds.), Introduction to foodand Air borne fungi, sixthed. CentraalbureauvoorSchimmelcultures, Utrecht, pp. 321-330.

G

Gengan R. M., Chuturgoon A. A., Mulholland D. A and Dutton, M. F. (1999). Synthesis of sterigmatocystin derivatives and their biotransformation to aflatoxins by a blocked mutant of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia*144 : 115–122.

Geslin P, Buu-Hoi A, Frémaux A, Acar JF. (1992). Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An Epidemiological Survey in France, 1970–1990. *Clin Infect Dis.* Jul1;15(1):95–8.

Ghorri S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti-*fusarium*. Thèse de doctorat. Université Mentouri Constantine.

Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.

H

Harrar Abd El Nacer. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. mémoire de Magister en biochimie et physiologie expérimentale. Université Ferhat Abbas Sétif.

Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. (1994). Ainsworth and Bysby'sdictionary of the fungi, 8 thed .International Mycological Institute, Egham. Unitted. Kingdom.

Hazalin Nurul AMN., Kalavathy Ramasamy, Siong Siong Meng Lim, Ibtisam Abdul Wahab, Anthony LJ Cole and Abu Bakar Abdul Majeed. (2009).Cytotoxic and antibacterialactivities of endophyticfungiisolatedfrom plants at the National Park, Pahang, Malaysia. 10.1186/1472-6882-9-46

Référence bibliographiques

Houvenaeghel, M. (1992). Les aminosides. In *Antibiothérapie en réanimation et chirurgie*, Arnette Blackwell : 15-25.

Hugues F. (2008). *Pasteur le Mag*, N° 5, 44pp.

Hu H., Ahn N.S. and Yang X.(2002). Ganoderma lucidum extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. *Int J Cancer*,102,250-253

I

Irobi O.N., Gbodi T.A., Moo-Young M., and Anderson W.A. (2000). Antibiotic activity of *Aspergillus quadrilineatus* extracts isolated from a nigerian cereal. *Pharmaceutical Biology*. Vol. 38, No. 1, pp. 57–60.

K

Kitouni M. (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état Microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, Algérie. 176.

Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C. & Stalpers, J.A. (2001). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*, 9th Edition. CABI Publishing.

Kumara C. G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y. V. D. and Kamal A. (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India *Journal of Medical Mycology*; 20: 283-289.

L

Latgé JP. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* Apr;12(2):310-50

Leveau J.Y. and Bouix M. (1993). Les moisissures. In *florent J Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industrielle.* (edn) Tec et Doc- Lavoisier.

Le Minor, L. and M. Véron (1989). *Bactériologie médicale, Médecine Sciences Publications* 1107 pages.

Lozniewski A., Rabaud C.(2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risque infectieux. Centre de Coordination de lutte contre les infections nosocomiales-Sud Est.

M

Mathew R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.

Madigan M.T., Martinko J.M.,(2007). *Biologie des microorganismes*. 11^{ème} édition. *Pearson Education*. Broek. France. pp. 478 ; 479.

Madki M. A., Manzoor A. S., Powar P. V. and Patil K. S. (2010). Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2: 848-858.

Maria G. L., Sridhar K. R. and Raviraja N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*; 1: 67-80.

Moroh, J. L. A. (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides (Doctoral dissertation, Brest).

Moreliere Marie (2014). Étude de la prescription d'antibiotiques par les médecins généralistes français dans les angines, les bronchites aiguës, les états fébriles et les rhinopharyngites, de 2000 à 2009. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine. universite de versailles saint-quentin-en-yvelines ufr des sciences de la sante paris – ile –de – france – ouest.

Moore J. H., Davis N.D and Diener U.L. (1972). Mellein and 4-Hydroxymelleinproduction by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Appl. Microbiol.* 23 : 1067-1072.

N

Niege A. J. C. F., Suraia S., Izabel Y. I. and Jairo K. B. (2002). The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. *Microbiol. Res.* 157, 207–211.

O

Obana, H.;Kumeda, Y. and Nishimune, T. (1995). *Aspergillus ochraceus* production of 5,6-dihydropenicillic acid in culture and foods. *Journal of Food Protection* **58**, 519-523.

P

Pamel E. V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A., Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an uhplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *MycotoxRes.* 1-11.

Pitt J.I., Hocking A.D. (1997). Fungi and food spoilage. Eds Springer

Poole K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* Jul ;56(1):20–51.

Prabavathy D. and Valli Nachiyar C., (2012). Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp isolated from *Justicia adathoda*. *Indian Journal of Science and Technology.* Vol. 5 No. 9 ISSN: 0974- 6846.

R

Reboux G. (2006). Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 46, 208-212.

Richard, J.L. ; Plattner, R.D. ; Mary, J. et Liska, S.L. (1999). The occurrence of ochratoxine A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* **146**, 99-103.

Rojas, D. K. ; Lopez, J. ; Tejada, I. ; Vazquez, V. ; Shimada, A. ; Sanchez, D. ; Ibarra, F., (2005). Impact of condensed tannins from tropical forages on *Haemonchus contortus* burdens in Mongolian gerbils and Pelibuey lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 128 (3-4) : 218-228

S

Savalle Mathilde. (2015). *Otomycoses à Aspergillus : Etude rétrospective, expérimentale in vitro et proposition d'un protocole thérapeutique.* Thèse pour le doctorat en médecine. Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen.

Scriban R. (1993). Biotechnologie. 4^{ème} édition. Technique et Documentation – Lavoisier, Paris. P: 40.

Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., et Viseur J. (1993). *Traité de pathologie végétale.* Gembloux, Belgique.

Smaoui S. (2010). *Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés.* Thèse de doctorat. Génie de procédés et environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 207p.

T

Taniwaki M.H., Pitt J.I., Teixeira A.A et Iamanaka B.T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int.J. Food. Microbiol.* 82 : 173-179

TABUC, C. (2007). *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines.* Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest

Tenstddt, D. (2010). Quiz : "Dermato-allergologie et toxiderme". In Progrès en Dermato-Allergologie Tome XVI : Strasbourg 2010, John Libbey Eurotext. 16 : 133-162.

Tortora J., Funk B.F. et Case Ch.I. (2003). *Introduction à la microbiologie,* (edn) ISBN.Canada.

Torres M., Balcells M., Sala N., Sanchis V et Canela R. (1998). Bactericidal and Fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide Science.* 53 : 9-14.

Tuomi J., Kytoviita M et Hardling R. (2001). Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos* 92 : 62-70

W

Webster J et Weber R.W.S. (2007). *Introduction to fungi.* 3rd edition. Cambridge University Press. New York, pp. 286–302

Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A. (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58 ; 1-55.

Y

Yamac, M. et Bilgili, F. (2006). Antimicrobial activities of fruit bodies and/or mycelia cultures of some mushroom isolates. *Pharmaceut. Biol.* 44 (9) : 660-667.

Z

Ziai Sophie. (2014). La résistance bactérienne aux antibiotiques : apparition et stratégies de lutte. Thèse d'exercice pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux de cultures

• Milieu PDA : (Larpent, 1997)

- Laver et couper en petits cubes 200g de pommes de terre non pelées. Les mettre dans un litre d'eau distillée et porter à l'ébullition pendant une heure. Ecraser, filtrer et compléter un litre.
- Composition du milieu finale :
- Extrait de pomme de terre 1000ml
- Glucose 20g
- Agar 20g
- Stériliser 20 minutes à 120°C.

• Czapek Yeast Extract Liquide (CYL)

- La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :
- Nitrate de sodium 2g
- Chlorure de potassium 0.5g
- Sulfate de magnésium 0.5g
- Sulfate ferreux 10 mg
- Phosphate de potassium 1g
- Saccharose 30g
- Gélose 20g
- Stériliser 20 minutes à 120°C. le pH est amené à 7. (Guiraud, 1998).

• Muller-Hinton :

- Extrait de viande de bœuf 2.0g.
- Peptone de caséine 17.5g.
- Amidon de maïs 1.5g.
- Agar 17.0g.
- Eau distillée 1000ml
- pH=7.4

- **Milieu TSA**

- Hydrolysate enzymatique de caséine 15.0g/l
- Peptone de soja 5.00g/l
- Chlorure de sodium 5.00g/l
- Agar A 12.0g/l
- pH finale : 7.3 ± 0.2

- **Milieu de Chapman (DIFCO Laboratories 1996)**

- Protéose peptone n° 3 Difco 10g
- Extrait de viande de bœuf 01g
- D.Mannitol 10g
- Chlorure de sodium 75g
- Bacto Agar 15g
- Rouge de phénol 0,025g
- pH final : 7,4

- **Gélose Hecktoen (DIFCO Laboratories 1996)**

- Protéose peptone 12g
- Extrait de levure 03g
- Sels biliaires n°3 09g
- Lactose 12g
- Saccharose 12g
- Salicine 02g
- Chlorure de Sodium 05g
- Thiosulfate de sodium 05g
- Citrate ferrique d'ammonium 1,5g
- Agar 14g
- Bleu de bromothymol 0,065g
- Fuschine 0,1g
- pH final : 7,5

- **GELOSE AU CETRIMIDE**

Ingrédients en grammes par litre d'eau distillée ou déminéralisée.

- Peptone 20,00g/l
- Chlorure de magnésium 1,40g/l
- Sulfate dipotassique 10,00g/l
- Cetrimide (cetyltrimethylammoniumbromide) 0,30g/l
- Glycérol 10 ml
- Agar 13,60g/l
- pH final: 7,2

- **Solution d'eau physiologique :**

- NaCl 9g.
- Eau distillée 1000ml.
- Stérilisation à 120 °C pendant 20mn.

- **Préparation de la solution Mc-Ferland 0.5**

Les McFarland standards (standards McFarland) servent de standards de turbidité pour préparer les suspensions de microorganismes. Le standard McFarland 0.5 est notamment utilisé lors de la préparation des inoculums bactériens pour les tests de sensibilités aux agents antimicrobiens

Sa préparation nécessite la préparation de deux solutions A et B

- **Solution A :** BaCl₂·2(H₂O) à 1% (10g/l).
- **Solution B :** H₂SO₄ à 1% (10ml/l)
- **Composition de la solution de Mc Ferland :** 0,5 ml de la solution A +99,5 ml de la solution B.

Annexe 2 : les bactéries tests

➤ *Bacillus subtilis* est un bacille à croissance lente (produisant 1×10^{12} cellules en 20h), Gram (+), aérobic, mésophile (20- 40°C), habitant commun du sol, il est connu pour sa capacité de dégradation de polysaccharide végétaux et la pectine, formant des endospores Extrêmement résistantes (Perry *et al.*, 2004).

➤ *Escherechia coli* : C'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de L'homme et de l'animal, (Kaper *et al.*, 2004), de forme non sporulée, de type aérobic facultative, généralement mobile grâce aux flagelles, sa longueur varie de 2 à 6 μm , alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 μm , *E. coli* représente la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

➤ *Staphylococcus aureus* : Ce sont des cocci Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5 μm , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes, elles sont habituellement non capsulée, ou possédant des capsules limitées, elles sont anaérobies facultatives. *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Dworkin et Falkow, 2006).

➤ *Pseudomonas aeruginosa* : Ce sont des bacilles Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles, ce type de bactérie synthétise de types principaux de pigments pyocyanine : bleue phénazine, pyoverdine: jaune vert, il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998).

➤ *Streptococcus sp* : sont des cocci à Gram positif, disposés en chaînette et capsulés. Sont des bactéries non sporulantes. Anaérobies facultatifs ou stricts, catalase négative elles sont chimio-organo-hétérotrophes. Pathogènes pour l'Homme et les animaux

- ***Klebsiella sp.*** : Sont des bactéries à Gram négatif, non mobiles, Ce sont des bactéries pathogènes pour l'homme et les animaux. Elle est impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50%) et qui causent jusqu'à 5% des infections urinaires nosocomiales. (Victoria Cano *et al*, 2009 ; Paul singleton, 1999).

Annexe 3 : la coloration de GRAM (DELARRAS ; 2007)

- Préparer un frottis de la souche test
- Recouvrir le frottis de violet de gentiane, laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau distillée
- Verser du lugol et laisser agir pendant 1 minute, rincer à l'eau distillée
- Décolorer à l'alcool à 95°, entre 15 et 30 secondes ; rincer à l'eau distillée
- Sécher au-dessus de la flamme bec Bunsen
- Observation au microscope optique à l'objectif x 100 à l'immersion

Annexe 04 : tableaux des fractions

Tableau 13 : Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus spl*

Fractions	Rapport frontal	Longueur d'onde : 254 nm	L.O : 365 nm	Lumière visible
1	0.057	Violet	Violet	Invisible
2	0.369	Jaune	Jaune	Jaune
3	0.416	Jaune	Jaune	Jaune
4	0.462	Jaune	Orange	Jaune
5	0.491	Jaune	Jaune	Jaune
6	0.526	Jaune	Jaune	Jaune
7	0.554	Jaune	Jaune	Jaune
8	0.566	Bleu	Bleu	Jaune
9	0.606	Jaune	Jaune	Jaune
10	0.647	Jaune	Jaune	Jaune
11	0.676	Bleu	Bleu	Jaune
12	0.705	Orange	Jaune	Jaune
13	0.774	Vert	Vert	Jaune
14	0.815	Invisible	Bleu	Invisible
15	0.959	Invisible	Jaune	Invisible

Tableau14: Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus sp2*

Fractions	L.O : 254 nm	L.O : 365 nm	Lumière visible :	Rf :
1	Vert	Violet	Vert	0.098
2	Orange	Invisible	Jaune	0.172
3	Orange	Invisible	Jaune	0.228
4	Violet	Violet	Jaune	0.290
5	Jaune	Invisible	Jaune	0.320
6	Jaune	Jaune	Jaune	0.339
7	Violet	Jaune	Jaune	0.351
8	Jaune	Jaune	Jaune	0.364
9	Jaune	Jaune	Jaune	0.395
10	Bleu	Violet	Jaune	0.419
11	Orange	Invisible	Jaune	0.438
12	Violet	Violet	Jaune	0.456
13	Jaune	Invisible	Jaune	0.469
14	Jaune	Marron	Jaune	0.487
15	Marron	Marron	Vert	0.506
16	Jaune	Invisible	Jaune	0.530
17	Noir	Marron	Jaune	0.543
18	Violet	Violet	Invisible	0.567
19	Jaune	Marron	Jaune	0.592
20	Orange	Marron	Vert	0.648
21	Jaune	Invisible	Vert	0.685
22	Orange	Invisible	Jaune	0.703
23	Invisible	Violet	Invisible	0.734
24	Jaune	Marron	Jaune	0.771
25	Bleu	Bleu	Invisible	0.864
26	Jaune	Invisible	Invisible	0.888
27	Violet	Violet	Invisible	0.913

28	Jaune	Marron	Jaune	0.987
----	-------	--------	-------	-------

Tableau15: Les couleurs observées et les valeurs Rf des spots séparés par la CCM d'*Aspergillus sp3*

Fractions	L.O : 254 nm	L.O : 365 nm	Lumière visible	Rf
1	Jaune	Jaune	Marron	0.019
2	Orange	Orange	Marron	0.032
3	Violet	Jaune	Marron	0.051
4	Jaune	Jaune	Marron	0.103
5	Jaune	Jaune	Marron	0.116
6	Jaune	Jaune	Marron	0.161
7	Jaune	Jaune	Invisible	0.193
8	Orange	Orange	Invisible	0.212
9	Orange	Orange	Invisible	0.238
10	Vert	Jaune	Invisible	0.283
11	Jaune	Jaune	Invisible	0.316
12	Jaune	Jaune	Invisible	0.335
13	Jaune	Jaune	Invisible	0.361
14	Orange	Orange	Invisible	0.393
15	Violet	Bleu	Jaune	0.412
16	Orange	Jaune	Jaune	0.432
17	Orange	Orange	Jaune	0.451
18	Orange	Orange	Jaune	0.477
19	Bleu	Bleu	Invisible	0.490
20	Marron	Marron	Jaune	0.509
21	Invisible	Jaune	Invisible	0.522
22	Invisible	Violet	Invisible	0.548
23	Jaune	Jaune	Invisible	0.580
24	Violet	Bleu	Invisible	0.625
25	Invisible	Orange	Invisible	0.645
26	Marron	Marron	Jaune	0.646
27	Bleu	Bleu	Invisible	0.670

28	Violet	Jaune	Invisible	0.709
29	Invisible	Jaune	Jaune	0.721
30	Orange	Orange	Jaune	0.735
31	Bleu	Bleu	Invisible	0.754
32	Invisible	Jaune	Invisible	0.888
33	Bleu	Bleu	Jaune	0.967

Thème :

Etude de quelques métabolites secondaires des souches du genre *Aspergillus* ayant une activité biologique.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et production de substances fongiques.

Résumé :

Le présent travail a été effectué dans le but d'étudier l'activité antibactérienne des métabolites bioactifs de trois souches du genre *Aspergillus* fournies par le laboratoire LaMyBAM.

La mise en évidence de cette activité a été réalisée par la technique des cylindres d'agar, vis-à-vis de six souches bactériennes dont trois à coloration Gram+ ; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, et *streptococcus sp* et trois à coloration Gram- ; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Klebsiellasp*. Les résultats montrent que les 3 souches fongiques présentent une activité antibactérienne considérable. En effet l'évaluation de cette dernière a été effectuée après une fermentation sur milieu CYL et une extraction par le chloroforme, suivant deux techniques différentes ; la technique des disques et technique des puits. Les résultats montrent que les extraits des souches fongiques ont une bonne activité inhibitrice sur la plupart des bactéries tests où *S. aureus* et *B. subtilis* sont avérées les plus sensibles, ces deux bactéries ont été utilisées pour chercher les CMI et les CMB des extraits chloroformiques, en testant 11 différentes concentrations de 0,097 à 100 mg/ml. Les résultats montrent que les valeurs de CMI sont : 50, 12.5, et 6.25 mg/ml pour les extraits chloroformiques des souches *Aspergillus sp1*, *Aspergillus sp2* et *Aspergillus sp3* respectivement. Tandis que les CMB varient entre 100 et 50 mg/ml pour les deux bactéries. La chromatographie sur couche mince des substances bioactives des 3 souches fongiques a permis de séparer plusieurs métabolites, la révélation par les différentes radiations UV et à lumière visible a montré l'apparition de 15 spots pour la souche *Aspergillus sp1*, 28 spots pour la souche *Aspergillus sp2* et 33 spots pour la souche *Aspergillus sp3*. Ces spots sont grattés pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Les résultats montrent que cinq fractions du premier extrait, trois fractions du deuxième et une fraction du troisième extrait, seulement ont présenté une activité antibactérienne contre les deux bactéries.

Mots clés : *Aspergillus*, activité antibactérienne, CMI, CMB, CCM.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LAMYBAM)

Jury d'évaluation :

Président :	Mme. LEGHLIMI Hind	M.C.Univ. Mentouri Constantine.
Reporteur :	Mme. GHORRI Sana	M.A.B Univ. Mentouri Constantine.
Examinatrice :	Mme. BENSLAMA Ouided	M.C.B univ. D'Oum El Bouaghi.
Tutrice :	Mme. BRAMKI Amina	Doctorante Univ. Mentouri Constantine.

Date de soutenance : 12/06/2017