



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي والبحث 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 والحياة

**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 :**

---

**Recherche de l'activité antibactérienne des souches du genre  
*Aspergillus***

---

**Présenté et soutenu par : M. MANSOUR Mehdi**

**Le : 13/06/2017**

**M. MAZZI Youcef**

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mme. MIHOUBI I.

Professeur - UFM Constantine

**Rapporteur :** Mme. GHORRI S.

MAB - UFM Constantine

**Examinatrice :** Mme. BENSERRADJ O.

MCB - Centre universitaire de Mila

**Tutrice :** Mlle. BRAMKI A.

Doctorante - UFM Constantine

**Année universitaire  
2016 - 2017**

# Remerciements

Nous tenons à remercier tout particulièrement, Madame GHORRI Sana Maitre assistante à l'université des Frères Mentouri Constantine, pour nous avoir fait l'honneur d'être rapporteur de notre mémoire de fin de cycle. Nous la remercions pour ses précieux conseils scientifiques, ses remarques avisées et de nous avoir souvent incités à approfondir nos réflexions méthodologiques. Elle a été rigoureuse et attentive et elle nous a fait bénéficier de ses connaissances. Pour tout cela nous lui sommes sincèrement reconnaissants.

Nos sincères remerciements vont à Madame MIHOUBI Ilhem, Professeur à l'université des Frères Mentouri Constantine. Elle nous fait l'honneur de présider ce jury. Ses compétences, ses qualités professionnelles et son sens du devoir sont des exemples à suivre.

Merci également à Madame BENSERRADJ Ouafa, Maitre de conférences au Centre Universitaire de Mila, membre du jury, d'avoir accepté d'examiner et de juger ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement Mademoiselle BRAMKI Amina, doctorante à l'université des Frères Mentouri Constantine pour le temps qu'elle nous a accordé, pour tous les conseils et les remarques qui nous ont grandement aidés pour l'élaboration de ce mémoire.

Merci au doctorant TOUMI Sadik pour son aide et sa disponibilité.

Nous tenons à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à notre formation.

# **DEDICACE**

Je dédie ce travail à mes parents et à mon frère pour leur soutien indéniable.

Mehdi Mansour

# Liste des abréviations

ATCC	American Type culture collection
DMSO	Dimethyl de sulfoxide
ERG	Entérocoques résistants aux glycopeptides
ERV	Entérocoques résistants à la vancomycine
BLSE	$\beta$ -lactamases à spectre étendu
MEB	Malt Extract Broth
LaMyBAM	Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne
MSFB	Métabolites secondaires fongiques bruts
NCCLS	National Comite for Clinical Laboratory Standard
O.M.S	Organisation Mondiale de la Santé
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PSDP	Pneumocoques de sensibilité diminuée aux pénicillines
PRP	Pneumocoques résistants aux pénicillines
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la méthicilline
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> résistantes à la vancomycine
TSA	Gélose trypticase-soja
UFC	Unité formant colonie

## Liste des Figures

**Figure 01 :** Schéma d'une tête aspergillaire (modifié d'après Chermette et Bussi ras, 1993)

**Figure 02 :** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

**Figure 03 :** Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts (MSFB)

**Figure 04 :** Aspects macroscopiques des trois souches du genre *Aspergillus*, sur milieu PDA

**Figure 05 :** Aspect microscopique d'*Aspergillus sp.*   grossissement X40

**Figure 06 :** Aspect macroscopique des bactéries test

**Figure 07 :** Aspect microscopique des bactéries test

**Figure 08 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par la technique des cylindres d'agar

**Figure 09 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par la technique des cylindres d'agar

**Figure 10 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par la technique des disques

**Figure 11 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par la technique des disques

**Figure 12 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par technique des puits

**Figure 13 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par technique des puits

**Figure 14 :** Les différentes étapes de l'extraction

**Figure 15 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp<sub>1</sub>*

**Figure 16 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp<sub>2</sub>*

**Figure 17 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp<sub>3</sub>*

**Figure 18 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp<sub>1</sub>*

**Figure 19 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp<sub>2</sub>*

**Figure 20 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp<sub>3</sub>*

# Table des matières

	Page
<b>Dédicaces</b>	
<b>Remerciements</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Liste des tableaux et figures</b>	
<b>1-Introduction</b> .....	1
<b>2-Revue bibliographique</b> .....	3
2-1 Généralités sur les mycètes .....	3
2-2-Les <i>Aspergillus</i> .....	4
2-2-1- Généralités .....	4
2-2-2- Caractères morphologiques .....	4
2-2-3- Taxonomie .....	5
2-2-4- Production des métabolites secondaires .....	5
2-3-les bactéries .....	7
2-3-1-Généralités .....	7
2-3-2-Le pouvoir pathogène .....	7
2-3-3-La résistance aux antibiotiques .....	8
2-3-4-Epidémiologie de la résistance .....	9
2-3-5-Bactéries utilisés dans les tests antibactériens .....	10
2-3-5-1-Genre <i>Bacillus</i> .....	10
2-3-5-2-Genre <i>Escherichia</i> .....	10
2-3-5-3-Genre <i>Klebsiella</i> .....	11
2-3-5-4-Genre <i>Pseudomonas</i> .....	11
2-3-5-5-Genre <i>Staphylococcus</i> .....	11
2-3-5-6-Genre <i>Streptococcus</i> .....	12
<b>3- Matériel et méthodes</b> .....	13
3-1- Réactivation des souches fongiques .....	13
3-2- Etude morphologique des souches fongiques.....	13
3-2-1- Etude macroscopique .....	13
3-2-2- Etude microscopique .....	13
3-3-Réactivation des souches bactériennes .....	14
3-4-Mise en évidence de l'activité antibactérienne .....	14
3-4-1-Préparation des bactéries tests .....	14
3-4-2 Technique des cylindres d'agar .....	14
3-4-3 Technique des disques et des puits .....	15
3-4-3-1 Fermentation .....	15
3-4-3-2 Technique des disques .....	15
3-4-3-3 Technique des puits .....	15
3-5 Choix du meilleur solvant pour l'extraction des MSFB .....	16
3-6 Choix des milieux optimum pour la production des substances à activité antibactérienne .....	16
<b>4- Résultats et Discussion</b> .....	18
4-1- Etude morphologique des souches fongiques .....	18

4-1-1- Aspect macroscopique .....	18
4-1-2-Aspect microscopique .....	19
4-2-Etude morphologique des souches bactériennes .....	20
4-2-1-Aspect macroscopique .....	20
4-2-2-Aspect microscopique .....	21
4-3- La mise en évidence de l'activité antibactérienne .....	21
4-3-1 Technique des cylindres d'agar .....	22
4-3-2 Techniques des disques et des puits .....	23
4-3-2-1 Fermentation .....	23
4-3-2-2 Technique des disques .....	23
4-3-3-3 Techniques des puits .....	25
4-4- Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les souches fongiques .....	27
4-4-1 Extraction des métabolites secondaires d' <i>Aspergillus sp</i> à partir du milieu de fermentation .....	27
4-4-2 Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques .....	28
4-5- Choix des milieux optimaux de production des substances à activité antibactérienne .....	30
<b>5- Conclusion et perspectives .....</b>	<b>34</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>35</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>40</b>
<b>Résumés.....</b>	<b>44</b>



# 1- Introduction

La découverte des premiers agents antibactériens, sulfamides en 1935, puis la pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale, avait suscité le grand espoir de voir les maladies infectieuses à jamais éradiquées, révolutionné la médecine moderne et a fortement diminué la souffrance humaine. Malheureusement, leur introduction en médecine humaine fut rapidement suivie par l'apparition de bactéries devenues résistantes (Courvalin et Philippon, 1990). La résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent, mais l'émergence de nouvelles maladies infectieuses, la réémergence de maladies infectieuses anciennes, associées à la rapidité et l'intensité croissante des voyages internationaux et du commerce constituent une menace pour la sécurité sanitaire internationale (Courvalin et TrieuCuot, 1990). L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines, et érythromycine, par ordre chronologique d'utilisation) fut suivie d'une évolution comparable. En fait, si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, surtout bactériennes, il n'en a nullement modifié la morbidité. Cet usage fréquemment abusif, est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec, pour conséquence, une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. Face à cette augmentation, le besoin de nouveaux traitements antibactériens efficaces est de plus en plus impérieux (Berger Savin, 2014).

Dans ce domaine, les champignons ont été largement étudiés. Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons (Botton *et al*, 1990). Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. En outre, les espèces du genre *Aspergillus* ont une grande importance économique, écologique et médicale. Et la production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces de ce genre a été détectée (Abu-Seidah, 2003).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à l'étude de l'activité antibactérienne de trois souches fongiques du genre *Aspergillus*. Plusieurs points sont pris en compte pour cette étude en l'occurrence :

- Etude des caractères morphologiques des trois souches fongiques.

## Introduction

---

- Mise en évidence de l'activité antibactérienne et ceci par l'utilisation de différentes techniques ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.
- Optimisation des conditions d'extraction des molécules bioactives, en testant cinq solvants de polarités différentes et quatre milieux de culture de compositions différentes.

## 2- Revue bibliographique

### 2-1-Généralités sur les mycètes

Les champignons (fungi ou mycètes) constituent un groupe d'organismes hétérotrophes ubiquistes, riche de quelques 120000 espèces, présentant des structures et des caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées, adaptés au mode de vie saprophyte, parasitaire ou symbiotique (Senalet *et al.* 1993 ; Kirk *et al.* 2001).

Les mycètes sont des microorganismes eucaryotes, aérobies strictes et rarement anaérobies (Mathew, 1995 ; Tortora *et al.*, 2003), ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement (Leveau et Bouix, 1993 ; Nicklin *et al.*, 1999). Sur le plan morphologique, le mycète est constitué d'un thalle qui forme son appareil végétatif (Hawksworth *et al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'éléments de base appelés hyphes qui forment un réseau de filaments ramifiés : le mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des mycètes, les hyphes sont divisés par des cloisons, ou septa (septum au singulier) formant des unités qui ressemblent à des cellules distinctes avec un seul noyau, on les appelle alors hyphes segmentés ou septés. Dans quelques classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas des cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyaux multiples ; ils sont appelées coénocytes (Tortora *et al.*, 2003).

Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents entourés d'une paroi cellulaire rigide formée de polymères de chitine et de polymères de la cellulose, éléments chimiques qui leur confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les mycètes sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). En effet, les mycètes se développent à pH légèrement acide (entre 3 et 7) et à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C. Cependant certaines espèces sont psychrophiles, se développant à des températures très basses (<15°C) ou même parfois négatives (Botton *et al.*, 1990 ; Guiraud, 1998 ; Tortora *et al.*, 2003).

Les champignons en générale, possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative) et la reproduction sexuée (parfaite) (Senal *et al.*, 1993). La plupart des espèces sont, en effet, capables de former des spores, soit à l'intérieur des

sporocystes (chez les champignons inférieurs et à thalle non cloisonné), soit sur des ramifications différenciées du mycélium (conidiophores) (Davet, 1996).

## **2-2-Les *Aspergillus***

### **2-2-1-Généralités**

Le genre *Aspergillus* a été reconnu comme un microorganisme en 1729 par Micheli. Il se trouve dans le monde entier et se compose de plus de 300 espèces (Balajee *et al*, 2006).

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes : on les trouve en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques en décomposition), ainsi qu'en milieu urbain (Biofarma, 2002).

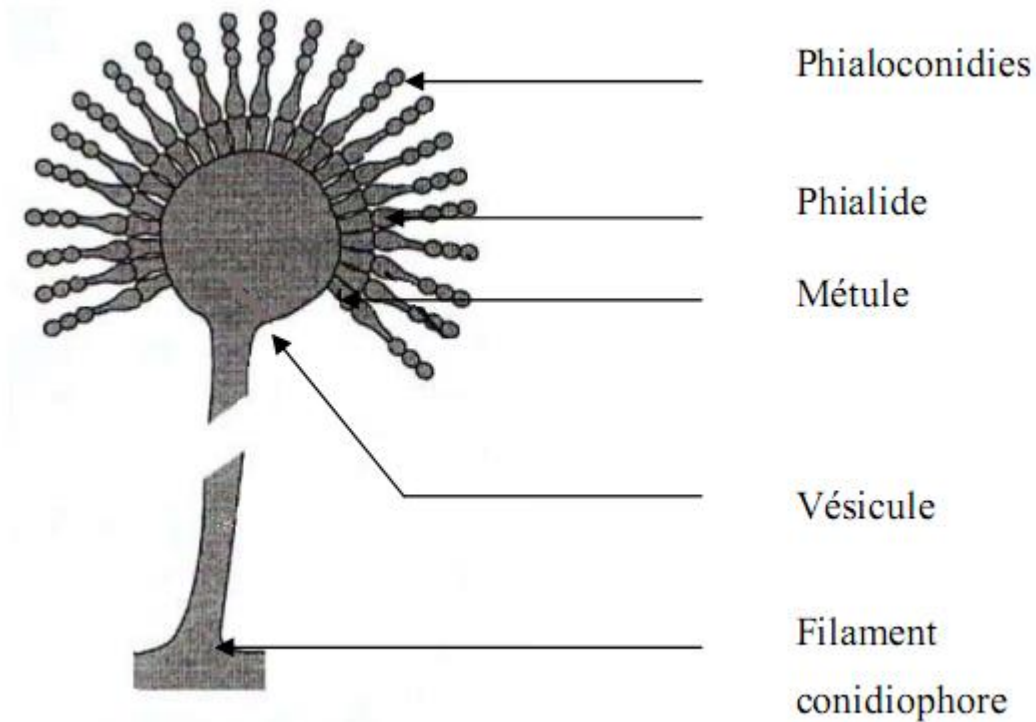
Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines. Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

### **2-2-2-Caractères morphologiques**

Les *Aspergillus* appartiennent à la classe des Ascomycètes, et sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées métules (structure bisériée).

Les phialides et les métules sont également dénommées stérigmates.

Les conidies produites en grand nombre par les phialides, donnent, à la tête conidienne, un aspect radié si les stérigmates couvrent l'ensemble de la vésicule, ou une apparence en colonne si seule la partie supérieure de celle-ci est fertile (Figure 01) (Raper et Fennell, 1965).



**Figure 01** : Schéma d'une tête aspergillaire (modifié d'après Chermette et Bussi ras, 1993)

### 2-2-3-Taxonomie

Les espèces du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des *Fungi*, à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à mycelium cloisonné (champignons septomycetes) présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores. Les *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cleistothecae ou plus rarement gymnothecae, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (Hibbett *et al.* 2007 ; Bennett, 2010).

### 2-2-4-Production des métabolites secondaires

Au cours de ces dernières années, de nombreux métabolites secondaires ont été découverts. Ce sont des molécules ayant des activités nouvelles dans divers champs d'applications : pharmacie, cosmétique, alimentation et agriculture. Ils sont utilisés en tant qu'anti-inflammatoires, hypotenseurs, anti-tumoraux, anticholest rol mique, insecticides, régulateurs de la croissance végétale ainsi qu'en tant qu'herbicides et pesticides écologiques. Ils

comprennent les acides, les alcaloïdes, les antibiotiques, les immunodépresseurs, les immunostimulants, les arômes et les enzymes (Boiron, 1996).

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du micro-organisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leurs sont propres à partir de produits du métabolisme primaire et qu'ils sont généralement produits en faible quantité (Larpent-Gourgau et Sanglier, 1992 ; Tortora *et al.*, 2003 ).

Parmi les métabolites secondaires nous pouvons citer :

- Les mycotoxines sont des produits peu volatiles, de faible poids moléculaires, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. Chaque mycotoxine n'est pas nécessairement spécifique à une moisissure donnée. La gliotoxine, par exemple, peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. De même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines ; *Aspergillus fumigatus*, agent étiologique de certaines atteintes pulmonaires, fabrique plus de huit toxines différentes (Maheux, 1998) : fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgéne, gliotoxine, acide helveolique, etc. *A.niger* fabrique l'acide oxalique, *A.versicolor* fabrique l'aspercolorine, la sterigmatocystine, la versicolorine. (Halewyn et al, 2001).
- les antibiotiques sont des substances chimiques et/ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Monilliales constituent les réservoirs les plus importants (Botton et al, 1990) par exemple *Aspergillus flavus* fabrique comme antibiotique l'acide aspergillique, *Aspergillus fumigatus* fabrique la fumagilline.



## **2-3-les bactéries**

### **2-3-1-Généralités**

Les bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve à peu près partout (ubiquitaire). Elles manifestent leur présence par les blessures qui s'infectent, le lait qui s'acidifie ou la viande qui se putréfie. Mais habituellement nous les ignorons parce que leurs activités sont moins évidentes à cause de leur petite taille. Il a fallu attendre l'apparition du microscope, au XVII<sup>e</sup> siècle, pour que l'on découvre leur existence (Paul singleton, 1999).

L'organisation cellulaire des bactéries est fondamentalement différente de celle de toutes les autres cellules vivantes : elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes. Elles ont des taux de croissance exceptionnellement courts. Elles se présentent sous des formes et des tailles diverses, génétiquement déterminées et caractéristiques de l'espèce. Cette variété morphologique est cependant marquée par trois formes principales ; cellules en bâtonnets appelées bacilles, les cellules sphériques appelées cocci, les cellules hélicoïdales spiralées appelées spirilles (cellules rigides) et spirochètes (cellules flexibles) (Bousseboua H., 2002).

### **2-3-2-Le pouvoir pathogène**

La pathogénicité est la capacité d'une bactérie, ou d'un autre agent pathogène, à produire une maladie. La maladie induite par l'agent pathogène se manifeste par l'altération de tissus ou de fonctions. Elle résulte de deux processus distincts : l'infection causée par l'invasion et la multiplication de l'agent pathogène dans les tissus, et l'intoxication provoquée par une toxine produite par l'agent pathogène (Paul singleton, 1999).

Les facteurs de virulence, ou facteurs de pathogénicité, regroupent l'ensemble des éléments qui concourent à l'apparition de la maladie. Dans l'infection, il s'agit des capacités bactériennes à adhérer, à coloniser, à envahir et à proliférer dans les tissus. Dans l'intoxication, c'est la toxine qui est le facteur de virulence puisqu'elle peut provoquer la maladie même en l'absence de l'organisme producteur, comme c'est le cas de la toxine botulinique par exemple. (Paul singleton, 1999 ; Bousseboua. H 2002).

Cette situation détermine, entre bactéries pathogènes, des degrés de virulence, en relation avec la dose infectante, c'est-à-dire le nombre moyen suffisant de bactéries pour provoquer la

maladie. Ainsi, moins de 10 bactéries, et parfois même une seule bactérie (Bourgeois CM .1990 *et al*).

Quand des bactéries pathogènes sont longtemps conservées en culture au laboratoire, sans passer par l'animal, il arrive que leur virulence baisse ou même disparaisse. Elles sont dites atténuées. Cette atténuation est due à une sélection de mutants non virulents plus aptes à la croissance. Les Bactéries atténuées sont utilisées dans la fabrication de vaccins. En effet, la perte de leur virulence ne modifie pas leurs propriétés antigéniques. Elles déclenchent donc la réponse immunitaire protectrice de l'hôte, sans provoquer la maladie. (H. Bousseboua 2002)

### **2-3-3-La résistance aux antibiotiques**

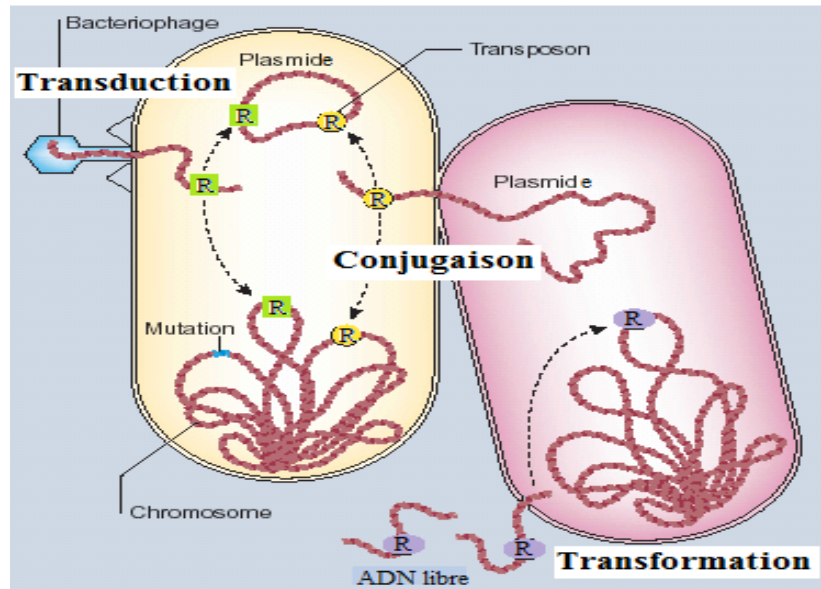
Les antibiotiques, contrairement aux antiseptiques, agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises telles que la synthèse de la paroi ( $\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine), (Normak et Normak, 2002), la réplication/transcription de l'ADN (fluoroquinolones, rifampiscine, sulfamides, triméthoprime), la synthèse protéique (aminosides, tétracyclines, macrolides et apparentés, chloramphénicol, oxazolidinones) ou encore la respiration cellulaire (polymyxines, daptomycine). Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles moléculaires spécifiques le plus souvent intracellulaires.

Des facteurs complexes déterminent l'activité intrinsèque d'un antibiotique sur une espèce donnée, notamment l'affinité de l'inhibiteur pour sa cible, le nombre de molécules-cibles à inactiver et, enfin la concentration de l'inhibiteur au voisinage de sa cible ( $C_{int}$ ). Ce dernier paramètre dépend évidemment de la concentration du produit dans le milieu où se trouve la bactérie ( $C_{ext}$ ), mais également d'autres éléments comme le niveau de perméabilité des membranes à l'agent considéré (diffusion simple ou transport actif), l'existence éventuelle de mécanismes d'inactivation ou d'activation, ou encore la présence de systèmes d'efflux actifs naturels pouvant s'opposer à son accumulation intracellulaire.

Les bactéries ont, par ailleurs, démontré leur capacité à accroître leur résistance aux antibiotiques par une multitude de mécanismes dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les produits (P. Courvalin et R. Leclercq, 2012).

L'utilisation, souvent abusive, des antibiotiques favorise l'évolution des bactéries vers la résistance entraînant fréquemment des échecs thérapeutiques. La résistance bactérienne peut être intrinsèque ou acquise. La résistance intrinsèque est spécifique de l'espèce ou du genre et définit le spectre d'activité de l'antibiotique (Normak et Normak, 2002 ; P. Courvalin et R.

Leclercq, 2012). La résistance acquise est présente seulement dans certaines souches de l'espèce ou du genre. Elle est le résultat de mutations dans un gène localisé dans le chromosome de la bactérie ou dans un plasmide ou celui de l'acquisition d'informations génétiques, principalement par conjugaison ou transformation (Goossens *et al.*, 2006 ; P. Courvalin et R. Leclercq, 2012).



**Figure 02 :** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004)

### 2-3-4-Epidémiologie de la résistance

L'utilisation fréquente des antibiotiques à l'hôpital et dans la communauté est responsable d'une pression de sélection permanente favorisant l'émergence de la résistance parmi les souches cliniques.

Les résistances s'étendent quantitativement mais aussi qualitativement. Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Aleksun et Levy, 2007). C'est le cas des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), à la vancomycine (SARV) ou de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA). C'est également le cas des souches de pneumocoques de sensibilité diminuée ou résistantes aux pénicillines (PSDP et PRP, respectivement), des souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG), des souches d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Des souches de SARM résistantes à la

daptomycine, antibiotique agréé depuis 2003, ont récemment été identifiées (Mangil *iet al.*, 2005 ; Marty *et al.*, 2006).

En Algérie, selon le dernier rapport d'évaluation délivré par le réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques avec le soutien de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le pourcentage de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM) est de 32.67%, 30.25% des entérobactéries BLSE+. En ce qui concerne les Entérocoques résistants ERV (Enterocoques Résistants à la Vancomycine), le réseau a noté huit souches d'Entérocooccus faecium porteurs du gène Van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Une étude réalisée au niveau de l'hôpital d'El koléaa montrait aussi que la fréquence de la résistance des *S.aureus* à la penicilne G est de (80,6 %) et à la gentamicine (61.53 %) (Boukhatem *et al.*, 2015).

### **2-3-5-Bactéries utilisés dans les tests antibactériens**

Plusieurs souches bactériennes sont utilisées pour les tests antibactériens et parmi ces souches six d'entre elles ont été choisies pour la réalisation de nos tests :

#### **2-3-5-1- *Bacillus subtilis***

Les *Bacilles* forment un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), qui sont des bâtonnets (souvent 0.5–1.5 x 2–6 µm de diamètre). Habituellement mobiles, aérobies ou anaérobies facultatifs, selon les espèces, avec un métabolisme respiratoire ou facultativement fermentatif. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries en cas de conditions favorables. Les *Bacillus* sont hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol où certaines espèces ont un rôle dans le cycle du carbone et de l'azote. On peut trouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires. Certaines espèces peuvent être pathogènes pour l'Homme et d'autres animaux (y compris des insectes) (Paul singleton, 1999).

#### **2-3-5-2- *Escherichia coli***

Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, c'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'Homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles (flagellés péritriches), (Paul singleton, 1999). Sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, c'est

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).

### **2-3-5-3-Klebsiella pneumoniae**

Le genre *Klebsiella* (klebsielles) comporte cinq espèces dont l'espèce-type est *Klebsiella pneumoniae* (Famille des *Enterobacteriaceae*), qui est la plus fréquente des bactéries à Gram négatif. Non mobiles, cette bactérie se trouve notamment dans le sol, dans les eaux, et comme parasites, parfois pathogènes chez l'Homme et chez d'autres animaux. Elle est impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50%) et qui cause jusqu'à 5% des infections urinaires nosocomiales. (Victoria Cano *et al*, 2009 ; Paul singleton, 1999).

### **2-3-5-4 –Pseudomonas aeruginosa**

Ce sont des bacilles à Gram négatif, de forme non sporulée, elles sont aérobies, mobiles grâce à la présence de 1 à 2 flagelles (habituellement polaires et non gainés) (Paul singleton, 1999). Ce type de bactéries synthétise deux types principaux de pigments : pyocyanine (bleue phénazine) et pyoverdine (jaune vert). Il s'agit de bactéries résistantes pour plusieurs antibiotiques (Percival, 2004).

*Pseudomonas aeruginosa* peut être impliquée dans des infections communautaires et c'est l'une des bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales. À elle seule, elle représente environ 90% de tous les *Pseudomonas sp*, isolées au laboratoire.

Cette espèce 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).

### **2-3-5-5-Staphylococcus aureus**

Bactéries appartenant à la famille des Micrococcaceae (les staphylocoques), ce sont des cocci (forme arrondie) à 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 capsulées, ou possédant des capsules limitées. Non mobiles, elles sont anaérobies facultatives (Paul singleton, 1999). *Staphylococcus aureus* représente l'agent commun des infections postopératoires de blessures, endocardite aiguë, intoxication alimentaire (Dworkin et Falkow, 2006).

Les staphylocoques sont des bactéries qui colonisent très largement la peau et les muqueuses (couche de cellules recouvrant l'intérieur des organes creux). Ils sont responsables d'infections diverses superficielles ou profondes, mais également d'intoxications et d'infections urinaires (Paul singleton, 1999).

### **2-3-5-6-*Streptococcus sp***

*Streptococcus sp*, sont des bactéries appartenant au genre *Streptococcus*. Il s'agit de cocci à Gram Positif se présentant sous forme de chaînettes (habituellement 1 µm de diamètre) non sporulantes avec une capsule souvent présente. Anaérobies facultatifs ou stricts, catalase-négatifs elles sont chimio-organo-hétérotrophes. Leurs métabolismes sont habituellement fermentatifs, et pathogènes chez l'Homme et chez d'autres animaux.

Sur gélose au sang, elles développent une large zone d'hémolyse complète (hémolyse de type bêta). Ce sont donc des streptocoques bêta-hémolytiques. Dans les produits pathologiques, elles peuvent avoir une capsule ou non.

La majorité des pathologies liées aux streptocoques β-hémolytiques est due aux streptocoques du groupe A. Les streptocoques des groupes C (*Streptococcus dysgalactiae*) et G (*Streptococcus anginosus*) peuvent aussi entraîner des infections similaires (Paul singleton, 1999).

### 3- Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne de trois souches du genre *Aspergillus* vis-à-vis de six souches bactériennes dont quatre souches ATCC (l'American Type Culture Collection), et deux souches cliniques.

Elles sont constituées de bactéries de coloration de Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus sp*) et de bactéries de coloration de Gram- (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae*).

Ces microorganismes (champignons et bactéries) sont fournis par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'Université des Frères Mentouri Constantine.

### **3-1-Réactivation des souches fongiques**

La réactivation des souches a été effectuée sur gélose PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe1), à pH neutre, à partir d'une culture pure initialement stockée à -20°C. Puis l'incubation a été faite à 28°C pendant sept jours.

### **3-2- Etude morphologique des souches fongiques**

L'identification des souches fongiques (*Aspergillus sp*<sub>1</sub>, *Aspergillus sp*<sub>2</sub>, *Aspergillus sp*<sub>3</sub>), repose d'une part, sur une observation macroscopique en déterminant les critères morphologiques obtenus des colonies pures et, d'autre part, sur une étude microscopique en observant le mycélium, la fructification, les spores et d'autres critères.

#### **3-2-1- Etude macroscopique**

L'étude macroscopique a été effectuée sur des souches fongiques sur milieu PDA préalablement ensemencées par piqure centrale et incubées pendant une semaine, à 28°C. Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons, plusieurs aspects de l'appareil végétatif sont observés en se basant sur les critères de la forme, la couleur, la taille, le contour, la texture et le diamètre des colonies.

#### **3-2-2 Etude microscopique**

La technique du scotch permet de révéler la présence du thalle, sa nature septée ou non septée, la nature de sa reproduction, sexuée ou végétative, ainsi que les caractéristiques des fructifications des conidiospores et des spores (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).



### **3-3-Réactivation des souches bactériennes**

La réactivation des souches bactériennes a été effectuée par ensemencement sur des milieux sélectifs. La vérification de la pureté des souches tests a été réalisée par observation microscopique et macroscopique sur milieux sélectifs : Chapman (*S. aureus*), Hecktoen (*K. pneumoniae*, *E.coli*), gélose au cétrimide (*P. aeruginosa*) et la gélose Trypcase-soja (*B. subtilis*, *Streptococcus sp*). La composition de ces milieux est décrite dans l'annexe.

### **3-4- Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques étudiées est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Pour évaluer cette activité, trois techniques ont été choisies : technique des cylindres d'agar (contacte directe entre le champignon et la bactérie), technique des disques et technique des puits (en testant le filtrat brute de la fermentation).

#### **3-4-1 Préparation des bactéries tests**

Les tests antibactériens doivent être réalisés à partir de cultures jeunes (18 à 24 heures), en phase de croissance exponentielle. L'opacité de la suspension bactérienne dans l'eau physiologique (0.9% NaCl) stérile, doit être équivalente à 0.5 Mc Farland, de concentration bactérienne estimée à  $10^6$  UFC/ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Isu et Onyeagba, 2002).

L'activité inhibitrice se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C.

#### **3-4-2 Technique des cylindres d'agar**

Les souches fongiques ont été ensemencées sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) (annexe1). Après 14 jours d'incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6mm de diamètre ont été perforés à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencés par écouvillonnage selon la technique du NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standard) par les bactéries tests. Les boites de pétri portant les cylindres d'agar sont placées à 4°C, pendant 4 heures, pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives élaborées par les souches fongiques, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures (Gungi *et al.*, 1983 ; Madigan *et al*, 1997).

### **3-4-3 Techniques des disques et des puits**

Ces deux techniques consistent à étudier l'effet des métabolites secondaires des souches fongiques diffusés dans un milieu de fermentation liquide.

#### **3-4-3-1 Fermentation**

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971). Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est le PDB (Potatoes dextrose broth) (annexe). Des flacons de 250 ml, contenant 100ml du milieu de culture, ont été inoculés par quatre disques de culture âgée de sept jours pour chaque souche, et incubées à 28°C pendant 14 jours. Après fermentation, et afin de tester l'activité antibactérienne des surnageants des cultures, les contenus des flacons de fermentation ont été filtrés à travers du papier Whatman N°1, afin de séparer le mycélium du milieu de culture supposant contenir les molécules bioactives. Le surnageant, ainsi obtenu, a été filtré à travers des filtres millipores stériles de 25µm de diamètre pour le stériliser.

#### **3-4-3-2 Technique des disques**

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne (voir 2-4-1) a servi àensemencer uniformément toute la surface de la boîte de gélose Mueller - Hinton. Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman imbibés avec 10µl de l'extrait à tester, sont séchés et déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont incubées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2H pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives, puis placées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (Hazline *et al.*, 2009).

#### **3-4-3-3 Technique des puits**

Des boîtes de pétri contenant une couche de gélose Mueller-Hinton d'une épaisseur de 4 mm, sont préparées avec les bactéries tests. Après un séchage de 5 min, la gélose est perforée avec un cylindre en cuivre de 3 mm de diamètre stérile. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 10µl du filtrat. Les boîtes sont ensuite laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C (Tortorano *et al.*, 1979).

### **3-5- Choix du meilleur solvant pour l'extraction des Métabolites secondaires fongiques bruts**

Cinq solvants de polarités différentes ont été testés séparément ; Chloroforme, Hexane, Méthanol, Butanol et Acétate d'éthyle pour extraire les métabolites secondaires fongiques bruts MSFB.

Après une fermentation de 14 jours (voir 2-4-3-1), un volume identique du solvant testé est ajouté dans chaque flacon contenant la culture fongique, le tout est broyé à l'aide de l'ultra-turrax, puis filtré sur papier Whatman N°1. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. L'éluant, contenant les métabolites secondaires, est recueilli puis évaporé à une température de 45°C en utilisant l'appareil rotatif évaporation sous vide. Enfin, le résidu est recueilli de nouveau à l'aide du DMSO à raison de 100 mg/ml.

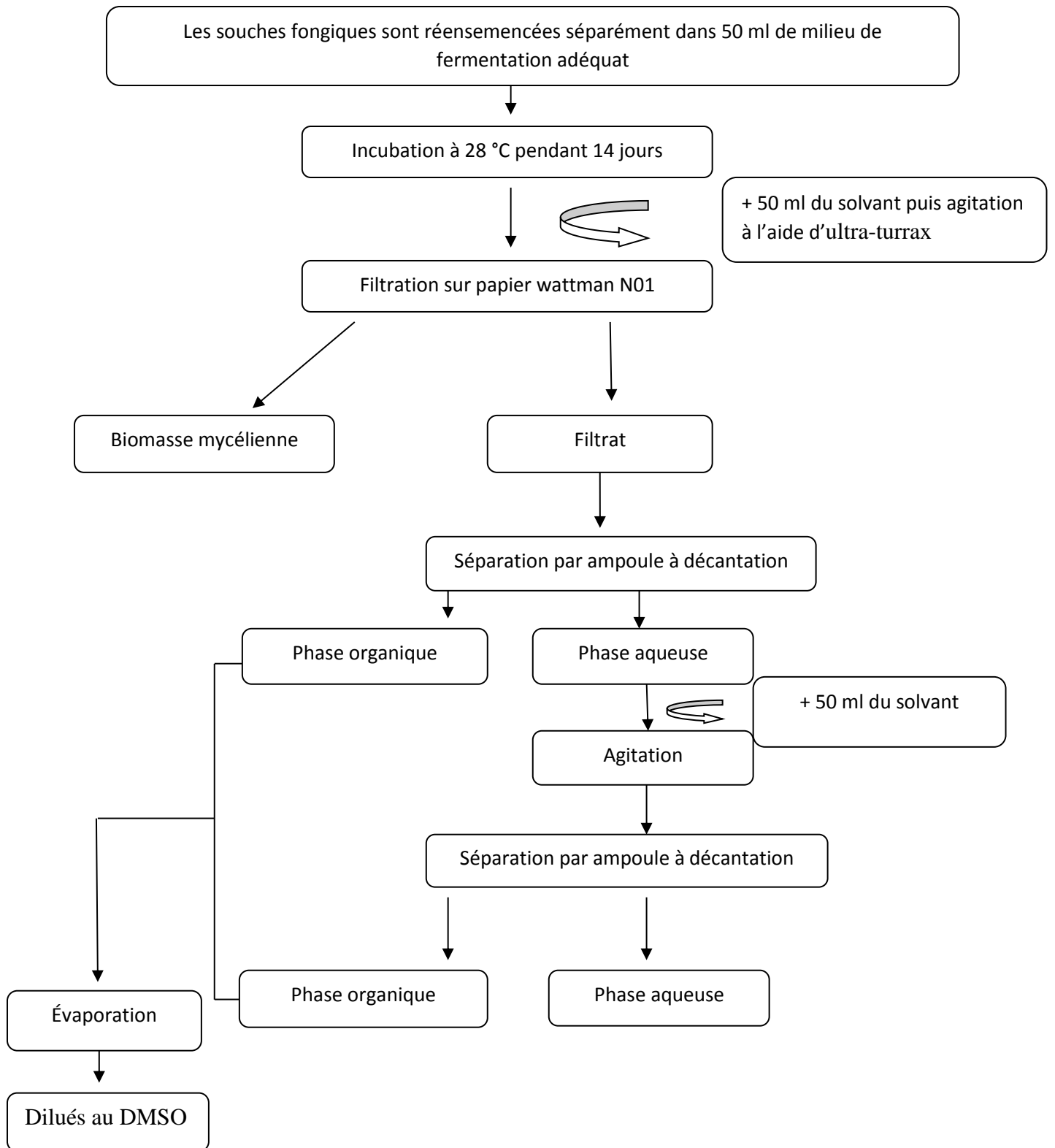
Pour évaluer l'activité antibactérienne des différents extraits organiques (méthode des disques en papier) des disques stériles non imprégnés, de 6 mm de diamètre, préparés à partir du papier Wattman N °01, reçoivent 10µl des extraits organiques. Après séchage sous courant d'air chaud, les disques sont déposés soigneusement sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les souches tests. Avant l'incubation à 37°C, les boîtes sont laissées 2 heures à + 4 °C pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives (Tortorano et al, 1979).

La lecture des résultats est faite après 18 à 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

### **3-6- Choix des milieux optimum pour la production des substances à activité antibactérienne**

Une fois le meilleur solvant choisis, quatre milieux de culture liquide de composition différente ; PDB, Sabouraud, Czapek dox et MEB préconisés pour la production de métabolites antibactériens ont été testés, afin de déterminer le milieu le plus adéquat à la production des métabolites secondaires.

La fermentation, l'extraction et le test de l'activité antibactérienne ont été réalisés par les mêmes méthodes (2-4-3-1) et les compositions de tous ces milieux ainsi que celles des milieux de culture exploités dans le test d'activité antibactérienne ont été mentionnées dans l'annexe.



**Figure 3** : Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts MSFB (Mohanta *et al.*, 2008 Barik *et al.*, 2010).

## 4- Résultats et discussions

Ce travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* fournies par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne LaMyBAM.

### 4-1-Etude morphologique des souches fongiques

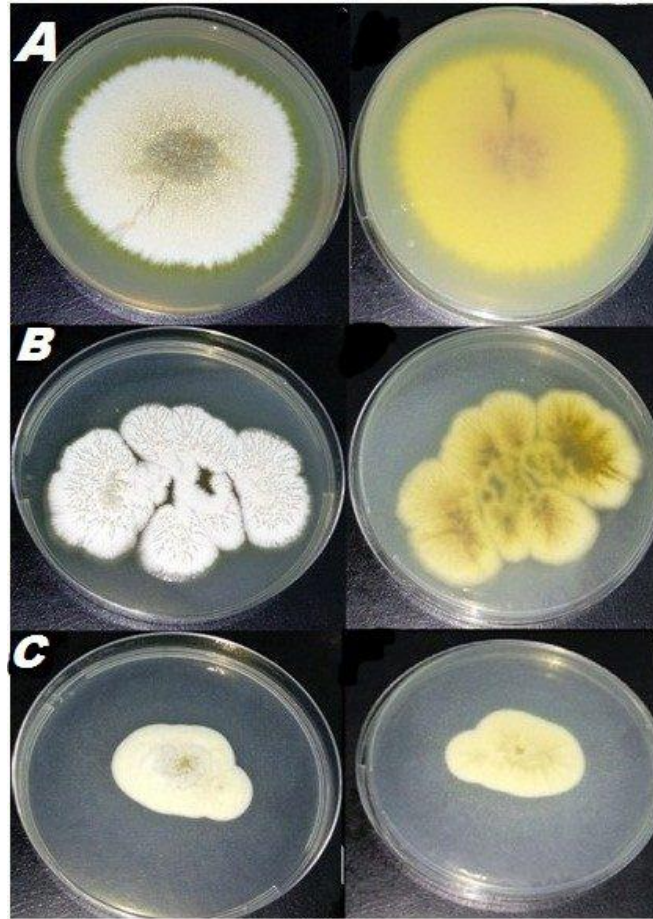
#### 4-1-1-Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des souches fongiques a été étudié après sept jours d'incubation sur milieu PDA. Aussi, passé ce délai, il a été constaté que les trois souches présentent un développement plus ou moins lent avec des différences constatées dans l'aspect macroscopique de la colonie pour chaque souche (tableau 1). Toutes les colonies se présentent sous une forme irrégulière, présentant un centre élevé, un contour blanc ou jaune et une texture duveteuse et poudreuse(Figure 1).

D'après Chermete et Bussieras en 1993, la température idéale pour le développement des souches du genre *Aspergillus* est comprise entre 22°C à 25°C. En conséquent, la couleur des colonies développent 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.

**Tableau :** Aspects macroscopiques des trois souches fongiques après sept jours d'incubation sur milieu PDA, à 28°C.

Souche	Diamètre	Aspect	Couleur / face	Couleur/ revers
<i>Aspergillus sp<sub>1</sub></i>	6,5 cm	Rond	Duveteux à poudreux, blanc avec un centre brun à beige	Jaune, tache brun au centre
<i>Aspergillus sp<sub>2</sub></i>	3,5 cm	irrégulier	Duveteux à poudreux, blanc	Jaune à brun
<i>Aspergillus sp<sub>3</sub></i>	2,88 cm	irrégulier	Duveteux à poudreux, blanc avec un centre Jaune	Blanc à Jaune



**Figure 4 :** Aspects macroscopiques des trois souches du genre *Aspergillus*, sur milieu PDA, âgées de sept jours à 28°C, (A) Face et revers d'*Aspergillus sp<sub>1</sub>* ;(B) Face et revers d'*Aspergillus sp<sub>2</sub>* (C) Face et revers d'*Aspergillus sp<sub>3</sub>*.

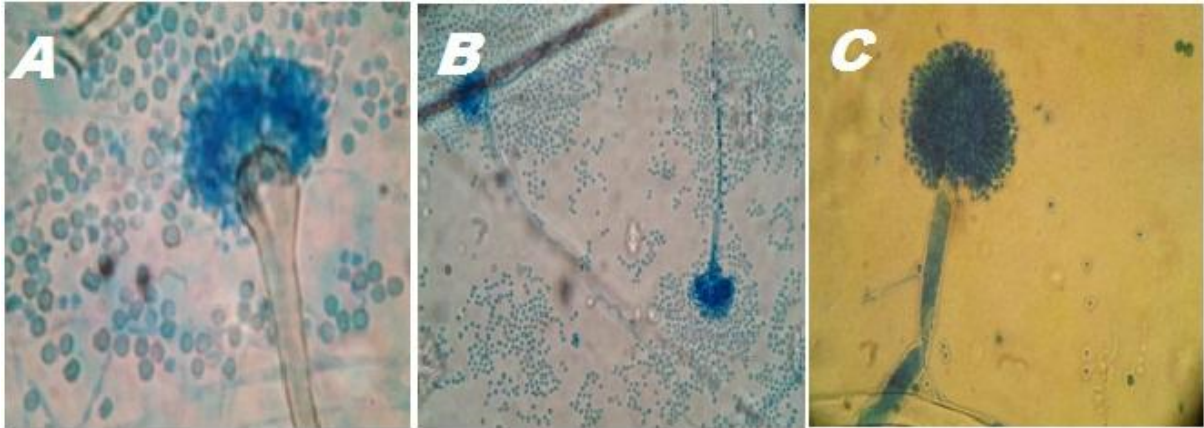
### 4-1-2-Aspect microscopique

L'étude microscopique a pour but de connaître le type du thalle, l'aspect de la tête conidienne, l'arrangement des conidies et leur forme.

L'observation a révélé que le thalle mycélien est sépté, conidiophores dressés, la tête conidienne est bisériée, les spores lisses et globuleuses (Figure2).

Ces résultats concordent avec ceux de Botton *et al.*, en 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.



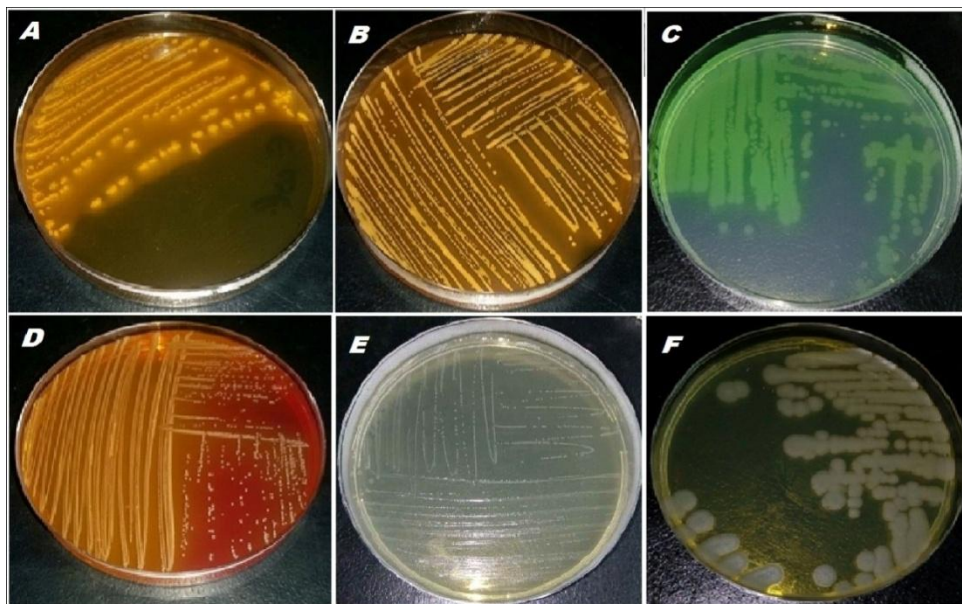


**Figure 5 :** Aspects microscopiques des trois souches du genre *Aspergillus*, au grossissement X40 : (A) *Aspergillus sp<sub>1</sub>* (B) *Aspergillus sp<sub>2</sub>* (C) *Aspergillus sp<sub>3</sub>*.

## 4-2-Étude morphologique des souches bactériennes

### 4-2-1-Aspect macroscopique

L'observation macroscopique des cultures bactérienne a été effectuée après 24h d'incubation à 37°C sur des milieux sélectifs. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation.



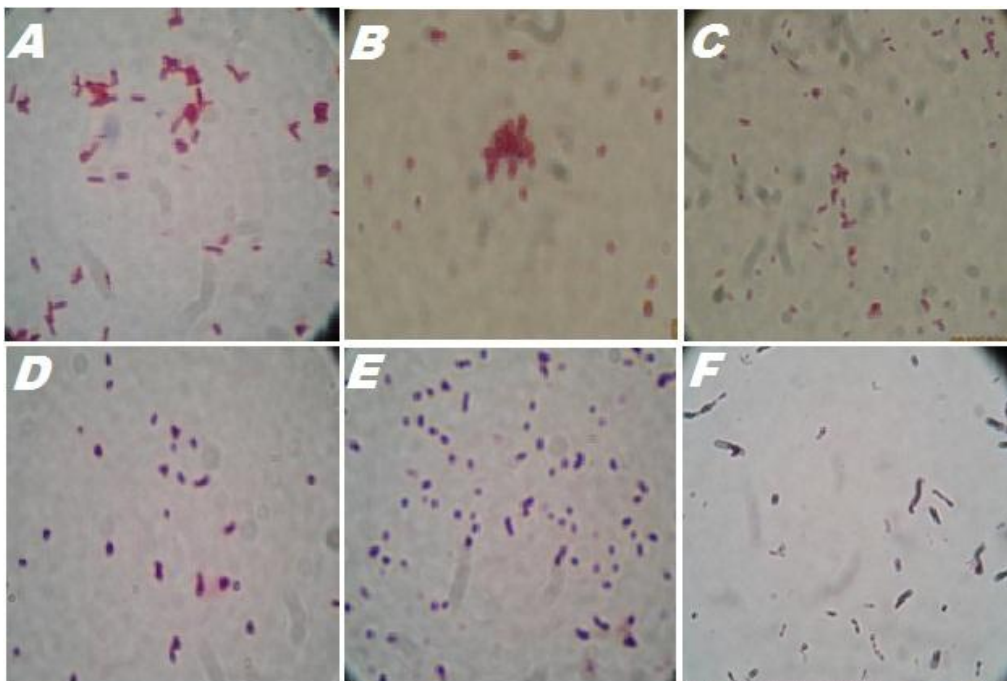
**Figure 6 :** L'aspect macroscopique des bactéries test : (A) *Escherichia coli* (B) *Klebsiella pneumoniae* ; (C) *Pseudomonas aeruginosa* (D) *Staphylococcus aureus* ; (E) *Streptococcus sp* ; (F) *Bacillus subtilis*.



On observe des colonies jaunes à jaune-saumon sur milieu Hektoen caractéristique des espèces bactériennes d'*Escherichia coli* et de *Klebsiella pneumoniae*. Des colonies pigmentées en vert pâle sur gélose au Cétrimide, sont présomptives de *Pseudomonas aeruginosa*. Des colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol + sur le milieu Chapman, sont des *Staphylococcus aureus*. Des petites colonies transparentes caractéristiques de *Streptococcus sp* et grandes colonies blanches de *Bacillus subtilis* sur gélose trypticase-soja. Ces résultats coïncident avec ceux de Delarras 2007.

### 4-2-2-Aspect microscopique

Les critères microscopiques observés ont confirmés l'identification ainsi que la pureté des souches bactériennes fournies (figure4).



**Figure 7 :** L'aspect microscopique des bactéries test :(A) *Escherichia coli* (B) *Klebsiella pneumoniae* ; (C) *Pseudomonas saeruginosa*(D) *Staphylococcus aureus* ;(E) *Streptococcus sp* ;(F) *Bacillus subtilis*.

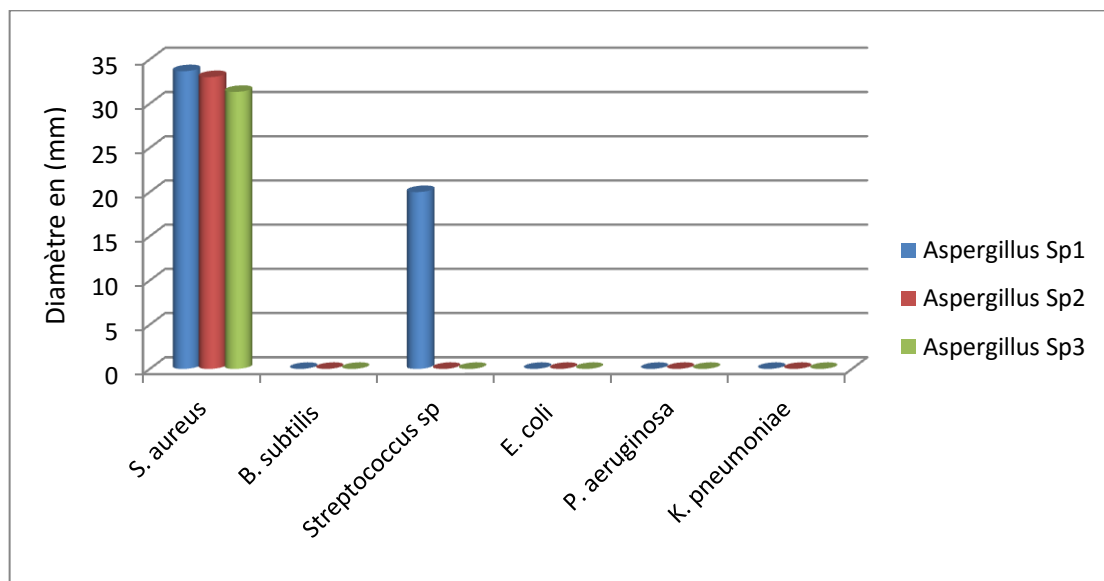
### 4-3- La mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les trois espèces fongiques ont été dépistées pour observer leur activité antibactérienne. Pour cela trois techniques ont été utilisées : la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

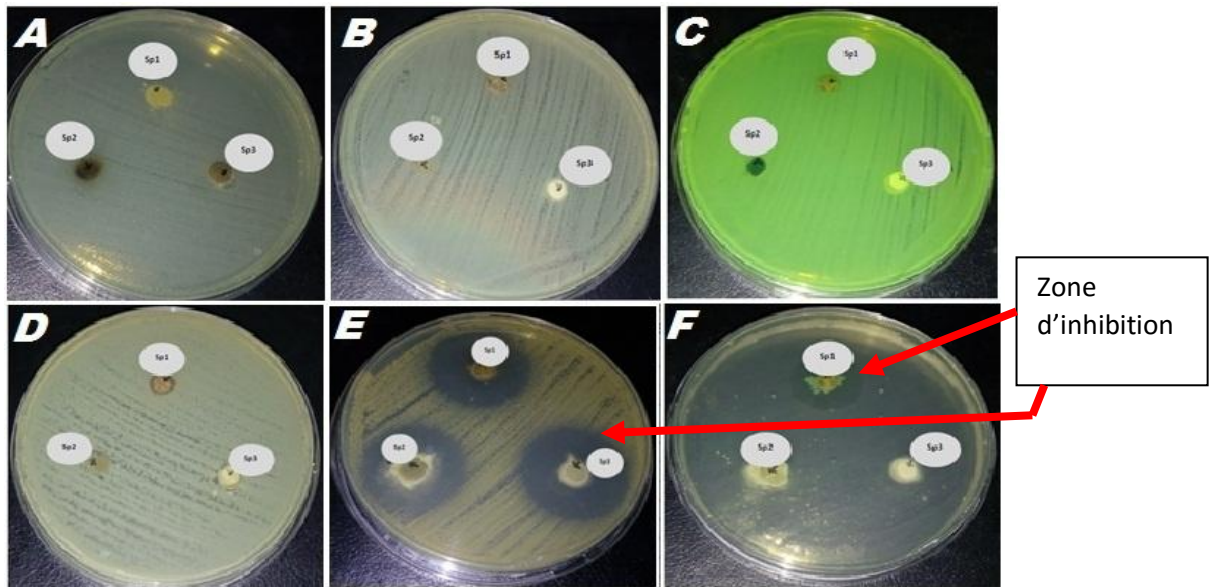
### 4-3-1 Technique des cylindres d'agar

L'apparition d'une zone translucide autour des cylindres d'agar permet, après incubation, de déceler la présence des métabolites fongiques qui inhibent la croissance des bactéries tests.

Pour cette technique, les résultats montrent que les trois espèces fongiques présentent une activité antibactérienne considérable contre la bactérie *S. aureus* (figure 09.), où les moyennes des diamètres des zones d'inhibition allaient de 31.33mm à 33.67mm. Contrairement aux autres bactéries sur lesquelles toutes les espèces fongiques n'ont eu aucun effet, la souche *Aspergillus sp<sub>1</sub>* a donné une zone d'inhibition de 20mm de diamètre avec *streptococcus sp* (figure08).



**Figure 8 :** mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par la technique des cylindres d'agar.



**Figure 9 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par la technique des cylindres d'agar :**(A)** *Escherichia coli* ; **(B)** *Klebsiella pneumoniae* ; **(C)** *Pseudomonas aeruginosa* **(D)** *Bacillus subtilis* ; **(E)** *Staphylococcus aureus* ; **(F)** *Streptococcus sp.*

### 4-3-2 Techniques des disques et des puits

Ces deux techniques consistent à étudier l'effet des métabolites secondaires des souches fongiques diffusés dans un milieu de fermentation liquide.

#### 4-3-2-1 Fermentation

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971).

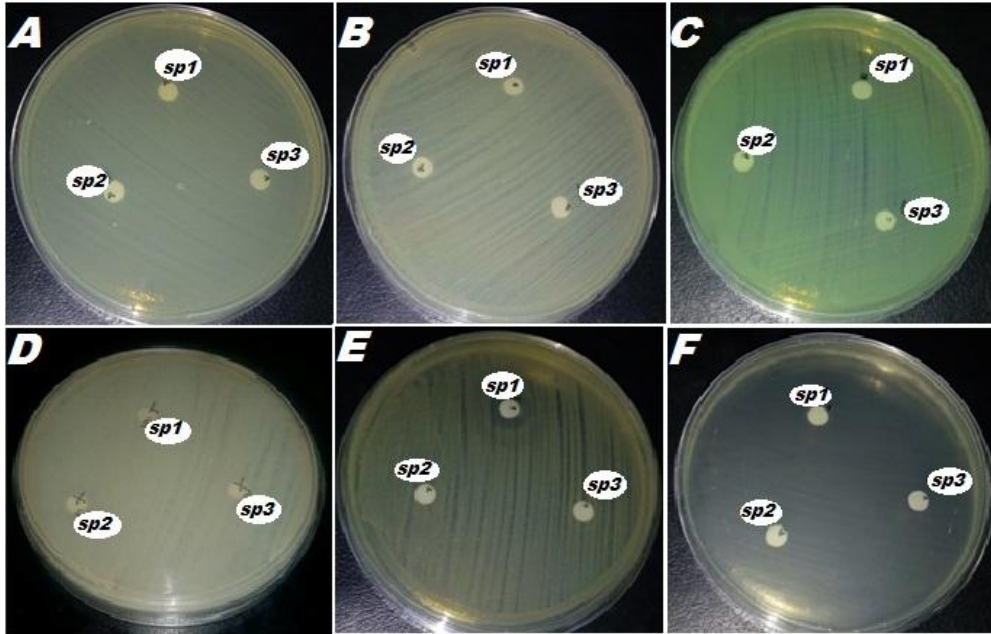
#### 4-3-2-2 Technique des disques

La sensibilité aux MSFB est déterminée selon le diamètre de la zone d'inhibition. Concernant cette technique, les résultats montrent que seulement les filtrats des souches d'*Aspergillus sp1* et d'*Aspergillus sp2* présentent une activité contre les bactéries *S. aureus* et *B. subtilis* respectivement, contrairement aux autres souches bactériennes sur lesquelles les filtrats de toutes les espèces fongiques n'ont eu aucun effet (figure 10).

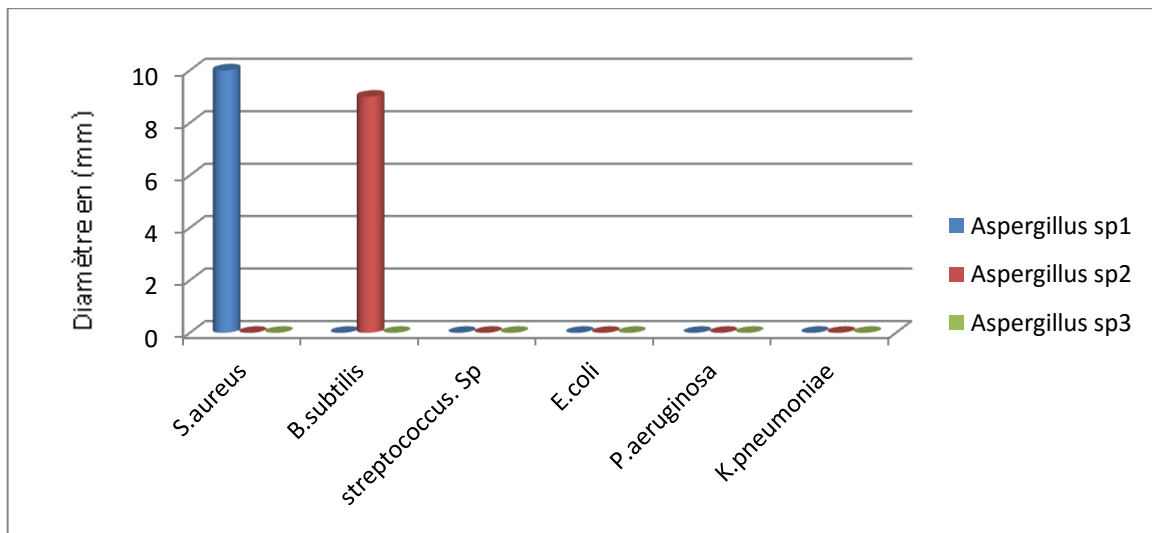
D'après les résultats mentionnés dans la figure 10, le filtrat de la souche *Aspergillus sp1* a donné une zone d'inhibition de 10mm de diamètres avec *S.aureus*, mais avec les autres bactéries tests, aucun effet n'a été observé.

## Résultats et Discussion

En ce qui concerne l'effet du filtrat de la souche *Aspergillus sp*<sub>2</sub> une zone d'inhibition de 9mm de diamètre a été observée chez *B.subtilis* tandis que chez les autres bactéries tests le filtrat n'a eu aucun effet.



**Figure 10 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par la technique des disques :(A) *Escherichia coli* ; (B) *Klebsiella pneumoniae* ; (C) *Pseudomonas aeruginosa* (D) *Bacillus subtilis* (E) *Staphylococcus aureus* ;(F) *Streptococcus sp.*

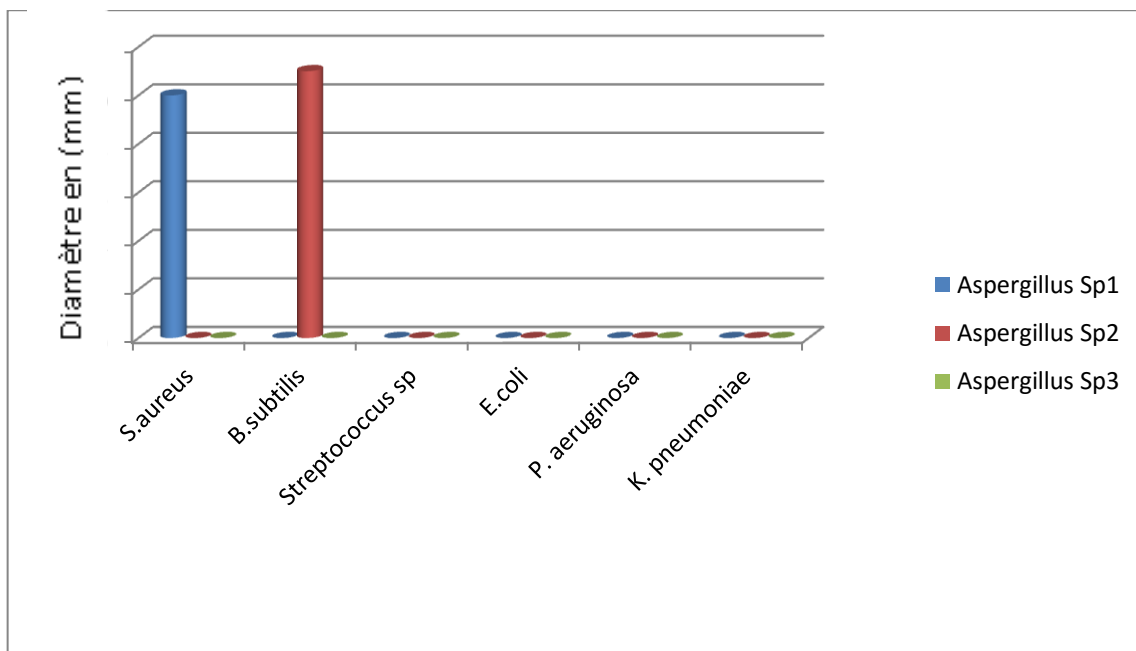


**Figure 11 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par la technique des disques.

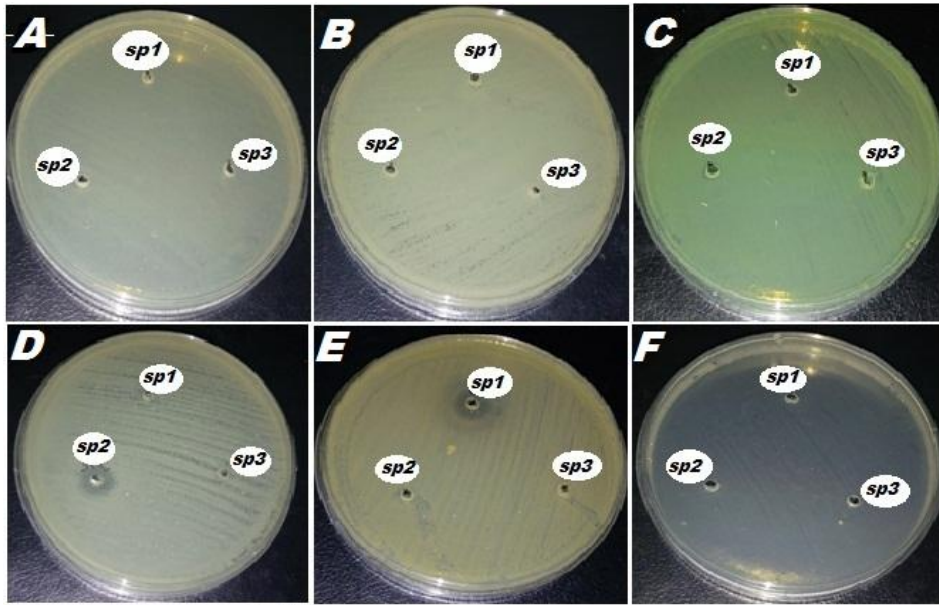
### 4-3-3-3 Techniques des puits

Pour cette technique, les résultats montrent que seuls les filtrats des deux souches *Aspergillus sp<sub>1</sub>* et *Aspergillus sp<sub>2</sub>* présentent une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *B. subtilis* respectivement.

En effet, le filtrat de la souche *Aspergillus sp<sub>1</sub>* a donné une zone d'inhibition égale à 10mm de diamètre pour *S. aureus* tandis que pour les autres bactéries tests, il n'y a pas eu de zone d'inhibition. En ce qui concerne le filtrat d'*Aspergillus sp<sub>2</sub>*, une zone d'inhibition de 11.33 mm de diamètre a été observée pour *B. subtilis* par contre avec les autres bactéries tests, le filtrat n'a eu aucun effet.



**Figure 12 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des trois souches du genre *Aspergillus* par la technique des puits.



**Figure 13 :** Activité antibactérienne des trois souches fongiques par technique des puits :**(A)** *Escherichia coli* ; **(B)** *Klebsiella pneumoniae* ; **(C)** *Pseudomonas aeruginosa* **(D)** *Bacillus- subtilis* **(E)** *Staphylococcus aureus* ; **(F)** *Streptococcus sp.*

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. En effet, ils peuvent produire des quantités impressionnantes et leurs produits peuvent avoir une grande importance (Barrios-González et Mejía, 2008 ; Botton *et al.*, 1990).

Les métabolites secondaires sont généralement produits par fermentation par un nombre limité d'organismes, principalement par les actinomycètes et les champignons, à la fin de leurs cycles de croissance, souvent pendant la phase stationnaire, et sont connues par leur effet antibactérien. (Barrios-González et Mejía, 2008 ; Botton *et al.*, 1990).

Nos résultats s'accordent avec ceux d'Abdelaziz en 2006 dont les résultats ont montré que les souches fongiques *Aspergillus flavus* et *Penicillium sp* ont eu un effet antibactérien considérable vis-à-vis de deux bactéries Gram (+) *B.subtilis* et *S. aureus*. D'autre part, les résultats de Abdulwahid *et al.*, en 2013, ont révélé que *A.niger* possédait un effet inhibiteur significatif contre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S.epidermidis*, *Bacillus sp* .

En effet, il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de ces substances (Botton *et al.*, 1990 ).



### 4-4- Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les souches fongiques

#### 4-4-1 Extraction des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971).

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, cinq solvants de polarité différente ont été testés ; le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le butanol, le méthanol et l'hexane, (Reichardt .C 1969). Après fermentation de 14 jours sur milieu PDB, le contenu de chaque flacon a subis une extraction par les solvants organiques choisis. Après ajout du solvant, le tout a été broyé, puis la biomasse formée a été éliminée par filtration, alors que le filtrat obtenu a été décanté afin de séparer la phase aqueuse de la phase organique. Cette dernière a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor à 45°C (Genganet *al.*, 1999 ; Ghorri 2015). Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 100 mg/ml.

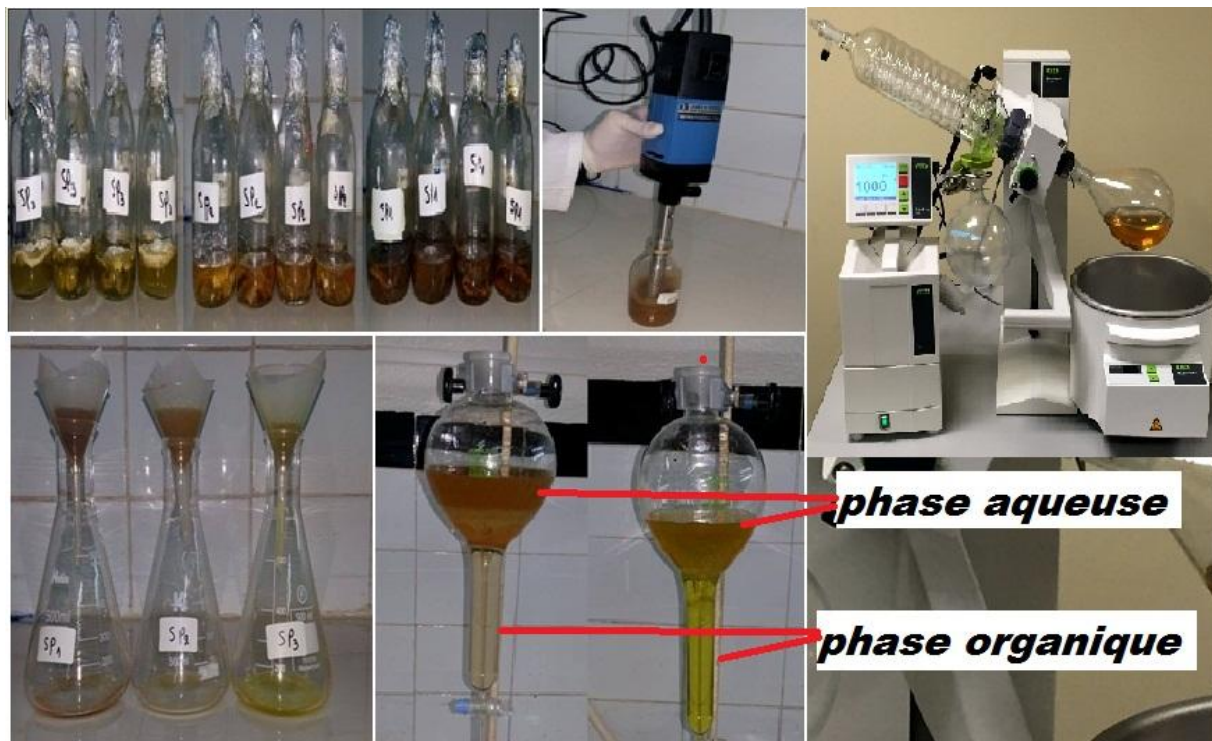


Figure 14 : Les différentes étapes d'extraction des métabolites secondaires

#### 4-4-2 Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques

Après extraction, l'effet antibactérien des extraits organiques obtenus a été testé par la technique des disques (décrite en 3-3-2-2). Cette technique a révélé que la majorité des extraits organiques présentent une activité antibactérienne sur, au moins, une des bactéries test, et que l'effet le plus considérable a été obtenu par les extraits du chloroforme surtout, et d'acétate d'éthyle, suivis par le butanol, le méthanol et l'hexane.

Concernant les extraits chloroformiques, des zones d'inhibition considérables ont été observées chez les extraits d'*Aspergillus sp*<sub>1</sub> et *sp*<sub>2</sub> avec des diamètres de 13,5 et 14mm respectivement contre la bactérie *B.subtilis*.

Les mêmes résultats ont été observés avec les extraits de l'acétate d'éthyle et du butanol de la souche *Aspergillus sp*<sub>2</sub>, où l'effet antibactérien le plus important a été obtenu contre la même bactérie *B.subtilis* avec des zones d'inhibition égales à 15 et 14mm de diamètre respectivement.

Concernant le méthanol, la zone d'inhibition la plus significative a été observée avec l'extrait d'*Aspergillus sp*<sub>1</sub> où le diamètre de la zone d'inhibition atteint 12mm contre *S.aureus*.

La même constatation a été faite par rapport au dernier solvant testé qui est l'hexane, où l'effet antibactérien le plus important a été obtenu par l'extrait de la souche *Aspergillus sp*<sub>2</sub> contre toujours la bactérie *B.subtilis* avec une zone d'inhibition égale à 8.5mm de diamètre.

On note que pour la bactérie *P.aeruginosa*, aucune activité antibactérienne des extraits organiques n'a été détectée, sauf l'extrait méthanolique de la souche *Aspergillus sp*<sub>2</sub> qui a donné un résultat positif traduit par une zone d'inhibition de 8 mm de diamètres.

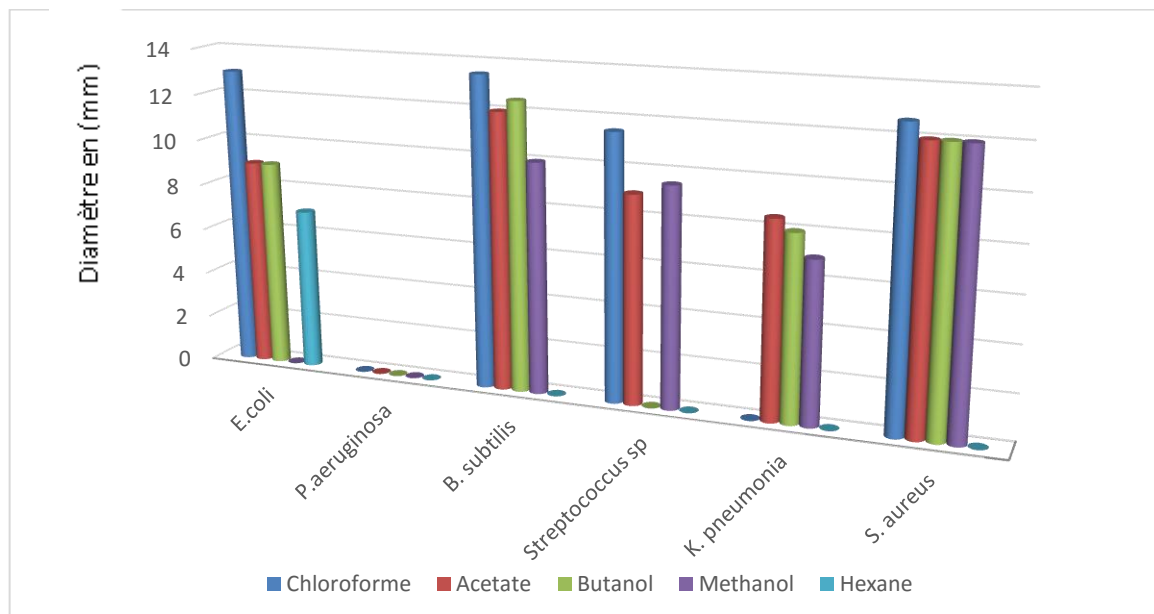
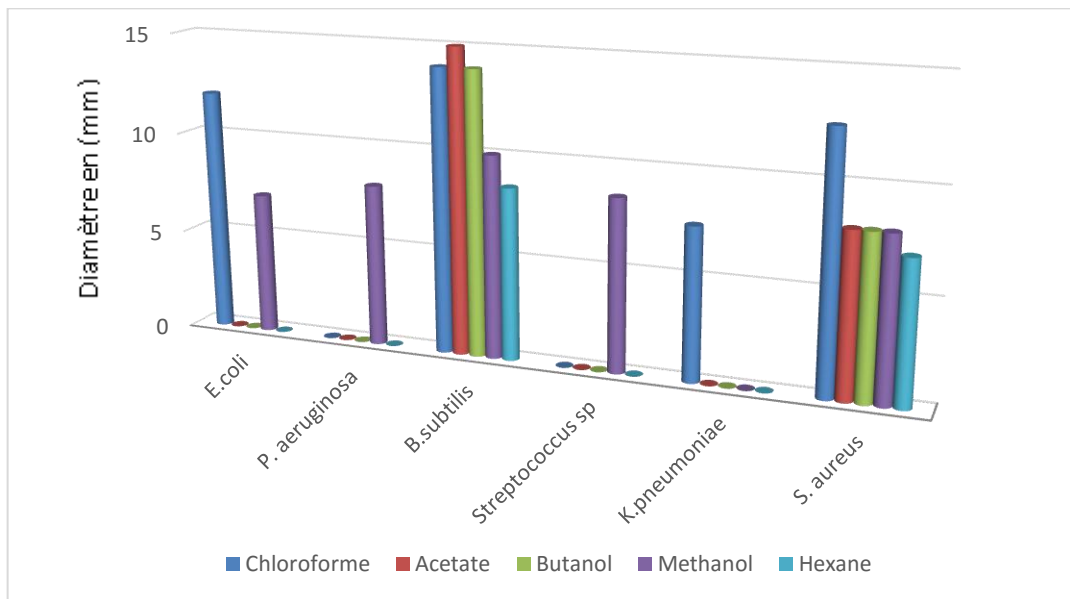


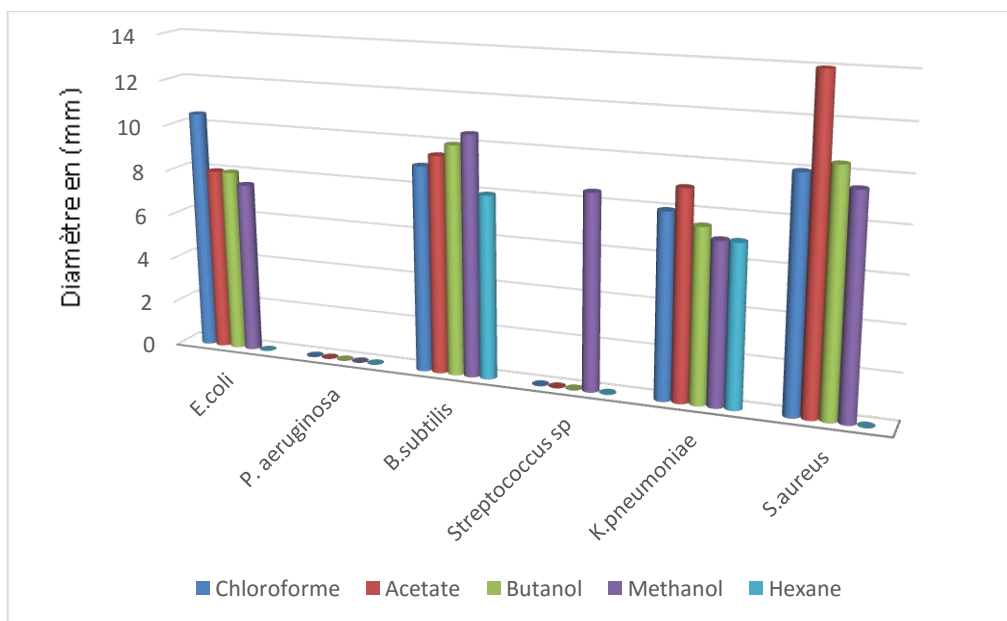
Figure 15 : Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp*<sub>1</sub>



## Résultats et Discussion



**Figure 16 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp<sub>2</sub>*



**Figure 17 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche *Aspergillus sp<sub>3</sub>*

Ces résultats font ressortir le Chloroforme comme le meilleur solvant pour l'extraction des métabolites fongiques à effet antibactérien suivi par l'Acétate d'éthyle.

le chloroforme et l'acétate éthyle sont deux solvants organiques souvent utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires à effet antibactérien (Abdelaziz, 2006, Praveena et Padmini, 2011, Prabavathy et Valli, 2012, Manila *et al.*, 2014).

Par ailleurs, nos résultats montrent que les extraits chloroformiques ont un pouvoir inhibiteur plus au moins important par rapport à ceux de l'Acétate d'éthyle.

Le chloroforme est un solvant de polarité intermédiaire (Reichardt .C 1969), cette donnée chimique nous permet de conclure que les trois souches du genre *Aspergillus* ne peuvent probablement pas produire que des molécules antibactériennes de polarité intermédiaire et d'autres de polarité élevée.

Ces résultats ont montré que le chloroforme est le meilleur solvant pour l'extraction des MSFB pour la dernière étape de notre étude.

### **4-5- Choix des milieux optimaux de production des substances à activité antibactérienne**

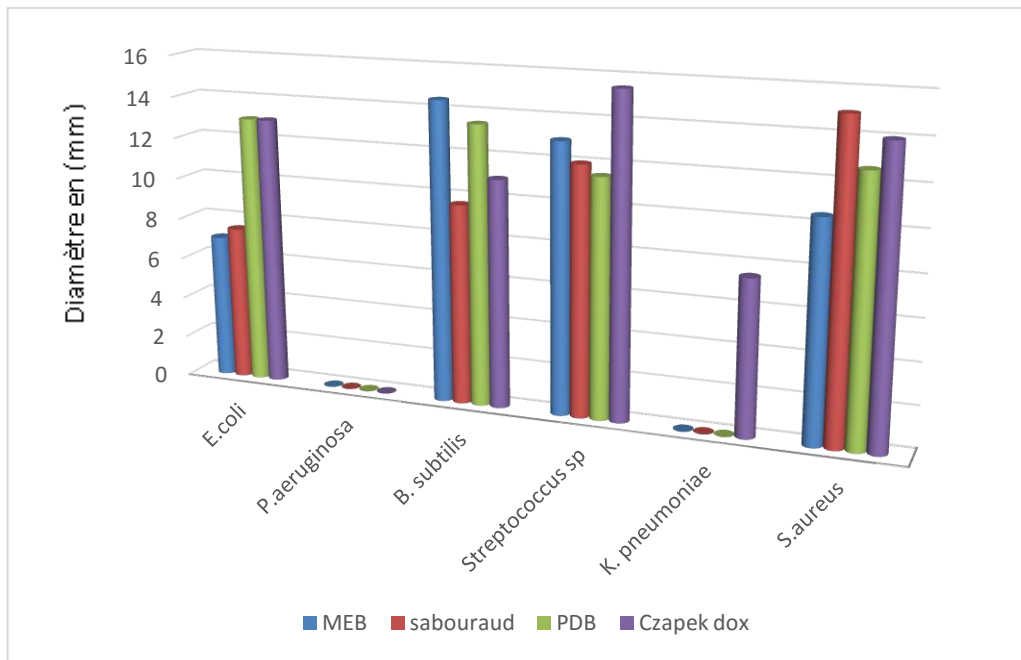
Après la sélection du meilleur solvant, quatre milieux de cultures liquides : Sabouraud, MEB, PDB, et Czapek dox, préconisés pour la production de métabolites antibactériens, ont été testés. Le test de l'activité antibactérienne a été réalisé par la technique des disques (décrite en 3-3-2-2).

Les résultats montrent que pour chaque souche du genre *Aspergillus*, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et d'une bactérie-test à une autre.

Les résultats représentés dans la figure 18 montrent que les zones d'inhibition les plus importantes sont obtenues avec les disques imprégnés des MSFB provenant du milieu Czapeck avec des diamètres de 15 mm pour *streptococcus sp.* Suivi par celle du milieu PDB et du milieu MEB avec des diamètres de 11.5 mm et 13 mm respectivement.

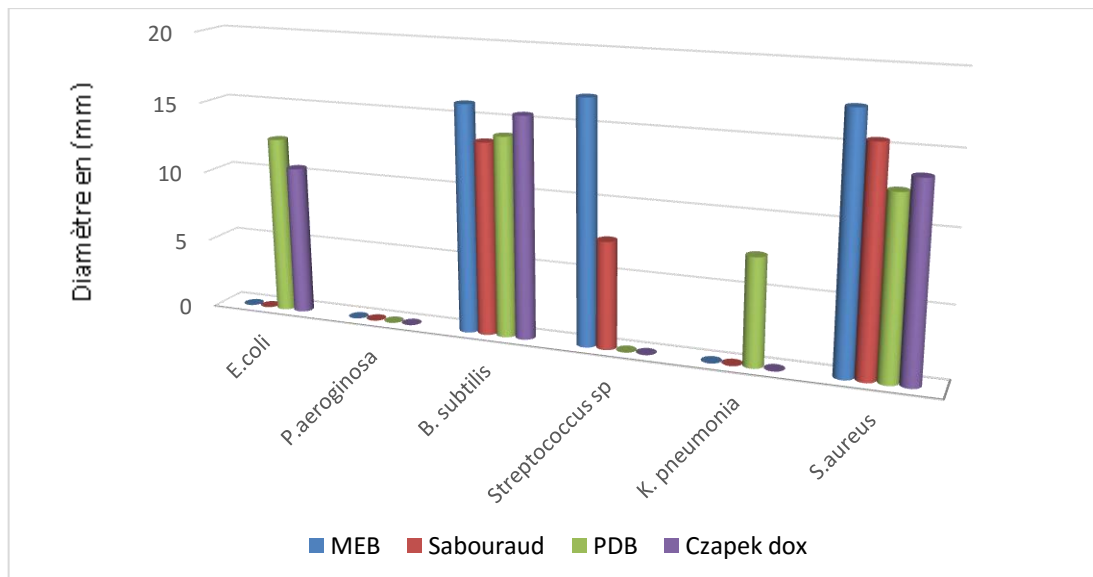
Le milieu Czapeck semble être le plus adéquat pour la production des métabolites secondaires à effet antibactérien pour *Aspergillus sp<sub>1</sub>*.

## Résultats et Discussion



**Figure 18 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp1*

Les résultats présentés dans la figure 19 font ressortir le milieu MEB comme étant le meilleur milieu de production des métabolites antibactériens pour la souche *Aspergillus sp2*, dont les meilleurs résultats sont observés chez *S.aureus* avec une zone d'inhibition de 17,5 mm suivi de *streptococcus sp* et *B.subtilis* avec des diamètres d'inhibition de 17mm et 16mm respectivement.



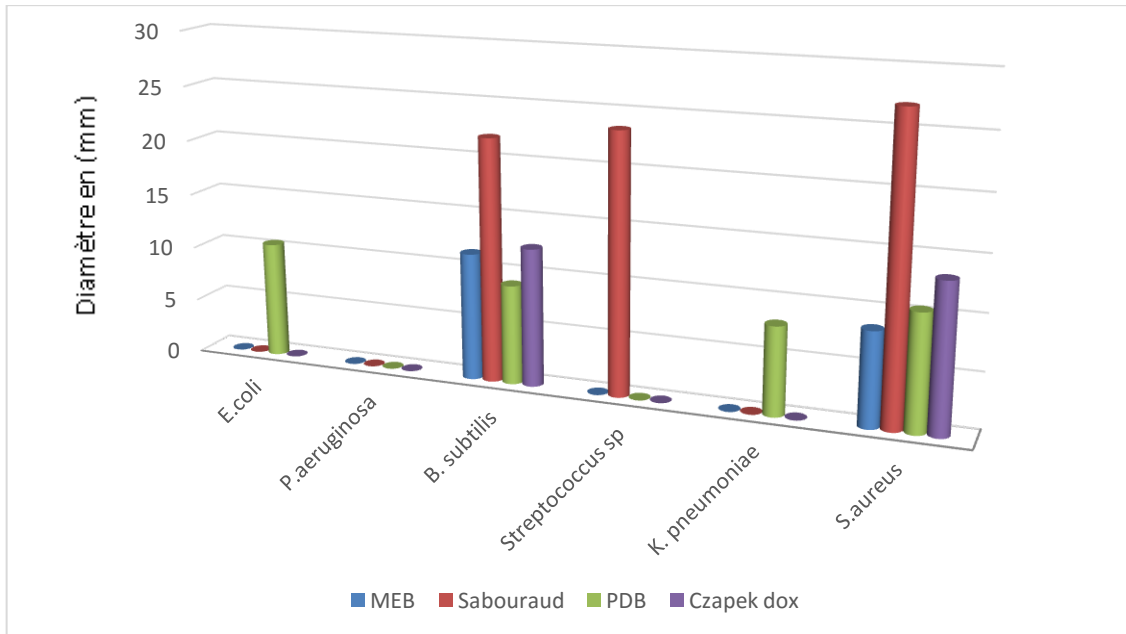
**Figure 19 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp2*.

Cependant, l'extrait de la souche *Aspergillus sp3*, développée sur milieu Sabouraud réagit différemment par rapport aux autres milieux, donnant des résultats plus distincts.

## Résultats et Discussion

En effet, des diamètres plus au moins importants de 27mm, 23,5 mm et 22 mm ont été observés pour *S.aureus*, *streptococcus sp* et *B.subtilis* respectivement.

De ce fait, le meilleur milieu pour la production des métabolites à effet antibactérien pour la souche *Aspergillus sp<sub>3</sub>* est le milieu Sabouraud.



**Figure 20 :** Effet du milieu de culture sur l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus sp<sub>3</sub>*

Plusieurs travaux ont démontrés que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les Mycètes.

Les sources de carbone telles que l'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose qui révèlent une grande croissance fongique et une bonne sporulation, sont communément utilisées comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine par fermentation (Martin et Liras, 1989). En outre, des études sur l'effet de la source de carbone indiquent que la production des métabolites secondaires est régulée par le catabolisme de ce carbone, comme c'est le cas de la biosynthèse de céphalomycine (Librihi *et al.*, 1988), pénicilline, céphalosporine (Martin *et al.*, 1999), acide kojique (Rosfarizan et Ariff, 2000) et lostatine (Lai *et al.*, 2003).

Par contre, les Peptones et les sucres plus complexes comme le Galactose, la Xylose, le Mannitol et le lactose ne permettent pas une meilleure production des métabolites secondaires (Liu et Chu, 1998).

Les peptones et l'extrait de viande sont une source difficilement métabolisables, ils favorisent donc la production d'antibiotiques (Voelker et Altaba, 2001).

Par ailleurs, Boussaber *et al.* en 2012 ont montré que l'activité antibactérienne des souches d'actinomycète dépend en grande partie des bactéries-tests et de la composition des milieux de culture.

Les résultats ont révélés qu'une différence de sensibilité des espèces bactériennes a été enregistrée pour les isolats fongiques étudiés. Cette différence suggère la sensibilité des différentes bactéries aux divers composants des MSFB étudiés. Par ailleurs, *B.subtilis*, et *S.aureus* ont montré une grande sensibilité aux MSFB, suivi de *Streptococcus sp*, ces bactéries appartiennent aux groupes des bactéries à Gram positif contrairement aux bactéries à Gram négatif ; *E.coli* et *K.pneumoniae* qui ont montrés moins de sensibilité, tandis que *P.aeruginosa* s'est montrée résistante aux MSFB.

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes différent morphologiquement. Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharidique 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 elles ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Kumara *et al.*, 2010).

## 5- Conclusion et perspectives

## Conclusion et Perspectives

---

Dans le présent travail, les souches fongiques du genre *Aspergillus* ainsi que les bactéries tests ont été fournies par le Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM) de l'université des Frères Mentouri Constantine.

Les tests de la mise en évidence de l'effet antibactérien ont révélé que les trois souches fongiques montrent une activité importante vis-à-vis des bactéries test.

L'effet des extraits organiques des souches fongique, a été testé par la technique des disques imbibés. Les résultats de ce test montrent que Les extraits chloroformiques avaient plus d'effet que les autres extraits organiques.

La fermentation sur différents milieux a démontré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les Mycètes.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- La purification et l'identification des métabolites bioactifs produits par les souches du genre *Aspergillus*.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- L'étude des mécanismes de résistance de la souche *Aspergillus sp aux* conditions extrêmes.
- L'optimisation de la biosynthèse des MSFB à des fins médicale.
- La production des substances antibactériennes à l'échelle industrielle (Scall-up).

## Références bibliographiques



## Références bibliographiques

---

- Abdulwahid B. A. Al-Shaibani, Faiz I. Al-Shakarchi et Rasha S. Ameen . Extraction and Characterization of Antibacterial Compound from *Aspergillus niger*. Journal of Al-Nahrain University Vol.16 (4), December, 2013, pp.167-174
- Abdelaziz W. (2006).Isolement des mycètes producteurs des substances antibactériennes à partir des sols sahsriens.Mémoire de Magistère En Microbiologie et Biochimie Appliquées .Université Mentouri.Constantine.
- Abu-Seidah A.A. (2003). Secondary metabolites as comarkers in the taxonomy of Aspergilli. Acta.Microbiologica.Polonica. 52 : 15-23.
- Alekshun MN, Levy SB (2007) Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 128: 1037-1050
- Aharonowitz, Y., and Demain, A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*. 14: 159–164.
- Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, and K. A. Marr. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705-12.
- Barik B.P., Tayung K., Jagadev P.N. and Dutta S.K. phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences* 2010; 2:8-16.
- Berger savin M.C.E (2014) la phagotherapie: historique et potentielle utilisation contre les infections a bactéries multirésistantes, Thèse de doctorat, faculté de medecine de Créteil.
- Barrios-González J., Mejía A. (2008). Production of antibiotics and other Commercially valuable secondary metabolites. Pp. 302-336. *In* : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state Fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Bennett, J. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *In* M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*.
- BIOFAMRA. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale*. N° 25 Mars, 2002.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.
- 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.

## Références bibliographiques

---

- Boukhatem N., Ferhat M., Hadj-Mouhamed R., Lalaoui N. 2015. Prevalance and antibiotic resistance of Staphylococci isolated from Kolea hospital (Algeria). *Journal of Fundamental and applied Sciences*. 7: 260-270.
- Bourgeois CM., Mescles JF. Et Zucca J.(1990). *Microbiologie Alimentaire*. Tome1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. Technique et documentation, 1<sup>er</sup> Edition, Lavoisier, Paris.
- Boussaber E., Kadmiri I. M, Hilali L., Hilali A. 2012. Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *Science Lib Editions Mersenne*. 4 : 1-21.
- Bousseboua .H 2002 ; *Elément de microbiologie générale*, éditions de l'Université Mentouri, Constantine (Algerie).
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- Chermette R., Bussieras J. (1993). *Parasitologie vétérinaire. Mycologie*, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- Dalarras Camille.(2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire*. Lavoisier,2007. Paris.
- Davet P.(1996). *Vie microbienne du sol et production végétales*, ( edn ) INRA.Paris.
- DIFCO Laboratoires, 1996, *Industrie Agro-Alimentaire : Fiches Techniques* .USA.
- Dworkin MM and Falkow S. *Proteobacteria : Gamma subclass*. Ed. Springer, New York, NY, 2006, p. 1248.
- Feng G.H, Leonard T.J.1998. Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A.nidulans*. *Appl Environ Microbiol* 64,2275-2277.
- Goossens H, Guillemot D, Ferech M, Schlemmer B, Costers M, van Breda M, Baker LJ, Cars O, Davey PG (2006) National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol*.62: 373-379.
- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaires*, (edn) dunod .Paris.
- Halewyn M. A.,Lercterc J. M., King N., Belonger M., Legris M. and Frenett Y. 2001. Les risqué à la santé associés à la presence de moisissure en milieu intérieur (edn) Quebec. Canada.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. (1994). *Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi* , 8 th ed . International Mycological Institute,Egham.Unitted .Kingdom.

## Références bibliographiques

---

- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, et al., 2007. A higherlevel phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111:509-47.
- Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C., Egham U.K. and Stophes J.A. (2001). *Ainsworth and Bysby's Dictionary of fungi*, 9 th edn .CABI. Bioscience.UK. Center and central Bureau Voie. Ultrech. The Net.
- Kumara C. G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y. V. D. and Kamal A. Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India . *Journal of Medical Mycology* 2010; 20: 283-289
- Lai, L.T., Pan C.C. and Tzeng, B.K.( 2003). The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high-producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochem.* 38: 1317–1326.
- Larpent-Gourgaud M., Sanglier J.J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes.*Doin. Paris.
- Leveau J.Y. and BouixM. (1993). Les moisissures. In florent J Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intéret industrielle. (edn) Tec et Doc- Lavoisier.
- Levy SB, Marshall B (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
- Lui B.H, et Chu F.S. 1998. Regulation of *aflR* and its products, *aflR* associated with aflatoxin biosynthesis. *Appl environ Microbiol* 64, 3718-3723.
- Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH (2005) Daptomycin-resistant, methicillinresistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1058-1060.
- Manila Yadav, Amita Yadav, Sandeep Kumar, Dushyant Sharma, Jaya Parkash Ydav. Evaluation of in vitro antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from eugenia jambolana lam. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* Vol 6, Issue 5, 2014. ISSN- 0975-1491.
- Madigan M.T., Matinko J.M and Parker J. (1997). *Brok biology of microorganisms*,8th edn. USA.
- Marty FM, Yeh WW, Wennersten CB, Venkataraman L, Albano E, Alyea EP, Gold HS,Baden LR, Pillai SK (2006) Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* 44: 595-597.
- Maheux L .1998 Session on microbial contamination occupational and environmental health servoces agency, (edn) Health Canada .Canada.

## Références bibliographiques

---

- Mathiew R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- Martin J.F, Liras P.1989. Organisation and expression of genes involvbed in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolite. *Annu. Rev.Microbiol.*43:173-206.
- Martin J.F., Casqueiro J., Kosalkova K., Marcos A.T. and Gutiérrez A. (1999). Penicillin and cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie Leeuwenhoeck*, 75: 21–31.
- Mesbah S. 2009. Sur le front des emergences. *Medecine Tropicale*. 69: 27-32.
- Mohanta J., Tayung K. and Mohapatra U. Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology* 2008 ; 5(2).
- Nicklin J., Greame-Cook K., Paget T and Killington R. (1999). *Essentiel en microbiologie*, (edn) BERTI. Paris.
- Normak HB, Normak S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106.
- Patrice Courvalin et Roland Leclercq, 2012 ; *Antibiogramme* 3<sup>ème</sup> édition, ESKA, Paris.
- Paul singleton 1999 ; *Bactériologie*, 4<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris.
- Percival SL. *Microbiology of waterborne diseases*. Ed. Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston, 2004, p. 480.
- Pfohl- Leszkowicz, A. *Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque*. Paris : Edition Technique & Documentation, 1999. ISBN : 2-7430-0293-X.
- Prabavathy and C. Valli Nachiyar. the antimicrobial activity of *Aspergillus sp* isolated from *Justicia adathoda*. *Indian Journal of Science and Technology*. Vol. 5 No. 9 (Sep. 2012) ISSN: 0974- 6846.
- Praveena YSN and Padmini Palem PC. Antibacterial activities of mycotoxins from newly isolated filamentous fungi . *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* Page: 13 Volume: 1: Issue-1: March-May -2011. India.
- Raper, k ; Fennell, d-j. *the genus aspergillus*. baltimore: williams and wilkins editors,1965
- Reichardt Christian. 1969. *Effets de solvant en chimie organique*. traduit par Igor Tkatchenko 1971.edition flammarion sciences.Paris.
- Rosfarizan, M., and Ariff A.B.( 2000). Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 25: 20–24.

## Références bibliographiques

---

- 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.
- Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.l. (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN. Canada.
- Van Delden C. and Iglewski B. H. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 1998; 4: 551-560.
- Victoria, Cano. *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiology*. 2009.
- Voelker F. et Altaba S. 2001. Nitrogen source governs the pattern of growth and pristnamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbial* 147: 2447-2459.
- Ward O.P., Qin W.M., Dhanjoon J., Ye J., Singh A., 2006. Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 58; 1-55.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163:150-60.

## Annexe

- **Milieu Mueller-Hinton** (DIFCO Laboratories, 1996)

Le milieu de Mueller-Hinton est recommandé pour tester la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques et agents chimiothérapeutiques.

▪ Agar	17g/l
▪ Infusion de bœuf	300g /l
▪ Hydrolysate acide de caséine	17,5g/l
▪ Amidon	1,5 g/l

➤ pH final : 7,3

- **Milieu Czapek Dox**

Composition pour un litre :

▪ Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$	20g
▪ Nitrate de Sodium ( $NaNO_3$ )	02g
▪ Chlorure de potassium (KCl)	0.5g
▪ Sulfate de Magnésium ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.5g
▪ Sulfate ferreux ( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )	0.001g
▪ Phosphate de Potassium ( $K_2HPO_4$ )	1.0 g
▪ Extrait de levure en poudre	5.0 g
▪ Eau distillée	qsp 1L

➤ Ajuster le pH (6 à 7).

- **Milieu PDA (Potatoes Dextrose agar)**

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	15g

➤ Stériliser 20 minutes à 120°C.

➤ La préparation de PDB est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar. Ajuster pH (6 à 7).

- **Milieu TSA (Gélose trypticase-soja)**

Composition :

▪ Hydrolysate enzymatique de caséine	15.0g/l
--------------------------------------	---------

- Peptone de soja 5.0g/l
- Chlorure de Sodium 5.0g/l
- Agar A 12.0g/l

pH final : 7,3 ± 0,2

• **Gélose Sabouraud**

Pour 1 litre :

- Peptone 10g
- Glucose 20g
- Agar 15g

➤ La préparation pour la fermentation est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar. Ajuster le pH (6 à 7).

• **Milieu MEB (Malt Extract Broth)**

- Extrait de malt 20g
- D-glucose 20g
- Peptone 1g

➤ Ajuster le pH (6 à 7).

• **Coloration de Gram**

- Réaliser un frottis ou un étalement.
- Fixer la préparation à la flamme sans dépasser 50 - 60° (brièvement supportable à la main), ce qui les sèche puis laisser refroidir la lame.
- Immerger (ou inonder) les lames dans la solution de Cristal Violet pendant 1mm.
- Lavage à l'eau.
- Immerger (ou inonder) les lames dans du Lugol pendant 1 mn en les agitant.
- Laver à nouveau à l'eau.
- Décolorer jusqu'à disparition de la couleur violette dans l'alcool en faisant couler goutte à goutte sur la lame inclinée ou en immergeant les lames pendant une dizaine de secondes dans le décolorant.
- Lavage à l'eau.
- Contre colorer avec la solution de safranine diluée ou de fuchsine diluée pendant 20 à 30 secondes.
- Laver à l'eau et sécher à l'air ou en chauffant à 50°C. Les lames doivent être parfaitement sèches.
- Observer à l'objectif X 100, avec de l'huile à immersion.

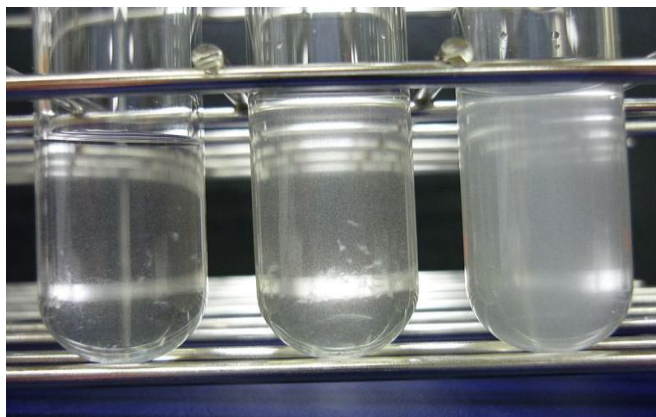
• **Solution Mc Farland 0,5 (100ml)**

En Microbiologie, les normes de McFarland sont employées comme une référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes de sorte que le nombre de bactéries soit dans une marge donnée.

Des normes originales de McFarland ont été faites par des quantités indiquées de mélange de chlorure de baryum et acide sulfurique ensemble. Le mélange des deux composés forme ensemble le sulfate de baryum précipité, ce qui cause la turbidité dans la solution. Une



concentration de 0.5 norme de McFarland est préparée en mélangeant 0.05 ml de dihydrate de chlorure du baryum 1.175% ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), avec 9.95 ml d'acide sulfurique de 1% ( $\text{H}_2\text{AINSI}_4$ ). Actuellement il y a des normes de McFarland préparées à partir des suspensions des particules de latex, ce qui rallonge la durée de conservation et la stabilité des suspensions.



McFarland standards. N° 0.5, 1 and 2.

### Conditions de conservation de la solution 0, 5 de Mc Farland (Smibert et Kreig, 1994)

1. A l'obscurité
2. Température de conservation : 20-25 °C
3. Durée de conservation : 6 mois

### • 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

**N.B.** : 500g permettent de préparer 4 litres de milieu.

### • 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
- N.B. :** 500g permettent de préparer 6,6 litres de milieu.

### • 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 (cetyltrimethylammonium bromide) 0,30g/l
  - Glycérol 10 ml
  - Agar 13,60g/l
- pH final : 7,2

**N.B.:** L'ajustement des pH des milieux de cultures, s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCL 1N selon le cas.

## Résumés

Le présent travail a été effectué dans le but d'étudier l'activité antibactérienne des métabolites secondaires secrétés par trois souches fongiques du genre *Aspergillus* (*sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub>, *sp*<sub>3</sub>). La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été faite vis-à-vis de six souches bactériennes ; trois à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus sp*) et trois à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae*) suivant trois techniques : la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits. Les résultats obtenus montrent que les trois espèces fongiques présentent une activité plus au moins considérable et que les bactéries Gram positive ont été les plus affectées où les moyennes des zones d'inhibition atteignent 33.67 mm de diamètres. Afin d'optimiser les conditions d'extraction de ces métabolites, cinq solvants de polarités différentes ont été testés ; le butanol, le chloroforme, l'hexane, le méthanol et l'acétate d'éthyle dont le chloroforme s'est avéré être le meilleur solvant. Après la sélection de ce dernier, quatre milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés ; PDB, Sabouraud, Czapek dox et MEB, dans le but étant de déterminer le milieu le plus adéquat à la production des antibactériens. Les résultats montrent que le Czapek dox, le MEB et le Sabouraud se sont avérés les milieux les plus adéquats pour les souches fongique *Aspergillus sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub> et *sp*<sub>3</sub> respectivement.

Mots clés : *Aspergillus*, Métabolites secondaires, Bactéries, Activité antibactérienne.

## Abstract

---

This research sets out to study the antibacterial activity of secondary metabolites secreted by three fungal strains of the *Aspergillus* genus (*sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub>, *sp*<sub>3</sub>). The detection of antibacterial activity was made against six 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* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae*) according to three methods, namely; the agar cylinder method, the disk method and the well method. The obtained results show that the three fungal species present a more or less significant activity and that the Gram positive were the most affected, as the zone of inhibition's average reaches 33.67 mm in diameter. In order to optimize these metabolites' extraction conditions, five polarity solvents were tested ; butanol, chloroform, hexane, methanol and ethyl acetate. Results showed that chloroform proved to be the best solvent. After the latter was selected, four growth mediums of different compositions were used: PDB, Sabouraud, Czapek dox and MEB; the purpose was to determine the most suitable medium for antibacterials' production. Results show that Czapek dox, MEB and Sabouraud proved to be the most suitable mediums for the fungal strains *Aspergillus sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub> et *sp*<sub>3</sub> respectively.

Key words: *Aspergillus*, secondary Metabolites, Bacteria, antibacterial Activity.

أُجري هذا البحث بهدف دراسة النشاط المضاد للبكتيريا، للمستقلبات الثانوية التي تفرزها ثلاث سلالات فطرية من جنس *Aspergillus* ( $sp_1, sp_2, sp_3$ ). تمت عملية الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا على ستة سلالات بكتيرية: ثلاثة منها موجبة الغرام + وهي *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 و *Bacillus subtilis* ATCC 6633 و *Streptococcus sp* وثلاثة أخرى سلبية غرام وهي *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 و *Klebsiella pneumoniae* و ذلك باستعمال ثلاث تقنيات متمثلة في: تقنية أسطوانات الأغار وتقنية الأقراص وتقنية الآبار. بينت النتائج أن الأنواع الفطرية الثلاثة شهدت وجود نشاط معتبر إلى حد ما وأن البكتيريا موجبة الغرام كانت الأكثر نشاطاً إذ وصلت معدلات قطر مناطق التثبيط إلى 33.67 ملم. من أجل تحسين شروط استخراج هذه المستقلبات, تم اختبار خمسة مذيبات ذات تقطيبات مختلفة وهي: الكحول البوتيلي والكلوروفورم وهكسان والميثانول وأسيتات الإثيل حيث تبين أن الكلوروفورم هو المذيب الأمثل. وبعد اختيار هذا الأخير، تم استعمال أربعة أوساط استنبات سائلة ذات تركيبات مختلفة وهي: Sabouraud PDB, Czapek dox و MEB إذ كان الهدف من وراء ذلك تحديد وسط الاستنبات الأمثل لإنتاج المضادات الحيوية. أظهرت النتائج أن كل من Czapek dox و MEB و Sabouraud هي المستنبات الأنسب للسلالات الفطرية *Aspergillus* ( $sp_1, sp_2, sp_3$ ). على التوالي.

الكلمات المفتاحية: فطريات *Aspergillus* ، مستقلبات ثانوية، بكتيريا، نشاط مضاد للبكتيريا.

**Thème : Recherche de l'activité antibactérienne des souches du genre *Aspergillus*.**

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 secondaires secrétés par trois souches fongiques du genre *Aspergillus* (*sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub>, *sp*<sub>3</sub>). La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été faite vis-à-vis de six souches bactériennes ; trois à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Streptococcus sp*) et trois à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiella pneumoniae*) suivant trois techniques ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits. Les résultats obtenus montrent que les trois espèces fongiques présentent une activité plus au moins considérable et que les bactéries Gram positive ont été les plus affectées où les moyennes des zones d'inhibition atteignent 33.67 mm de diamètres. Afin d'optimiser les conditions d'extraction de ces métabolites, cinq solvants de polarités différentes ont été testés ; le butanol, le chloroforme, l'hexane, le méthanol et l'acétate d'éthyle dont le chloroforme s'est avéré être le meilleur solvant. Après la sélection de ce dernier, quatre milieux de culture de compositions différentes ont été utilisés ; le Czapek dox, le MEB, le PDB, et le Sabouraud, dans le but étant de déterminer le milieu le plus adéquat à la production des antibactériens. Les résultats montrent que le Czapek dox, le MEB et le Sabouraud se sont avérés les milieux les plus adéquats pour les souches fongique *Aspergillus sp*<sub>1</sub>, *sp*<sub>2</sub> et *sp*<sub>3</sub> respectivement.

**Mots clés :** *Aspergillus*, Métabolites secondaires, Bactéries, Activité antibactérienne.

**Laboratoire de recherche :** (LaMyBAM) Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne, Université des Frères Mentouri Constantine.

**Jury d'évaluation :**

<b>Président du jury :</b>	Mme. MIHOUBI I.	Professeur - UFM Constantine
<b>Rapporteur :</b>	Mme. GHORRI S.	MAB - UFM Constantine
<b>Examinatrice :</b>	Mme. BENSARRADJ O.	MCB - Centre universitaire de Mila
<b>Tutrice :</b>	Mlle. BRAMKI A.	Doctorante - UFM Constantine

**Date de soutenance :** 13/06/2017