

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

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



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة 1
Constantine 1 - Frères Mentouri University
Université Frères Mentouri - Constantine 1

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département Biologie appliquée

قسم البيولوجيا التطبيقية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Biotechnologies

Spécialité : Biotechnologie et Contrôle Qualité

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé

Recherche et isolement des champignons à activité Béta-lactamine

par : Melissa Kadoum et Soulef Benlaib

Jury d'évaluation :

Encadreur : Pr. KACEM CHAUCHE Noredine

Université frères Mentouri Constantine 1

Président de jury : Dr. HARZALLAH Bisma

Université frères Mentouri Constantine 1

Examinatrice : Dr. MILET Asma

Université frères Mentouri Constantine 1

Tutrice : GARES Maroua

Université frères Mentouri Constantine 1

Année universitaire

2022-2023

Remerciement

Avant tout, nous remercions « Allah » le tout miséricordieux l'unique, le puissant, maître des cieux et de la terre pour nous avoir guidé, protégé, aidé et permis de mener à bien ce travail.

Nous souhaitons remercier chaleureusement notre encadreur, le Professeur *KACEM CHAOUCHE Noredinne*, pour sa précieuse guidance, son expertise et son soutien tout au long de notre recherche. Votre dévouement et votre passion pour l'enseignement ont été une source d'inspiration. Vos conseils éclairés et vos encouragements ont été déterminants dans la réalisation de ce travail de fin d'études. Nous sommes honorées d'avoir eu l'opportunité de bénéficier de votre encadrement.

Nous tenons aussi à remercier madame *BOULDJEJ Ryma* pour son effort, ainsi madame *GARES Maroua* pour ses conseils et son aide au cours de notre recherche.

J'adresse également mes sincères remerciements à la Présidente de jury Madame *HARZALLAH Besma*, ainsi qu'à l'examinatrice Madame *MILET Asma* qui ont bien voulu faire partie de cet honorable jury, et pour l'intérêt qu'elles ont porté à mon travail, en acceptant de l'examiner et de l'enrichir par leurs remarques et leurs propositions.

Mes remerciements vont ainsi à tout le personnel de la faculté des Sciences Naturelles et de la Vie (SNV) tous mes enseignants du cursus et tous les membres du Laboratoire « LaMyBAM ».

Que ces remerciements sincères témoignent de notre gratitude profonde envers chacun d'entre vous.

Votre contribution restera gravée dans nos mémoires et dans chaque réussite à venir. Merci du fond du cœur.

Dédicace

Du profond de mon cœur je dédie ce travail :

A ma chère mère :

A la prunelle de mes yeux qui représente mon paradis sur terre. A-t-elle qui est la source de ma joie et de mon bonheur. Elle représente l'espoir qui illumine mon chemin.

Nuls mots ne sauraient exprimer mon amour et ma reconnaissance envers tous les sacrifices qu'elle a consentie pour mon instruction et mon bien être

Puisse sa bénédiction m'accompagner et puisse dieu, le très haut lui accorder santé, bonheur et longévité.

A la mémoire de mon père :

A mon cher papa, parti trop tôt, qui m'a transmis sa passion du savoir et des études. A lui qui a toujours cru en moi et qui m'a poussé à donner le meilleur de moi-même.

J'espère que de là-haut, il apprécie cet humble geste comme prévu de reconnaissance de la part de sa fille qui a toujours prié pour le salut de son âme

Puisse dieu, l'accueillir dans son vaste paradis.

A mon frère

Que je remercie pour l'amour qu'il me réserve ainsi que l'aide et l'encouragement qu'il m'a toujours accordé. Je lui souhaite une vie pleine de joie de bonheur et de succès.

A tous les membres de ma grande famille, mes tantes et mes cousines.

A mes amies, au nom de l'amitié qui nous réunit et au nom de nos souvenirs inoubliables.

A tous ceux qui me sont chers.

Melissa

Dédicace

À mes chers parents, je dédie cette mémoire de fin d'études avec une profonde gratitude et un amour infini. Votre amour, votre soutien inconditionnel et vos sacrifices ont été les fondations solides de ma réussite.

Papa, tu as été mon modèle de force. Ton dévouement et tes conseils avisés ont façonné la personne que je suis devenue aujourd'hui. Tu m'as montré l'importance du travail acharné, de l'intégrité et de la détermination.

Maman, ta bienveillance, ta douceur et ton soutien constant ont été ma source d'inspiration. Tu as été ma confidente, mon roc et mon guide. Ta générosité et ton amour inconditionnel m'ont donné la force de surmonter tous les obstacles.

À mes deux merveilleuses sœurs, Nardjessa et Yasmine, cette dédicace est un témoignage de l'amour et de l'admiration que je vous porte. Vous avez été bien plus que des sœurs pour moi, vous avez été mes amies les plus proches, mes confidentes et mes inspirations.

Et enfin, à mon cher chat Bichou qui a partagé avec moi les longues heures d'étude et les moments de détente, ta présence calme et réconfortante a allégé mes journées chargées. Tes ronronnements et câlins ont apporté une douceur supplémentaire à mon parcours académique. Je t'aime mon fidèle compagnon à quatre pattes.

À vous tous, ma famille, qui m'avez soutenu de différentes manières, je vous remercie du fond du cœur. Cette mémoire de fin d'études est dédiée à notre amour, notre unité et notre bonheur partagé. Vous resterez à jamais dans mon cœur et dans chaque réussite à venir

Soulef

Table des matières

Introduction

1 Revue bibliographies	4
1.1 Généralités sur les antibiotiques	4
1.2 Action des antibiotiques sur les bactéries à gram positifs et à gram négatifs	4
1.3 Classification des antibiotiques	5
1.4 Métabolites à beta-lactames.....	7
1.4.1 Classification	7
1.4.2 Mode d'action	9
1.4.3 Biosynthèse des β -lactamines par les champignons.....	10
1.5 Procédés de production de la pénicilline	13
1.5.1 Fermentation.....	14
1.5.2 Purification	14
1.6 Champignons producteurs de métabolites d'intérêt	15
1.7 L'utilisation industrielle des champignons.....	17
1.8 Le genre <i>Penicillium</i>	18
1.8.1 Caractères macroscopiques	18
1.8.2 Morphologie microscopique	19
1.8.3 Caractères cultureux	20
1.8.4 Importance du genre <i>Penicillium</i>	21
2 Matériel et méthodes	23
2.1 Echantillonnage	23
2.2 Isolement des isolats fongiques	24
2.3 Repiquage et purification des isolats fongiques	24
2.4 Identification des isolats obtenus.....	24
2.4.1 Etude macroscopique	24
2.4.2 Etude microscopique	25

2.5	Etude des propriétés antagonistes des isolats	25
2.5.1	Test d'antagonisme et sélection des isolats producteurs d'antibiotiques	25
2.6	Production d'antibiotique	26
2.6.1	Préparation de l'inoculum	26
2.6.2	Préparation du milieu de fermentation	27
2.6.3	Inoculation et incubation	27
2.6.4	Méthode analytique « antibiogramme »	27
3	Résultats et discussion	29
3.1	Identification macroscopique	29
3.2	Identification microscopique	33
3.3	Etude de l'activité antagoniste.....	38
3.4	Production d'antibiotiques.....	40

4 Conclusion

5 Références bibliographies

Liste des abréviations

AAA	Acide amino adipique
ACV	L-a-Aminodipique acide + L-Cysteinz + L-Valine
ADN	Acide désoxyribosomique
BN	Bouillon nutritif
FMP	Milieux liquide de fermentation
GN	Gélose nutritive
G	Grossissement
H	Heurs
IPN	Iso-pénicilline N
MH	Mueller Hinton
Min	Minute
mL	Millilitre
mm	Millimètre
PBP	Protéine de liaison à la pénicilline
PDA	Potato dextrose agar
pH	Potentiel hydrogène
rpm	Rotation par minute
°C	Degré Celsius
%	Pourcentage
P/v	Masse volumique
836	Milieux gélosés de test antibiogramme
pcbAB	Gène code pour la synthèse d'ACV
penC	Gène code pour la synthèse d'IPN

Liste des figures

Figure 1 : Mécanisme d'action des antibiotiques.....	4
Figure 2 : Mécanismes d'inhibition des bêta-lactamines sur la paroi bactérienne des Gram positifs et Gram négatifs	9
Figure 3 : Super position de la structure de la pénicilline avec la structure de la D-Ala-D-Ala dipeptidase.....	10
Figure 4 : Gènes codants en <i>Penicillium chrysogenum</i>	11
Figure 5 : Formation de le tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine) (AVC)	11
Figure 6 : Formation d'iso-pénicilline N	12
Figure 7 : Biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines	13
Figure 8 : Caractères morphologique de <i>Penicillium</i>	20
Figure 9 : Aspects morphologiques des différents espèces de <i>Penicillium</i> sur des différents milieux de culture	21
Figure 10 : Différentes sources d'échantillonnage.....	23
Figure 11 : Etapes du Test d'antagonisme.	26
Figure 12 : illustration explicative du test d'antibiogramme	27
Figure 13 : Confrontation directe contre les isolats : (a) et (b) <i>Staphylococcus</i> contre <i>Penicillium</i> (Sol2), et (c) <i>Staphylococcus</i> contre <i>Penicillium</i> (OR3).....	38
Figure 14 : Résultats de préparation d'inoculum après 05 jours d'incubation (A), détachement des spores (B) et l'obtention d'une suspension sporale (C)	40
Figure 15 : Fermentation sur milieu liquide conventionnel	41
Figure 16 : Quelques boîtes de pétrie montrant d'antibiogramme après chaque 48h	41

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à gram négatifs et à gram positifs.....	5
Tableau 2 : Classification des antibiotiques.....	6
Tableau 3 : Classifications des antibiotiques de la famille des bêta-lactames.....	8
Tableau 4 : Les structures des pénicillines produites par les moisissures.....	12
Tableau 5 : Métabolites produits par les Mycètes et leurs intérêts industriels.	16
Tableau 6 : Observation macroscopique des isolats	30
Tableau 7 : Observation microscopique des isolats	34
Tableau 8 : Résultats de test d'antagonisme	39
Tableau 9 : Résultats de test d'antibiogramme	42

Introduction

Introduction

Les champignons filamenteux sont utilisés depuis plus d'un siècle comme usines cellulaires très productives. Ce sont des acteurs importants du monde microbien. Leur intérêt repose sur leurs activités biologiques dans la production d'une grande diversité de molécules synthétisées lors des métabolismes primaire et secondaire. Cette production consiste en une variété de métabolites à intérêts biotechnologiques, et sont considérés, par conséquent, comme une source majeure des pénicillines. Cette dernière représente la plus grande part dans le marché des médicaments anti-infectieux (**Domínguez-Santos et al., 2017 ; Guzmán Chávez et al., 2018 ; Xia et al., 2018**).

L'introduction des antibiotiques dans les traitements des maladies infectieuses est, sans doute, l'une des plus grandes avancées médicales du vingtième siècle. L'utilisation de ces molécules ouvert la voie à de nombreuses procédures médicales modernes, notamment les thérapies du cancer, les transplantations d'organes et la chirurgie (**Hutchings et al., 2019**).

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant, leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances (**Boughachiche et al., 2011**).

La pénicilline est le premier antibiotique qu'a été découvert par Alexander Fleming en 1928, en observant accidentellement que certaines colonies de la bactérie *Staphylococcus aureus* étaient détruites autour de la colonie de *Penicillium notatum*, ce qui a conduit à la mise en évidence de la 1^{ère} molécule de bêta-lactamine de la pénicilline (**Fleming, 1929**).

Les champignons producteurs d'antibiotiques à activité bêta-lactamines présentent un intérêt considérable dans le domaine médical. Ces micro-organismes peuvent être trouvés dans divers environnements, tels que les sols, les plantes, les débris végétaux, les habitats aquatiques et les écosystèmes marins (**Hibbett et al., 2007**).

Penicillium chrysogenum représente l'un de ces champignons. En raison de sa capacité à produire la pénicilline, le premier antibiotique antibactérien connu et décrit. Ce champignon est omniprésent dans la nature, Il se trouve, principalement, dans le sol et dans les environnements intérieurs où il est associé à la détérioration des aliments (**Erdal et Taskin 2010 ; Devi et al. 2012 ; Aitcheikh et al. 2018 ; Xia et al. 2018 ; Parussolo et al. 2019 ; Sikandar et al. 2020 ; Soliman et al. 2020**). Cependant, il est, facilement, contrôlé par des facteurs biotiques et abiotiques dans l'environnement et au cours des processus de fermentation (**Yang, 2007 ; Li et al., 2018**).

Introduction

L'espèce *P. chrysogenm* a reçu beaucoup d'attention de la part des scientifiques car, elle est, facilement, manipulable génétiquement afin d'optimiser la production des substances à l'échelle industriel (**Fierro et al., 2022**). En effet, plusieurs recherches ont démontré que cette espèce est une source de plusieurs antibiotiques β -lactames et d'autres substances bioactives ayant des effets antibactériens.

Les bêtalactamines tirent leur nom de leur structure chimique caractéristique, qui comprend un noyau bêta-lactame. Les bêtalactamines exercent leur action en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne, ce qui entraîne la lyse des bactéries sensibles. Cependant, l'utilisation généralisée des bêtalactamines a conduit à l'émergence de résistances, compromettant ainsi, leur efficacité thérapeutique (**Bush et Jacoby, 2010**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude qui a pour principaux objectifs :

- Dans un premier temps : l'isolement et le criblage de champignons producteurs à activité antibactérienne, l'accent est mis sur le genre *Penicillium* ;
- Dans un deuxième temps : l'isolat sélectionné est utilisé pour la production de pénicilline par fermentation en erlens avec l'observation de l'activité antibactérienne.

Revue
Bibliographique

1 Revue bibliographies

1.1 Généralités sur les antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances chimiques utilisées pour traiter les infections bactériennes chez les humains et les animaux. Il s'agit d'une classe de médicaments spécifiquement conçus pour combattre les bactéries, qui sont des micro-organismes responsables de diverses maladies et infections.

1.2 Action des antibiotiques sur les bactéries à gram positifs et gram négatifs

Les bactéries possèdent une structure particulière avec présence d'une paroi dont le constituant principal est le peptidoglycane (PGN). Un antibiotique idéal ne devrait pas nuire au fonctionnement normal de la cellule hôte mais devrait provoquer une inhibition du microbe cible en perturbant son métabolisme (**Chandra et Kumar, 2017**). Cette perturbation peut être une interférence ou une inhibition de n'importe quelle biomolécule tel que : enzymes, acides nucléiques, polysaccharides ou métabolites (**Figure 1**). Cependant l'utilisation excessive et inappropriée d'antibiotiques peut entraîner le développement de bactéries résistantes aux antibiotiques, qui sont devenues un problème de santé publique majeur dans le monde entier (**Ventola, 2015**)

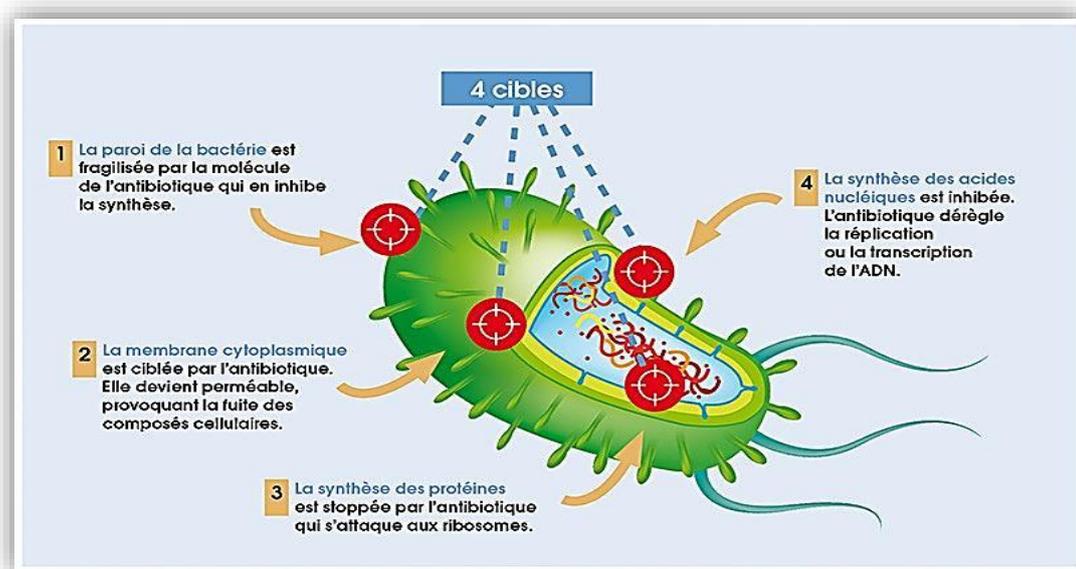


Figure 1 : Mécanisme d'action des antibiotiques
 (https://www.information-dentaire.fr/formations/evitons-l-abus-d-antibiotiques%E2%80%89/)

Revue bibliographique

La classification des bactéries entre Gram positifs et Gram négatifs (**Tableau 1**) repose sur les différences de structure et de composition de leurs parois cellulaires.

Tableau 1 : Effet des antibiotiques sur les bactéries à gram négatifs et à gram positifs (**Pandey et Cascella, 2022**)

	Gram positif	Gram négatif
Différence de structure	<ul style="list-style-type: none">• Paroi cellulaire des micro-organismes plus épais et rigides.• PGN est situé près de la surface de la cellule.• Le faible poids moléculaire β-lactame antibiotiques molécules peuvent facilement pénétrer l'extérieur couche de la membrane cytoplasmique	<ul style="list-style-type: none">• Paroi cellulaire est moins épaisse et plus complexe.• Une membrane externe couvre la couche mince PGN et une à l'intérieure, ça représente une barrière moléculaire• Les antibiotiques doivent traverser la membrane externe des bactéries et la membrane cytoplasmique et entrer dans le cytoplasme

1.3 Classification des antibiotiques

Les antibiotiques ont été classés sur la base de plusieurs critères tels que le mode d'action, l'organisme producteur et les voies de biosynthèse (**Tableau 2**) (**Hutchings et al., 2019**). Une grande majorité des antibiotiques sont produits par les microorganismes dont 55% sont des actinomycètes (**Embley et Stackebrandt, 1994**).

Revue bibliographique

Tableau 2 : Classification des antibiotiques (**Kohanski *et al.*, 2010**)

Classe	Dérivation	Type d'antibiotique	Cible principale	L'effet sur
Phénicols	Naturel ou semi-synthétique, produites par <i>S. venezuelae</i>	Inhibiteur de la synthèse des protéines	Protéine de traduction pendant l'étape d'élongation d'ADN	Quelques bactéries à Grams positif et les bactéries à Grams négatif <i>Ex S. pneumoniae</i>
Glycolipopeptides et glycolipopzptides	Naturel ou semi-synthétique	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne	Les unités de peptidoglycane	Les bactéries à Gram positifs
Lipopeptides	Naturel ou semi-synthétique	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne	Membrane cellulaire	Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif
Aminoglycosides	Naturel et semi synthétique produites par <i>Streptomyces</i>	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne	30S ribosome	Les bactéries à Gram positif aérobies et à Gram négatif
Tétracyclines	Naturel et semi synthétique produites par <i>S. rimosus</i>	Inhibiteur de la synthèse des protéines	30S ribosome	Les bactéries à Gram positif aérobies et à Gram négatif

Revue bibliographique

Macrolides	Naturel et semi synthétique produites <i>S. ambofaciens.</i>	Inhibiteur de la synthèse des protéines	50S ribosome	Les bactéries à Gram positif et à Gram négatifs aérobiques et anaérobiques
Streptogramins	Naturel et semi synthétique produites par <i>Streptomyces spp</i>	Inhibiteur de la synthèse des protéines	50S ribosome	Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif aérobiques et anaérobiques
β-lactames	Naturel et semi synthétique produites par <i>P. notatum,</i>	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne	Protéines liant la pénicilline	Les bactéries à Gram positif et à Gram négatif aérobiques et anaérobiques

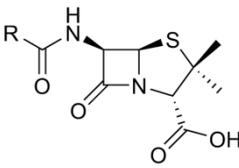
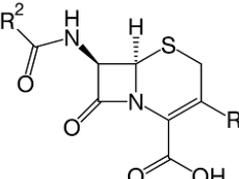
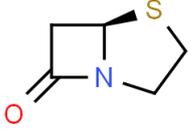
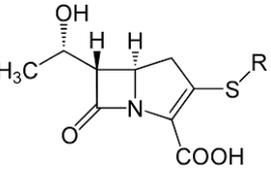
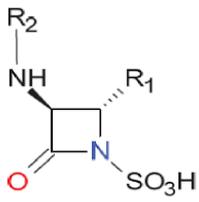
1.4 Métabolites à beta-lactames

La découverte d'antibiotiques pour usage clinique a commencé avec la découverte de l'efficacité d'un composé β-lactame et peut-être la découverte la plus importante dans l'histoire de la médecine thérapeutique (**Brakhage, 1998**).

1.4.1 Classification

Les β-lactamines représentent une grande classe des antibiotiques selon leurs structures chimiques, les lactames peuvent être classées en cinq groupes qui comprennent les dérivés de la pénicilline, les céphalosporines, les monobactames, les carbapénèmes et les inhibiteurs de la β-lactamase (**Tableau 3**). Ils sont produits naturellement par divers micro-organismes eucaryotes, tels que des champignons filamenteux du genre *Penicillium*, mais également par des bactéries du genre *Streptomycètes* (**Tahlan and Jensen, 2013**).

Tableau 3 : Classifications des antibiotiques de la famille des bêta-lactames

Groupe	Molécules	Description :	Référence
Pénicillines		<p>Molécule synthétisée par le <i>Penicillium</i>. Elles regroupent toutes les bêtalactamines possédant une structure similaire à la pénicilline G (1^{ère} génération)</p> <p>Il existe trois autres générations de pénicillines :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Methicillin 2^{ème} génération • Ampicillin 3^{ème} génération • Carbenicillin et azlocillin 4^{ème} génération 	(Ball <i>et al.</i> , 1978).
Céphalosporines		<p>Des antibiotiques structurellement similaires aux pénicillines possédant un noyau d'acide 7-aminocéphalosporanique, qui montre un large spectre d'action contre les bactéries Gram-positives et négatives.</p>	(Bryskier, 2000).
Pénèmes		<p>Le terme "pénème" est dérivé de la ressemblance structurelle avec les pénicillines et les céphalosporines. Ce type a un large spectre d'activité contre diverses bactéries, y compris les espèces à Gram positifs et à Gram négatifs.</p>	(Fernandes <i>et al.</i> , 2013)
Carbapénèmes		<p>Ce sont les antibiotiques à noyau beta-lactame présentant le spectre d'action le plus étendu. C'est pourquoi ils sont largement utilisés contre les bactéries multi-résistantes.</p>	(Papp-Wallace <i>et al.</i> , 2011)
Monobactames		<p>Les monobactames ne contiennent qu'un monocycle beta-lactame. Il est actif contre les bactéries Gram-négatives mais inefficace contre les bactéries Gram-positives, les bactéries Gram-positives et Gram-négatives à métabolisme anaérobie.</p>	(Fernandes <i>et al.</i> , 2013)

<p>Pénicillines résistantes à la Bêta-lactamase</p>		<p>Les bêta-lactamases bactériennes sont bien connues pour leur capacité à dégrader et donc à conférer une résistance aux antibiotiques bêtalactamines.</p> <p>Les bêta-lactamases sont regroupées par classe en fonction de leur homologie moléculaire. Les classes A, C et D possèdent un résidu de sérine sur leur site actif, tandis que les enzymes de la classe B ont du zinc sur leur site actif.</p>	<p>(Gao <i>et al.</i>, 2017)</p>
-----------------------------------------------------	--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------

1.4.2 Mode d'action

Les β -lactamines font partie des classes d'antibiotiques qui interfèrent avec des étapes spécifiques de la biosynthèse homéostatique de la paroi cellulaire. Un traitement réussi avec un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire peut entraîner des changements de forme et de taille des cellules, l'induction de réponses de stress cellulaire et finalement la lyse cellulaire (Kohanski *et al.*, 2010).

Les β -lactames agissent sur les parois cellulaires bactériennes en ciblant les enzymes qui sont responsables de la synthèse de la couche de peptidoglycane de la paroi cellulaire. Les enzymes ciblées par les β -lactames sont appelées protéines de liaison à la pénicilline (PBP), qui sont impliquées dans les dernières étapes de la synthèse du peptidoglycane. Les PBP catalysent la formation de liaisons peptidiques entre les chaînes glycémiqes du peptidoglycane, ce qui est nécessaire à la formation d'une paroi cellulaire forte et cohésive (Figure 2).

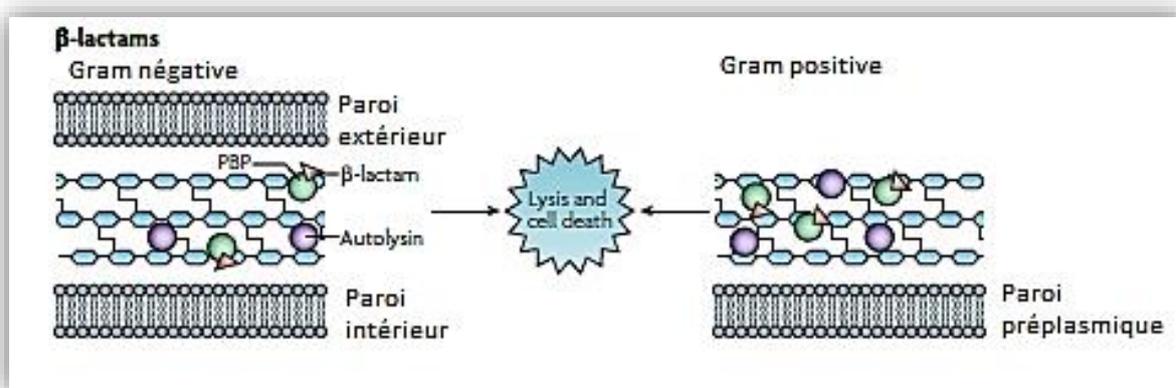


Figure 2 : Mécanismes d'inhibition des bêta-lactamines sur la paroi bactérienne des Gram positifs et Gram négatifs (Kohanski *et al.*, 2010)

Les antibiotiques β -lactames sont structurellement similaires au dipeptide D-alanine-D-alanine (**Figure 3**), qui est le composant terminal du précurseur de peptidoglycane ajouté aux chaînes glycémiqes en croissance par les PBP (**Lima et al., 2020**). Les β -lactames contiennent un anneau lactame à quatre membres qui imite le dipeptide D-alanine-D-alanine, et cette similarité structurelle permet aux bêtalactamines de se lier au site actif des PBP (**Josephine et al., 2004; Bush and Bradford, 2016**).

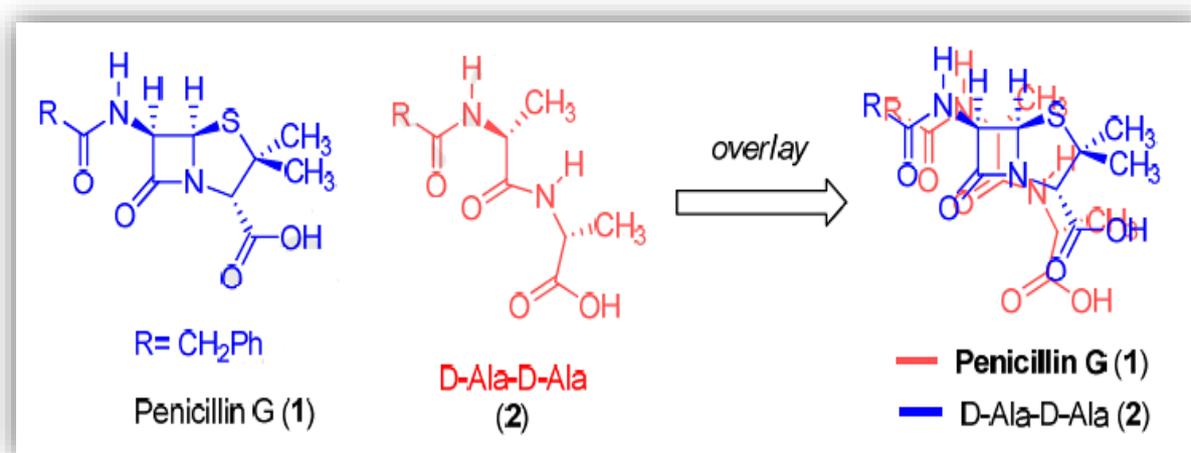


Figure 3 : Super position de la structure de la pénicilline avec la structure de la D-Ala-D-Ala dipeptidase (**Lima et al., 2020**)

Une fois les β -lactamines se lient au site actif des PBP, elles agissent en tant qu'inhibiteurs irréversibles en se liant de manière covalente à un résidu de sérine conservé dans le site actif de l'enzyme. Cette liaison covalente entraîne l'inactivation des PBP, empêchant la formation de liaisons peptidiques entre les chaînes glycémiqes du peptidoglycane (**Sauvage et al., 2008; Zapun et al., 2008**).

Sans ces liaisons, la paroi cellulaire bactérienne devient affaiblie et plus susceptible à la pression osmotique, conduisant finalement à la lyse cellulaire et à la mort (**Hakenbeck et al., 2012**).

1.4.3 Biosynthèse des β -lactamines par les champignons

La production industrielle des pénicillines et céphalosporines réalisé par des champignons tel que *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium notatum*, *Acremonium chrysogenum*, *Nocardia Lactamdurans* et *Aspergillus nidulans* (**Tahlan et Jensen, 2013**).

Dans la biosynthèse des β -lactamines chez les *Penicillium chrysogenum*, quatre gènes sont identifiés. Une région promoteur bidirectionnelle de 1,16 kb est située entre les gènes pcbAB, pcbC et penDE (**Figure 4**) codant pour les enzymes de synthèses et de conversion des acides

aminés à fin d'avoir la molécule de pénicilline (Díez *et al.*, 1990; Suárez *et Peñalva*, 1996; Weber *et al.*, 2012).



Figure 4 : Gènes codants en *Penicillium chrysogenum*

Les bêta-lactames sont formés à partir des mêmes trois acides aminés : l'acide L-aminoadipique "AAA", la L-cystéine et la L-valine. Chez les champignons, l'acide aminé non protéinogène AAA est dérivé de la voie de l'aminoadipate spécifique du champignon qui conduit à la formation de la lysine (**Figure 5**). En premier étape les 3 acides aminés sont condensés pour former le tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine(AVC) (A. Brakhage, 1998).

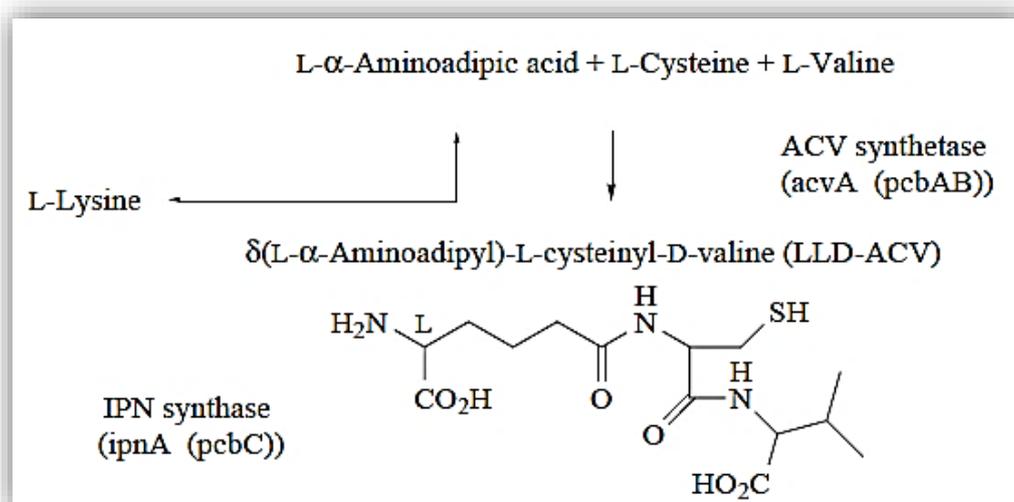


Figure 5 : Formation de le tripeptide δ -(L- α -aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine) (AVC) (A. Brakhage, 1998)

La deuxième étape de la réaction consiste en la fermeture oxydative du cycle linéaire de tripeptide pour former un cycle bicyclique, comprenant l'anneau β -lactames à quatre atomes fusionnés à l'anneau thiazolidine à cinq atomes, qui est une caractéristique commune à toutes les pénicillines par un enzyme iso-pénicilline N synthétase (**Figure 6**).

Au cas des céphalosporines la pénicilline N joue un rôle clé en tant que précurseur des antibiotiques renfermant le noyau ceph-3-em, notamment les céphalosporines et les céphamycines (7-méthoxycéphalosporines), qui sont biosynthétisées par des champignon (A. Brakhage, 1998). La pénicilline N subit différentes réactions enzymatiques maintenu par le champignon pour des différents cycles de céphalosporines comme substrat final (Figure 7).

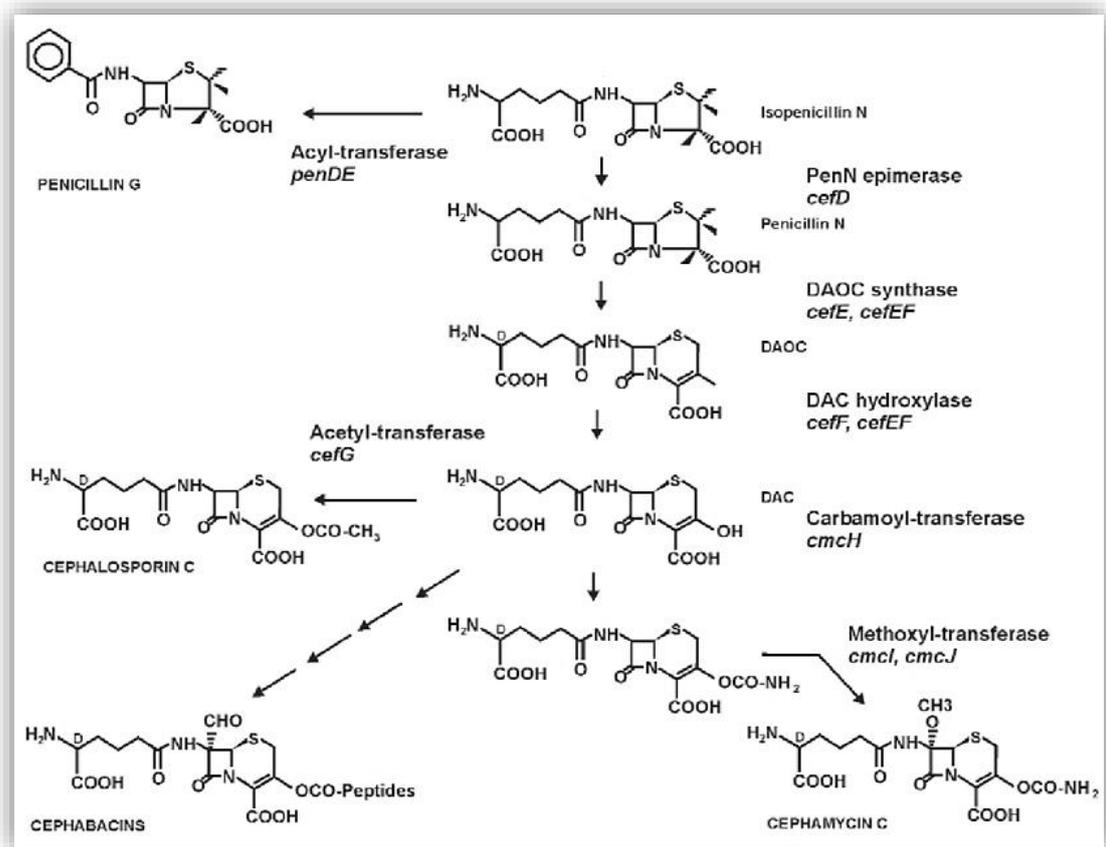


Figure 7 : Biosynthèse des pénicillines et des céphalosporines (Liras et Martín, 2006)

1.5 Procédés de production de la pénicilline

La pénicilline présente les caractéristiques d'un métabolite secondaire typique, se formant vers la fin ou près de la fin de la croissance exponentielle. Sa formation dépend de la composition du milieu et il est possible d'en produire en quantités considérables. La production de la pénicilline à grande échelle est un processus complexe qui a subi des améliorations significatives aux techniques de production pour augmenter le rendement et l'efficacité de la production industrielle de la pénicilline (Ma et al., 2018; Bader et al., 2020).

1.5.1 Fermentation

La production des β -lactames à l'échelle industrielle par *Penicillium chrysogenum* est fait par une fermentation Fed-batch alimenter (**Waites et al., 2001**) dans des fermenteurs à agitation d'une capacité de 40 000 à 200 000 litres. La fermentation comprend une phase initiale de croissance végétative de mycélium du champignon, suivie d'une phase de production d'antibiotiques. Tout au long du processus, le niveau d'oxygène est très important et doit être maintenu entre 25-60 mol/L/h une température de 25 à 30°C et un pH de 6.5 à 7.7, les conditions spécifiques dépendant de la souche (**Michael et al., 2001; Ziemons et al., 2017**). Le glucose, le lactose ou les deux à la fois sont principaux source de carbone, qui est utilisé en voisinage de 65% comme métabolite d'entretien cellulaire, 25% pour la croissance et 10% pour la production de pénicilline (**Michael et al., 2001**).

Corn steep liquor est toujours utilisé comme source d'azote, de nutriments supplémentaires et de précurseurs de chaîne latérale (**Gordon et al., 1947**). L'ajout de carbonate de calcium (1% p/v) et d'un tampon phosphate pour neutraliser le milieu, optimisant ainsi son pH pour la production de pénicilline. De l'ammoniac, des sels minéraux et des précurseurs spécifiques de chaîne latérale, tels que l'acide phénylacétique ou l'acide phénoxyacétique (**Dayalan et al., 2011**).

Le développement de l'inoculum est généralement initié en ajoutant des spores lyophilisées de *Penicillium chrysogenum* à un petit fermenteur à une concentration de 5×10^3 spores/mL qui sera cultivé en deux phase. Une phase végétative qui double la biomasse chaque 6 heures et qui est maintenu pendant deux jours pour assurer un rendement optimal, et la deuxième phase de production qui poursuit de 6 à 8 jours (**Michael et al., 2001; Elander, 2003**).

1.5.2 Purification

Au moment de l'extraction les cellules sont enlevées. La pénicilline G, en tant que produit cellulaire, se trouve dans la solution extracellulaire avec une gamme d'autres métabolites et constituants du milieu. La première étape consiste à éliminer les cellules par filtration. Cette étape est réalisée dans des conditions qui évitent la contamination du filtrat par une enzyme, qui pourrait détruire l'antibiotique. Les micro-organismes produisant la β -lactamase pourraient réagir avec les antibiotiques, ce qui entraînerait une perte totale ou grave du produit. Ensuite, il faut isoler la pénicilline.

1.6 Champignons producteurs de métabolites d'intérêt

Les champignons ont un rôle très utile en biotechnologie en raison de leurs caractéristiques intrinsèques de produire divers métabolites (**Chroumpi et al., 2020**).

Les métabolites microbiens peuvent être utilisés en microbiologie industrielle pour obtenir des acides aminés, pour développer des vaccins et des antibiotiques, et pour isoler les produits chimiques nécessaires à la synthèse organique. Les métabolites peuvent être classés en deux groupes :

- **Métabolites primaires** : Les métabolites primaires sont des molécules précurseur produites par les microorganismes pendant la phase exponentielle des cellules et qui sont essentielles pour la croissance et le maintien des fonctions cellulaires, comme ils servent à la production des monomères pour la production de métabolites secondaires et d'enzymes extracellulaires (**Kumar et al., 2018**).
- **Métabolites secondaires** : Les métabolites secondaires sont des produits générés par les microorganismes durant la phase de résistance aussi appelé la phase stationnaire (**Maplestone et al., 1992**). Il s'agit notamment des antibiotiques, des gibbérellines, des alcaloïdes, des toxines, etc. Les métabolites secondaires ne jouent pas un rôle direct dans la croissance, le développement et la reproduction normaux des micro-organismes (**Vining, 1992**).

Plusieurs champignons sont des producteurs remarquables des métabolites primaires et secondaires (**Tableau 5**) tels que les enzymes, les acides, les vitamines, les antibiotiques, etc. Ces productions servent notamment les industries pharmaceutiques, biotechnologiques, alimentaires, agricoles et manufacturières (**Lata et al., 2019 ; Abd-ElGawad et al., 2020**). Cette machinerie métabolique explique le rendement élevé obtenu grâce à l'utilisation des industrielles des mycètes (**Kumar et al., 2021**).

De nombreuses espèces du genre *Penicillium* sont considérées comme des espèces productrices performantes de métabolites secondaires.

Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un

intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxicilline (**Durand et al., 1989**).

Ces composés sont largement utilisés dans les domaines pharmaceutiques et thérapeutiques car ils sont dotés d'activités antimicrobiennes et anticancéreuses ; ainsi que dans les industries alimentaires et agricoles. Ces dernières années, le genre *Penicillium* a été étudié et criblé de manière approfondie pour développer davantage son exploitation industrielle (**Grijseels et al., 2017 ; Toghueo et al., 2020**).

Tableau 5 : Métabolites produits par les Mycètes et leurs intérêts industriels

Espèce	Composé produit	Activité du composé	Référence
<i>A. Niger</i>	Inulinase.	Hydrolyse de l'inuline (production d'éthanol).	Mohamed et al., 2021
	Acide citrique.	Acidifiant et conservateur (Additif alimentaire, industries Cosmétiques et pharmaceutique).	
	α -amylase.	Hydrolyse des polysaccharides (en boissons, textile et pâte à Papier).	
	Catalase.	Anti-oxydant (agro-alimentaire, Textile et production de caoutchouc).	
	Cellulase.	Dégrade la cellulose (production de boissons, de détergents, de textiles et de pâte à papier).	
	Estérase.	Hydrolyse des esters (fabrication de parfums et cosmétiques).	
<i>A. oryzae</i>	Lipase.	Dégradation des triglycérides (industries alimentaires, détergentes et textiles).	Park et al., (2017)
	Glutaminase.	Hydrolyse de la glutamine (fermentation de la sauce soja).	
	Acide kojique.	Antibiotique, antioxydant et additif alimentaire.	

<i>A. melleus</i>	AMP désaminase.	Hydrolyse de l'AMP (production d'aliments et de boissons).	
<i>Saccharomyce s cerevisiae</i>	Invertase	Hydrolyse du saccharose (additif alimentaire et chimique).	Leo et al., (2021).
	Vitamines B1, B2, B3 et B6.	Industries pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques.	
	Utilisée telle quelle (biomasse).	Complément alimentaire (industries pharmaceutiques et alimentaires).	
<i>Fusarium verticillioides.</i>	Endoglucanase et xylanase	Hydrolyse de la cellulose (production de biocarburants).	De Almeida et al., (2014
<i>P. chrysogenum.</i>	Pénicillines.	Antibiotiques.	Fierro et al., (2022
	Xanthocilline X.	Anti-cancéreux.	
<i>P.brevicompectu m.</i>	Acide mycophénolique.	Immunosuppresseur.	Vinale et al., (2020
	Brévianamides A.	Anti-inflammatoires.	
<i>P. roqueforti.</i>	Roquefortine.	Mycotoxine antimicrobienne.	Fernandez-Bunste (2021).
<i>P. copticola.</i>	Sesquiterpènes éremophilanes.	Antifongiques.	
<i>P. coprobium</i>	Pyripyropène.	Anticholestérols	

1.7 L'utilisation industrielle des champignons

Les moisissures et les levures représentent les catégories de champignons les plus utilisés dans le monde de l'industrie.

Plusieurs procédés de fabrication de denrées alimentaires incluent l'utilisation d'une ou plusieurs espèces de levures, tels que les fermentations de panification et de vinification (**Liszkowska et al., 2021**). Les moisissures sont également utilisées lors de l'affinage de certains fromages et la production des produits carnés (**Ropars et al., 2020**).

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries chimiques, la biolixiviation et la biotransformation. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (**Boiron, 1996**).

Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d'une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l'industrie pharmaceutique et en médecine (**Larpen-Gourgaud et Sanglier, 1992**).

Les champignons offrent une productivité élevée grâce à leur grande vitesse de croissance et leur métabolisme très actif et rapide, et ce avec un faible coût de production. En effet, ils sont très peu exigeants et se cultivent parfaitement sur des milieux de routine et dans des conditions physico-chimiques faciles à fournir. De plus, les taux de productions sont très élevés et ce même avec des sources nutritives bon marché ou carrément des déchets industriels comme le lactosérum, les matières amylacées résiduelles, les déchets de papeteries, les rejets domestiques (**Modesto et al., 2021**).

1.8 Le genre *Penicillium*

Penicillium réunit des champignons filamenteux imparfait qui appartenant au phylum des Ascomycètes qui se reproduit toujours par voie asexuée (**Nguyen et al., 2017**). Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (**Pitt, 1988**).

Les *Penicilliums* sont des champignons couramment présents dans l'environnement et qui ont la capacité d'être polyphagies, ce qui peut causer diverses formes de détérioration. Leur habitat naturel inclut le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost et les céréales.

1.8.1 Caractères macroscopiques

Penicillium est un genre de champignons qui peut être identifié par plusieurs caractéristiques macroscopiques. Certaines des caractéristiques clés qui peuvent être utilisées pour différencier les espèces de *Penicillium* comprennent leur morphologie de colonie, leur couleur et leur texture.

La morphologie de la colonie de *Penicillium* peut varier d'une forme plate et poudreuse à une forme surélevée et empilée. La texture des colonies peut être veloutée, laineuse ou granuleuse. La couleur des colonies peut varier du blanc à des nuances de vert, bleu ou jaune (**Pitt et Hocking, 2022**).

1.8.2 Morphologie microscopique

La structure microscopique est caractérisée par la présence de longs hyphes qui se ramifient, ainsi que des phialides disposées à la pointe des conidiophores et portées par des métules qui s'organisent en grappes (**Figure 8**). Ces phialides produisent un grand nombre de conidies sphériques qui s'assemblent en chaînes pour former une tête conidienne ressemblant à un pinceau (**Xia et al., 2018**).

Les pénicilles (pinceau) mono-verticillés ont un seul verticille qui se termine par des phialides. En revanche, les pénicilles bi-verticillés sont dotés de phialides et de métules de longueurs variables, avec des degrés de divergence différents, qui peuvent être plus ou moins cylindriques. Quant aux pénicilles ter-verticillés, ils possèdent un niveau de ramification supplémentaire entre le sporophore et les métules.

Certains *Penicillium* produisent également des pénicilles quater-verticillés (ou quadri-verticillés) avec un niveau de ramification supplémentaire par rapport aux ter-verticillés. En général, les pinceaux ter-verticillés et quater-verticillés sont nettement asymétriques (**Asthana et Kumar, 2018**).

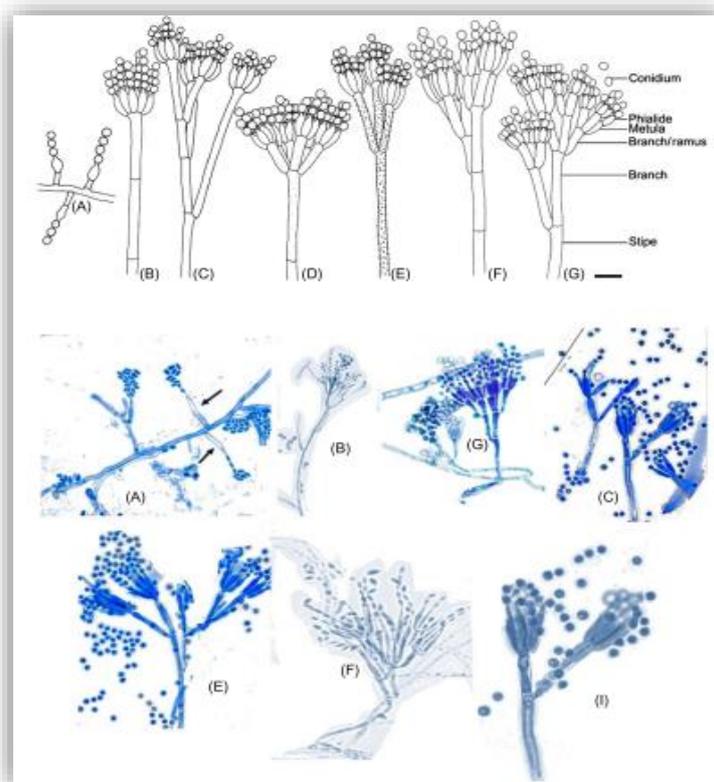


Figure 8 : Caractères morphologique de *Penicillium* (Asthana et Kumar, 2018)

1.8.3 Caractères cultureaux

Les *Penicillium* sont des champignons qui se développent rapidement et facilement sur des milieux de culture couramment utilisés comme les géloses au malt et Sabouraud ou d'autre gélose spécifique à des températures modérées d'environ 20-30°C pendant 3 à 7 jours

Après deux jours d'incubation, on peut observer de petites colonies plates formées de courts filaments aériens, souvent de couleur blanche. Au bout de 3 à 4 jours, la sporulation se produit et les colonies prennent des différentes teintures ça dépend aux espèces. vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii* (Figure 9) (Yadav et al., 2018).

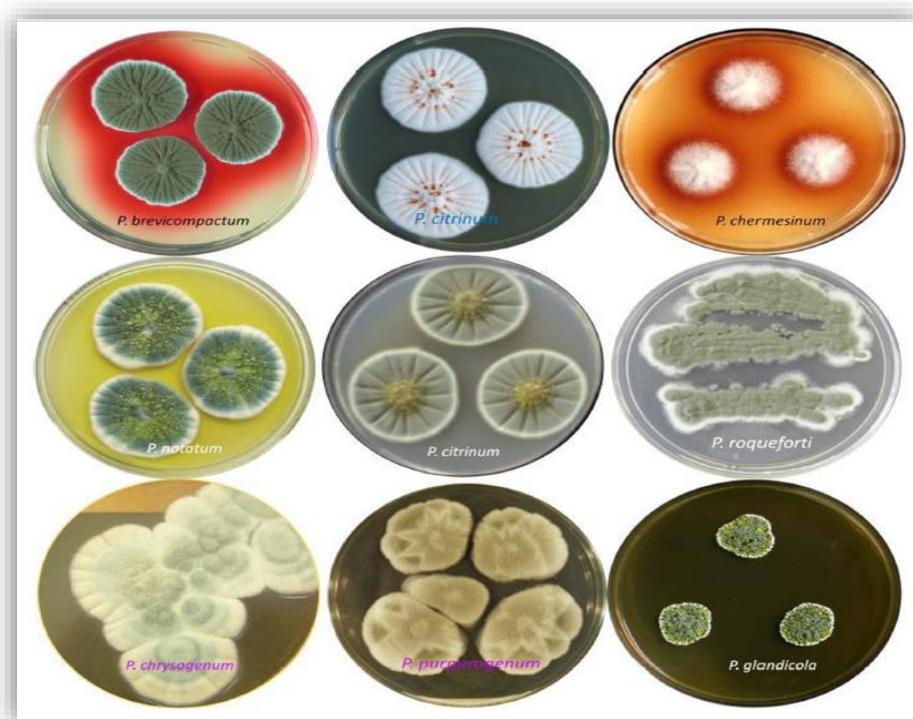


Figure 9 : Aspects morphologiques des différents espèces de *Penicillium* sur des différents milieux de culture (Yadav et al., 2018)

1.8.4 Importance du genre *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est d'une importance industrielle significative. Les espèces appartenant à ce genre sont connus dans la production fromagère, notamment le fromage bleu, le Roquefort (*Penicillium roquefortii*) et le Camembert (*Penicillium camembertii*). Le champignon confère à ces fromages leur saveur et leur texture caractéristiques (Beresford et al., 2001; Fox et al., 2017).

Aussi dans la production alimentaire de divers aliments fermentés *Penicillium nalgiovense* pour l'amélioration des qualités organoleptiques des saucissons, tels que la sauce soja (Hui, 2004), la bioremédiation et sur tout la production d'antibiotiques par *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium griseofulvum* et *Penicillium notatum*, (Houbraken et al., 2011). Les espèces du *Penicillium* produisent la pénicilline, le premier antibiotique découvert par Alexander Fleming. La pénicilline est encore largement utilisée en médecine pour traiter les infections bactériennes (Hooper, 2000).

Matériel
Et
Méthodes

2 Matériel et méthodes

Le présent travail porte sur l'isolement des souches fongiques à partir du sol et des agrumes pourris afin de rechercher des champignons producteurs d'antibiotiques. Pour ce faire, les propriétés antagonistes des champignons isolés ont été analysées. Ensuite, une production d'antibiotiques sur milieu liquide a été réalisée avec les isolats sélectionnés.

2.1 Echantillonnage

Afin de pouvoir isoler des souches de mycètes, plusieurs échantillons du sol ont été collectés en Mars 2023 en zone forestière à Cha'abet Erassas au sein de l'Université Frères Mentouri-Constantine 1 ainsi que dans la zone de Ba'araouia.

Les prélèvements ont ciblé le sol humide entourant les arbres. Des échantillons du sol humide et des morceaux du bois ont été prélevés à l'aide d'une spatule et mis dans des flacons stériles avant d'être transportés au laboratoire (LaMyBAM) selon la méthode décrite par (**Dayalan *et al.*, 2011**).

Dans un second volet, des échantillons provenant de la pourriture de citrons et d'oranges ont été prélevés dans des conditions aseptiques et transportés au laboratoire. (**Dayalan *et al.*, 2011**; **Suhaib et Bandh, 2011**).



Figure 10 : Différentes sources d'échantillonnage

2.2 Isolement des isolats fongiques

À partir du sol, une solution mère est préparée en mélangeant 1g du sol à 9 mL d'eau distillée stérile. La solution obtenue a servi à préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1mL de la solution précédente à 9 mL d'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-4} . Un volume de 0.1 mL de de la dernière dilution a été déposée sur une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé Potato dextrose agar (PDA) (**Annexe 1**) additionné d'un agent antibactérien (Chloramphénicol), puis étalé uniformément sur l'ensemble de la surface de la gélose.

D'autre part, les morceaux de bois ont été déposés à l'aide d'une pince stérile sur le même milieu. Finalement et à partir du citron et d'orange pourris, des fragments sont prélevés et déposés sur des boîtes de Pétri stériles contenant du PDA (**Annexe1**), toutes les boîtes sont ensuite incubées à 30°C pendant 3 à 4 jours.

2.3 Repiquage et purification des isolats fongiques

Un repiquage réalisé à partir des isolats obtenus après incubation par un prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes sur un milieu PDA (**Annexe 1**) et les incuber à 30°C de 3 à 4 jours. Une observation régulière est effectuée pour vérifier la pureté de la souche.

2.4 Identification des isolats obtenus

2.4.1 Etude macroscopique

Une identification est effectuée à l'œil nu et se concentre principalement sur des caractéristiques telles que :

- La vitesse de croissance (rapide, moyenne, lente).
- L'aspect du mycélium aérien.
- La couleur et l'odeur des colonies.
- La couleur du revers de la culture.
- La texture des colonies.

2.4.2 Etude microscopique

Les champignons isolés sont soumis à une identification morphologique réalisée par une étude microscopique, ce type d'identification est fondé essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium (absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation,) et des spores (forme, couleur, texture des parois) (Harrigan *et al.*, 1976 ; Oteng-Gyang, 1984 ; Guiraud, 1998).

Une observation après coloration au bleu de Lactophénol (Annexe 3) est également réalisée. Il s'agit d'une observation des colonies à l'état frais entre lame et lamelle avec addition d'une goutte de Lactophénol bleu.

L'observation microscopique est effectuée en microscope optique aux différents grossissements (GX10, GX40) ainsi qu'à l'immersion (GX100) (jean, 2013).

2.5 Etude des propriétés antagonistes des isolats

L'activité antibactérienne des souches fongiques à l'égard des souches pathogènes est mise en évidence par un test d'antagonisme direct à l'égard des souches de *Staphylococcus*.

Les souches pathogènes proviennent du soucier du laboratoire de microbiologie de la faculté science de la vie et de la nature d'université Frères Mentouri Constantine 1.

2.5.1 Test d'antagonisme et sélection des isolats producteurs d'antibiotiques

Le test d'antagonisme est réalisé comme suit. Après 24h d'incubation, un écouvillon stérile est émergé dans une culture de bouillon nutritif (BN) (Annexe 1) contenant les bactéries pathogènes réactivées. Un ensemencement en strie est ensuite réalisé sur gélose Muller Hinton (MH) (Annexe 1). Les boîtes sont mises à sécher pendant 5 minutes.

En parallèle, les isolats fongiques sont cultivés pendant 5 à 7 jours sur PDA (Annexe 1). Des disques sont réalisés à l'aide d'un perforateur à partir des boîtes contenant les souches pures des champignons. Puis déposer les disques sur la gélose de MH (Figure 11). Les boîtes pétries sont incubées à 30°C pendant 48h.

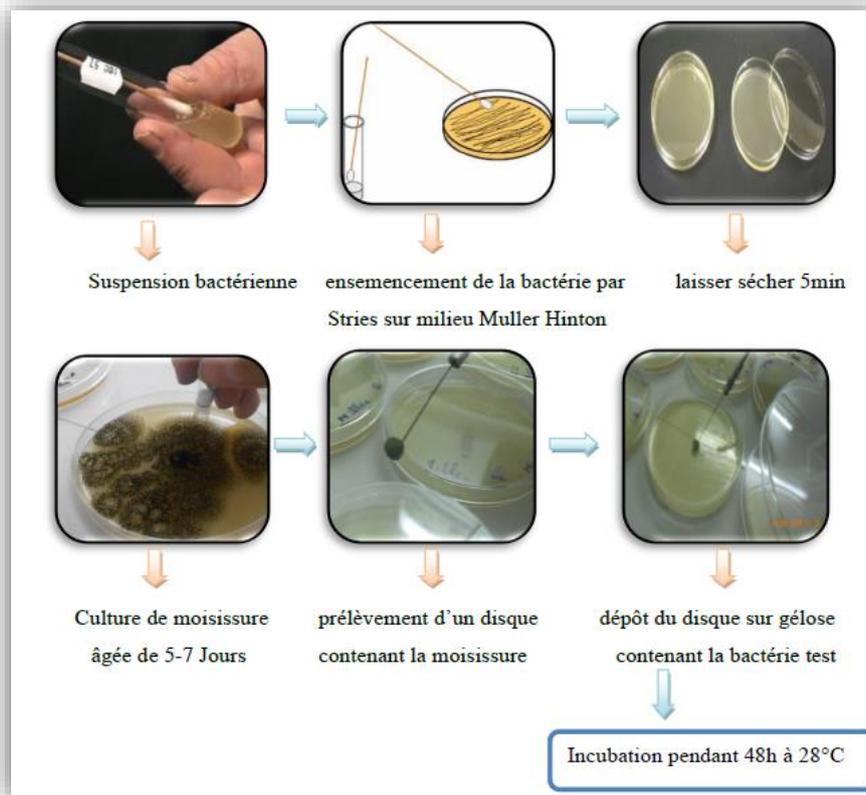


Figure 11 : Etapes du Test d'antagonisme (technique avec modification)

2.6 Production d'antibiotique

2.6.1 Préparation de l'inoculum :

Une suspension de spores a été préparée en grattant avec une anse en platine des boîtes de Pétri de souches présentant une activité antibiotique (SOL2 et OR3). Les spores ont été incorporées dans deux tubes contenant 9 ml d'eau physiologique. Les suspensions sporales ont été transférées dans des erlenmeyer de 250 mL contenant 100 mL du milieu Sabouraud (**Annexe 1**), puis incubé à 30°C pendant 7 jours.

Pour la préparation de l'inoculum, et après la période d'incubation, un barreau magnétique a été introduit dans la fiole avec 5 mL d'eau distillé stérile et agité pendant 15 minutes pour permettre le détachement des spores. La concentration sporale a été ajustée à $2.5 \cdot 10^5$ spores/mL à l'aide d'une cellule de comptage de type Thomas. Cette concentration sporale a été maintenue pour tous les essais de fermentation.

2.6.2 Préparation du milieu de fermentation

Afin d'étudier la production de métabolite bêta-lactame par les deux souches sélectionnées (SOL2 et OR3), le milieu FMP (**Annexe 2**) liquide à pH 6.0 ± 0.2 a été utilisé. Le milieu a été réparti en volumes de 100 mL dans 06 erlenmeyers de 250 ml.

2.6.3 Inoculation et incubation

Un volume de 1 mL de chaque suspension sporale ($2.5 \cdot 10^5$ spores/mL) a été inoculé dans des erlenmeyers contenant le milieu de fermentation liquide. Les erlenmeyers ont été incubés à 30°C pendant 168 heures dans un agitateur rotatif à 130 rpm avec une humidité de la chambre de 55-60%.

Après 48h de fermentation, un volume d'une suspension de Staphylococcus de concentration de $9 \cdot 10^4$ a été rajouté dans deux erlenmeyers contenant les cultures de (SOL2 et OR3).

2.6.4 Méthode analytique « antibiogramme »

Les bactéries utilisées ont été cultivé pour le test biologique de la pénicilline. Pour ce faire, des petits filtres circulaires en papier (3-5 mm) ont été stérilisés et placés à différentes positions sur la surface des boîtes de Pétris contenant le milieu 863 (**Annexe 1**). A l'aide d'une micropipette de 0.2 mL, un volume de 20 µl de chaque culture (surnagent) a été prélevé et versées sur les filtres, et ce chaque 120, 144 et 168h de fermentation pour un suivi de la production.

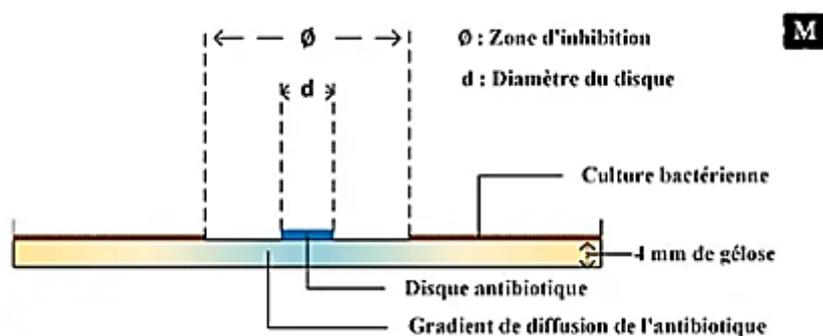


Figure 12 : illustration explicative du test d'antibiogramme

Un indice d'inhibition est calculé par la loi suivante :

$$I = \frac{\phi - d}{\phi} \times 100$$

Résultats

Et

Discussion

3 Résultats et discussion

L'isolement et l'exploration des échantillons ont abouti à plusieurs isolats qui ont été identifiés par l'observation macroscopique et microscopiques en utilisant des fixateurs et des colorants adéquats.

En effet, l'isolement à partir du sol et des agrumes ont permis l'obtention de 11 isolats fongiques appartenant à 3 genres : *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium*.

L'identification reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la mycologie, elle a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification (**Botton et al., 1990**). Elle est basée sur les deux aspects : microscopiques et macroscopiques. L'aspect macroscopique permet de connaître : les caractères culturaux, la couleur des colonies, la présence ou l'absence de l'exsudat et d'une odeur. Alors que l'aspect microscopique révèle les organes de fructification et la couleur des spores ainsi que l'état du filament; septé ou non septé.

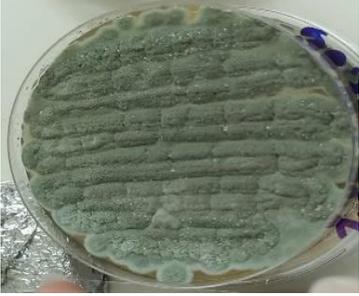
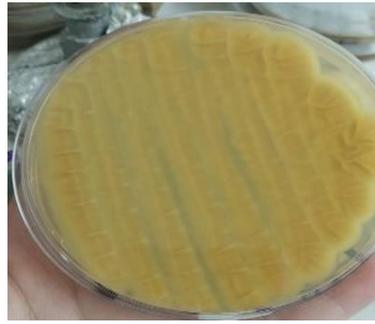
3.1 Identification macroscopique

Dans cette étude, le genre *Penicillium* a été dominant cependant, d'autres genres ont été obtenus comme l'*Aspergillus*, notamment les *Aspergillus noirs* (**Tableau 6**). Les isolats obtenus appartenant aux moisissures à filaments septés. Ces isolats ont comme habitat le plus courant comme le démontraient les travaux de (**Martin 2020**) et les travaux de (**Ramos-Pereira et al., 2019**).

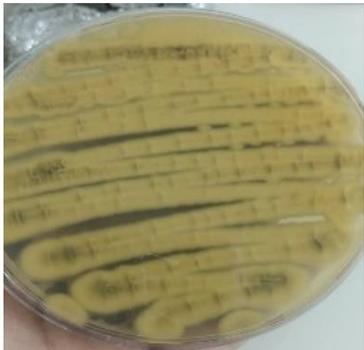
L'identification spécifique de *Penicillium* a été réalisée dans ce travail en utilisant la gélose PDA pour l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques obtenus (**Tableau 6**) corroborent des résultats similaires montrés par d'autres travaux ce qui confirmait la véracité de notre protocole (**Abastabar et al., 2016, Xia et al., 2018, Kolanlarli et al., 2019**).

Résultats et discussion

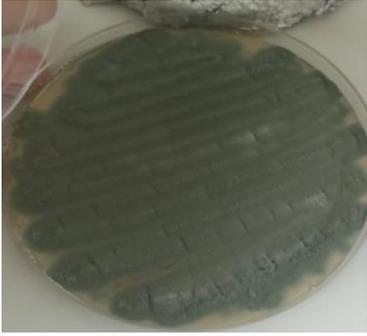
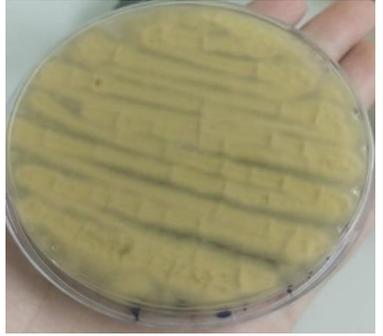
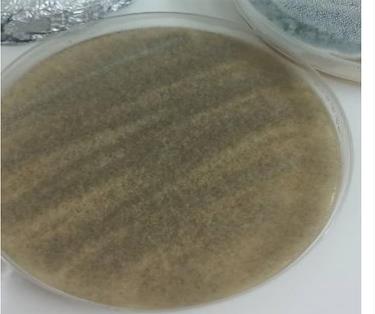
Tableau 6 : Observation macroscopique des isolats

Isolats	Genre	Face	Revers	Description
OR 0	<i>Aspergillus</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur le milieu de culture PDA. Elles sont irrégulières, poudreuses de couleur noir foncé à maturité.</p> <p>Le revers des colonies est blanc à jaunâtre et noir.</p>
OR	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens et jeunes de couleur vert pâle à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
OR 1	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens et jeunes de couleur vert pâle à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>

Résultats et discussion

OR2	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens et jeunes de couleur vert pâle à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
OR3	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens et jeunes de couleur vert pâle à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
CIT	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens vert pale à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
CIT1	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens verts pale à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>

Résultats et discussion

CIT2	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens et jeunes de couleur vert pâle à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
SOL2	<i>Penicillium</i>			<p>Les colonies se développent rapidement sur milieux de culture PDA. Elles sont plates et leur texture varie de veloutée à ouatée. Elles présentent des cordons mycéliens verts pale à maturité.</p> <p>Le revers de la colonie est blanc à jaunâtre ou blanc-jaune</p>
SOL 1	Eventuellement <i>Absidia</i>			<p>Se développe rapidement Sur (PDA), et les colonies arrivent à maturité en dedans de 4 jours. Les colonies peuvent couvrir la boîte de Pétri entièrement en une semaine et mesurer de 5-7 mm à 15 mm d'épaisseur : les colonies sont floconneuses ; au début, elles sont grises et deviennent rapidement gris olivâtre. Le revers de la colonie est incolore ou blanc.</p>

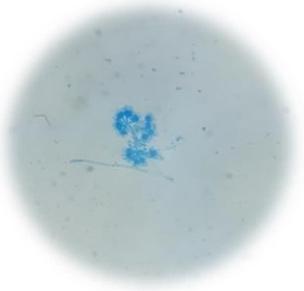
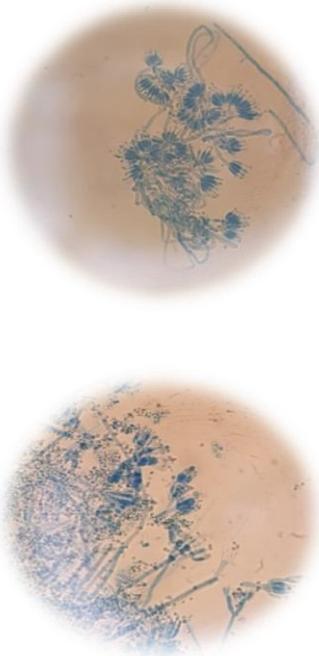
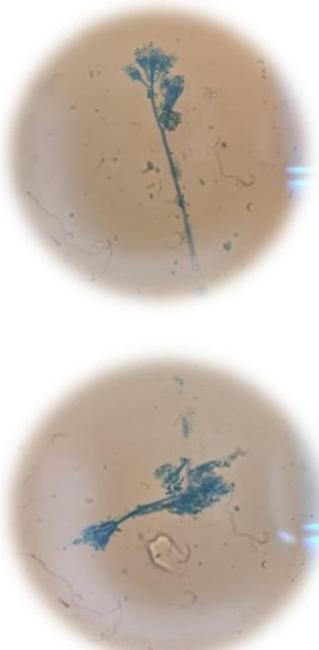
BOIS	Eventuellement <i>Mucor</i>			<p>Leur développement est rapide et extensif, Les colonies ont une texture floconneuse et des couleurs pouvant varier de blanc à jaune ou marron. Le revers est incolore ou blanc</p>
------	-----------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.2 Identification microscopique

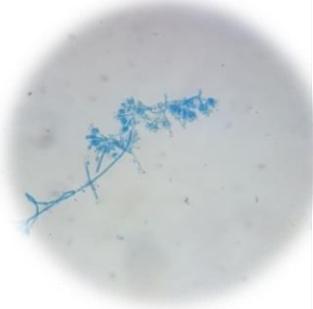
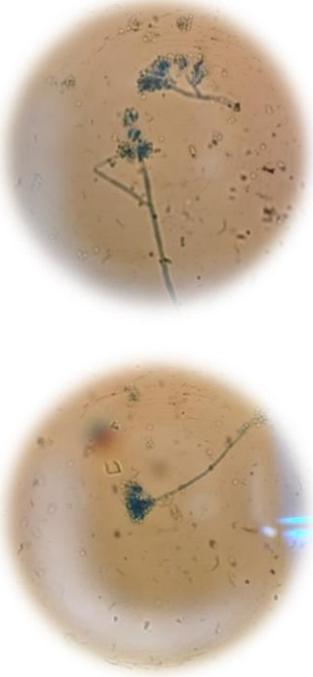
Un frotti est réalisé sur une lame en mettant une goutte de colorant bleu de coton. (**Annexe 3**). Un grattage effectué par l'anse de platine pour les différents isolats, des petits fragments de mycéliums sont déposés sur la lame contenant le colorant. Une observation microscopique a été réalisée par un grossissement x40 et x100 (**Tableau 7**).

Résultats et discussion

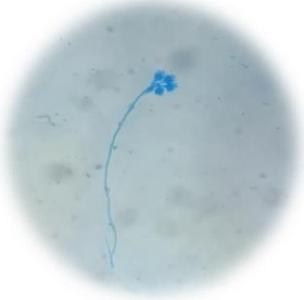
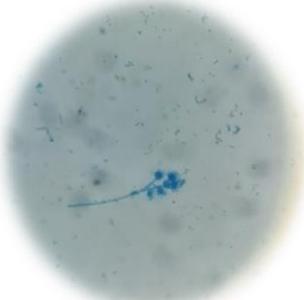
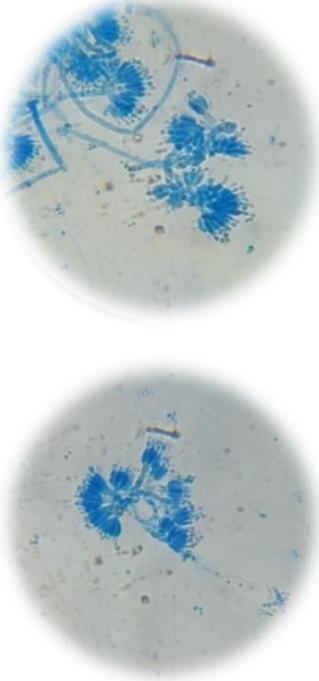
Tableau 7 : Observation microscopique des isolats

Isolat	Genre	Grossissement ×40	Grossissement ×100	Description
OR	<i>Penicillium</i>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conidiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>
OR1	<i>Penicillium</i>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conidiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>

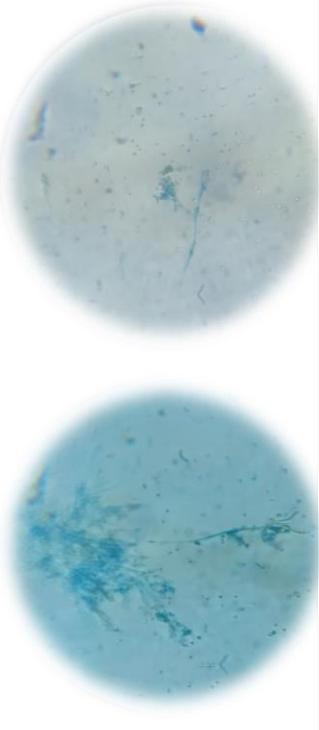
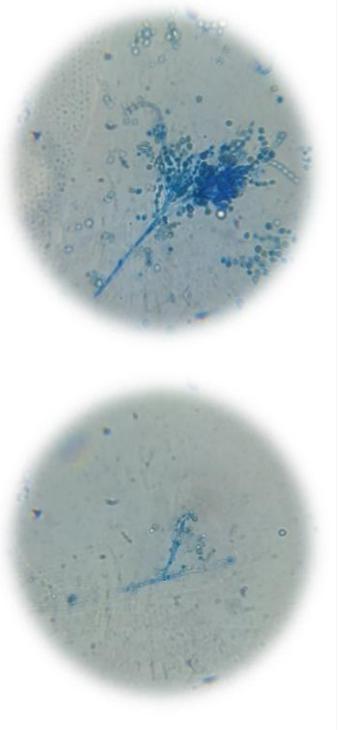
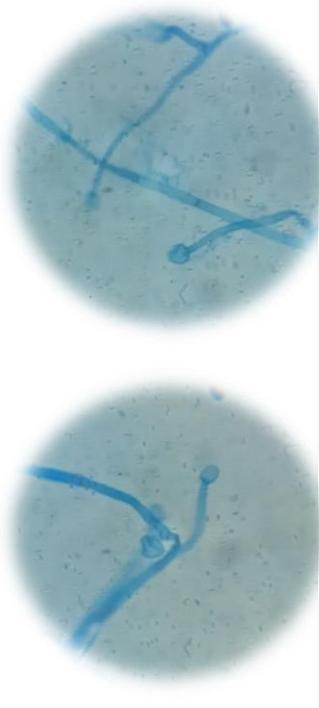
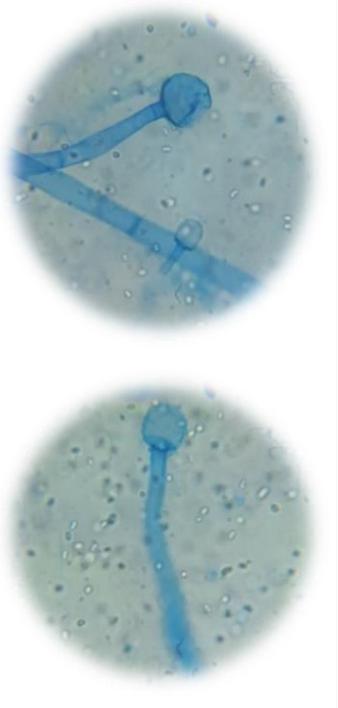
Résultats et discussion

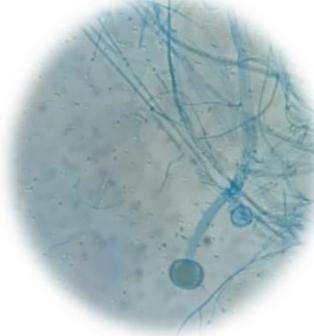
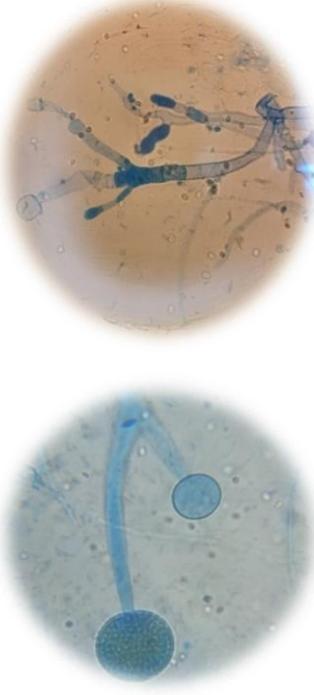
<p>OR2</p>	<p><i>Penicillium</i></p>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conidiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>
<p>OR3</p>	<p><i>Penicillium</i></p>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conidiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>

Résultats et discussion

<p>CIT</p>	<p><i>Penicillium</i></p>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conodiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>
<p>CIT1</p>	<p><i>Penicillium</i></p>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conodiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés.</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores.</p>

Résultats et discussion

<p>SOL 2</p>	<p><i>Penicillium</i></p>			<p>Hyphe septé, et des hyalines portent des conodiophores ramifiés cylindrique, cloisonnés</p> <p>Phialides disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores</p>
<p>SOL 1</p>	<p><i>Asbedia</i></p>			<p>Sporocystophore ramifié terminé par une columelle faisant saillie dans le sporocyste globuleux</p>

Bois	<i>Mucor</i>			<p>Hyphe septé, Les sporanges sont des structures sphériques ou ovales qui se forment à l'extrémité des hyphes.</p> <p>Des sporanges qui contiennent les sporanges-mères (spores de reproduction)</p>
------	--------------	-----------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3.3 Etude de l'activité antagoniste

La confrontation directe entre les *staphylococcus* et le *Penicillium* isolé du SOL2 et OR3 avait un résultat acceptable. Qui montre un halo transparent autour de l'isolat du genre *Penicillium* isolé du col, codé SOL2 (**Figure 13**), et un petit halo autour du *Penicillium* isolé de l'orange, codé OR3 (**Figure 13**). Le *Penicillium* isolé a une activité bêta-lactamine sur les bactéries à gram positif *Staphylococcus*. Ce qui sont les mêmes résultats obtenu dans l'étude de (**Dayalan et al., 2011**).

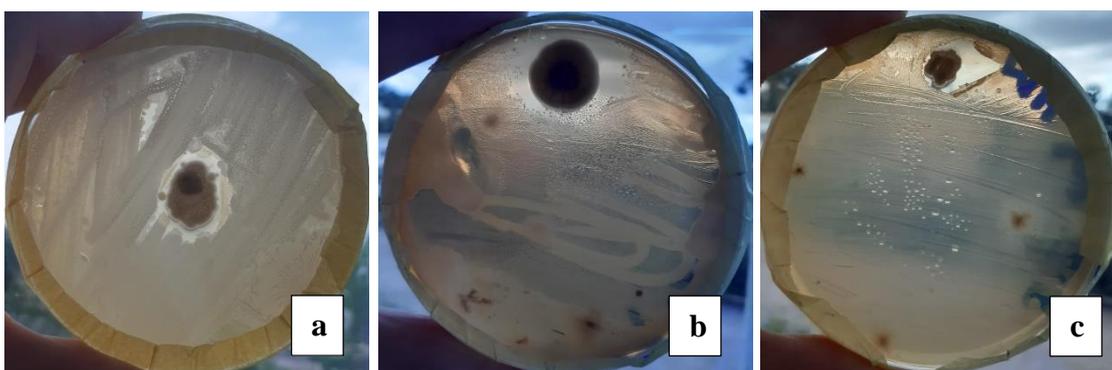


Figure 13 : Confrontation directe contre les isolats : (a) et (b) *Staphylococcus* contre *Penicillium* (Sol2), et (c) *Staphylococcus* contre *Penicillium* (OR3)

Résultats et discussion

La lecture se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque.

Tableau 8 : Résultats de test d'antagonisme

Test	Résultats	Indice d'inhibition		
<i>Penicillium</i> SOL2 contre <i>Staphylococcus</i>		40%		
<i>Penicillium</i> SOL2 contre <i>Staphylococcus</i>		46%		de
<i>Penicillium</i> OR3 contre <i>Staphylococcus</i>		30%		ob c

En vue des risques des bactéries résistantes aux antibiotiques qui croissent jours après jour. **Compaore et al., (2016)** ont réalisé une étude sur l'isolement et la caractérisation des isolats de moisissures productrices des antibiotiques.

Durant cette étude, ils sont arrivés à identifier plusieurs isolats de moisissures ayant une activité antibactérienne cintre un grand nombre de bactéries. Le *Penicillium* été le plus active sur les pathogènes testés. Notre étude en effet, va dans le même sens en obtenant des isolats du genre *Penicillium* à activité antibactérienne et grâce à la production de substances chimiques diffusées dans la gélose inhibant la croissance des bactéries (couronnes transparentes).

Résultats et discussion

Aussi, d'après les recherches bibliographiques menées dans ce travail, nous avons constaté que *Penicillium* produisait une large gamme de métabolites secondaires à activité antibactérienne. Ces derniers pouvaient être des antibiotiques ou autres. Néanmoins, ils avaient tous en commun une forte activité sur les bactéries pathogènes pour l'homme. Ceci démontrait le rôle principal que tient cette espèce dans les industries thérapeutiques, médicales et pharmaceutiques. L'activité antibactérienne des moisissures a été largement décrite *in vitro* dans plusieurs études. Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 6/11 espèces appartenant aux genres, *Penicillium* vis-à-vis de la bactérie *Staphylocoques*, la plupart des isolats (2/11 espèces) ont développé une activité antibactérienne. En effet une zone de lyse de taille différente autour des disques déposés a été mise en évidence.

3.4 Production d'antibiotiques

Afin de produire les antibiotiques dans un milieu liquide, la préparation de l'inoculum a été réalisée à partir d'une culture de 05 jours de la souche OR3 et la souche SOL2 (**Figure 14 A**). Un barreau magnétique stérile est introduit dans les fioles avec 5 mL d'eau distillée stérile pour permettre le détachement des spores (**Figure 14 B**). La solution sporale a été récupérée et ajustée à $2,5 \cdot 10^5$ spores/mL. La même concentration a été maintenue pour tous les essais de fermentation (**Figure 14 C**).

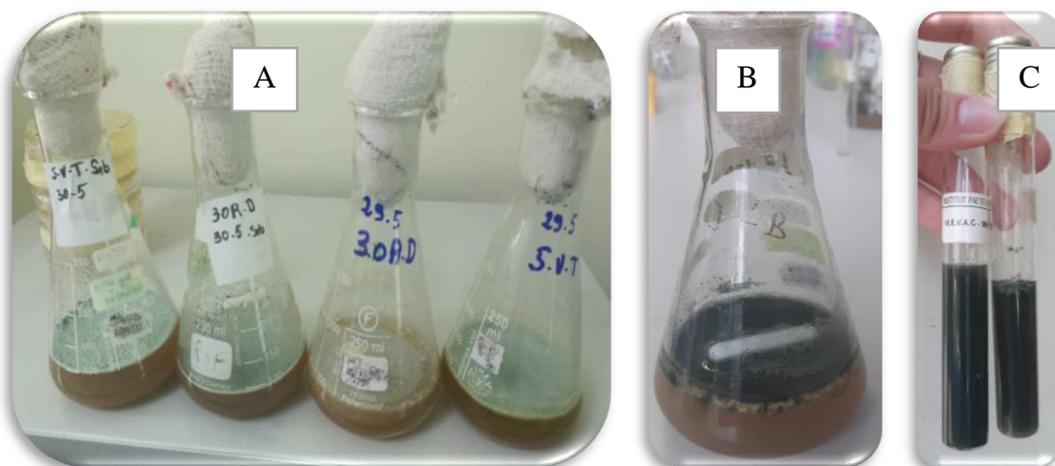


Figure 14 : Résultats de préparation d'inoculum après 05 jours d'incubation (A), détachement des spores (B) et l'obtention d'une suspension sporale (C)

Un volume de 1mL a été inoculé dans le milieu de culture FMP (**Annexe 2**). Ensuite, les cultures ont été incubées à 30°C pendant 168 h sur un agitateur rotatif à 130 rpm (**figure 15**).



Figure 15 : Fermentation sur milieu liquide conventionnel

Le taux de production d'antibiotiques a été analysé chaque 48h en utilisant la méthode analytique « antibiogramme ». Le diamètre de la zone de lyse a été calculé (**Tableau 9**) (**Figure 16**).

Plusieurs travaux antécédents ont confirmé que la culture industrielle de *Penicillium* pouvait se faire sur des milieux de culture courants en mycologie ; cette moisissure se montrait très peu exigeante et très facile à cultiver. Différents travaux menés sur la production des métabolites primaires et secondaires par *Penicillium* se sont basés sur l'utilisation des milieux de routine, le plus courant 836 (**Pitt et Hocking 2009 ; Houbraken et al. 2012 ; Pitt 2014 ; Dar et al. 2015 ; Yadav et al. 2018**).

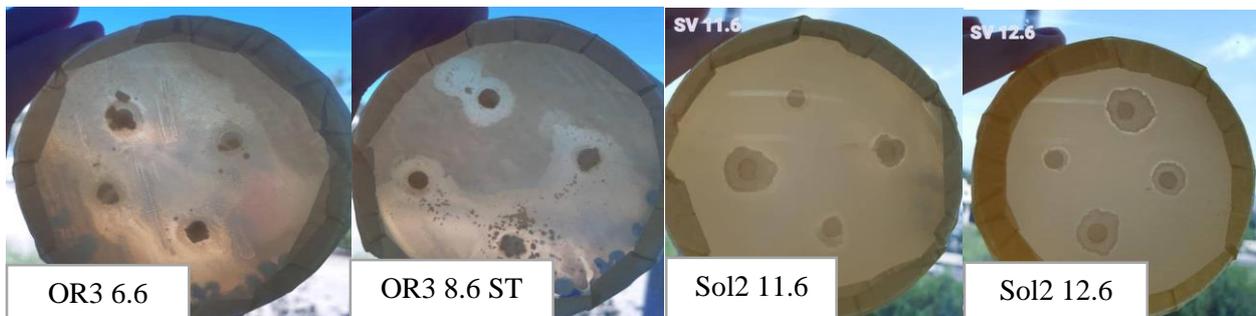


Figure 16 : Quelques boîtes de pétrie montrant d'antibiogramme après chaque 48h

Résultats et discussion

Tableau 9 : Résultats test d'antibiogramme

Date d'extraction	Fiole	Résultats	Indice d'inhibition	Interprétation
8.6	OR3 ST		54% 66% 61% 80%	Grande zone d'inhibition et des indices enlevés
12.6	OR3 ST		22% 14% 20% 25%	Faible zone d'inhibition
11.6	Sol2		13% 15% 13% 14%	Faible zone d'inhibition

Résultats et discussion

12.6	Sol2		15% 13% 11% 20%	Faible zone d'inhibition
11.6	Sol2 ST		33% 14% 25% 30%	Zone d'inhibition moyenne
12.6	Sol2 ST		2%	Très faible zone d'inhibition

Les résultats des tests d'antibiogramme contre *Staphylococcus* révèlent des observations prometteuses lors de l'utilisation d'un produit de fermentation de *Penicillium*.

Une petite concentration de la bactérie *Staphylococcus* a été ajoutée à deux fioles après deux jours du lancement de la fermentation, agissant ainsi comme un potentiel précurseur. Dans ce cas, le produit de fermentation semble présenter des propriétés antibactériennes plus importantes contre *Staphylococcus*.

L'observation de ce test peut être interprétée comme une indication que le produit de fermentation contient des composés bioactifs qui ciblent spécifiquement *Staphylococcus*. Ces composés pourraient agir en perturbant les mécanismes de croissance, en inhibant la formation

Résultats et discussion

de biofilms ou en interférant avec d'autres processus vitaux de la bactérie. L'efficacité de ce test d'antagonisme peut être évaluée par diverses méthodes, telles que la mesure de la croissance bactérienne, l'évaluation de la survie cellulaire ou l'observation des changements morphologiques.

Il convient de noter que ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives intéressantes pour de futures recherches sur l'application potentielle de ce produit de fermentation dans le traitement des infections à *Staphylococcus*.

Conclusion

4 Conclusion

Le travail de ce mémoire de fin d'étude a pour objectif l'isolement et le criblage des champignons producteurs de métabolites à activité antibactérienne. Pour ce faire, des échantillonnages ont été effectués de différentes origines, tels que le sol et les agrumes pourris (orange et citron).

Ces travaux ont permis d'isoler et d'identifier à l'échelle du genre trois isolats fongiques dont les propriétés antimicrobiennes ont été mises en évidence. Au terme de cette partie, il est opportun de signaler que le sol et les agrumes sont peuplés de champignons dont ceux, appartenant au genre *Penicillium*.

Une étude d'antagonisme a été effectuée par une confrontation directe contre, principalement, une bactérie sensible appartenant au genre pathogène en l'occurrence *Staphylococcus*, puis, contre d'autres bactéries en guise de confirmation. Il a été conclu de cette expérience que les isolats qui développaient de l'activité antibactérienne appartiennent au genre *Penicillium*. En outre, l'effet sélectif sur des bactéries du genre *Staphylococcus* permet de supposer que l'activité biologique constatée est due à la présence de métabolites à structure bêta-lactamine.

La fermentation sur milieu liquide en fioles a permis de constater que les isolats préalablement sélectionnés, gardaient leur activité antibactérienne ce qui leur procure le caractère de microorganismes industriels. En effet, le potentiel antibiotique efficace de ces champignons a été démontré par la méthode de l'antibiogramme en utilisant des disques en papier imprégnés par le milieu de fermentation ce qui laisse croire que les métabolites d'effet sont sécrétés dans le milieu de fermentation d'une part, et que leur nature répond à celle des métabolites secondaires. Une approche innovante a été testée dans ce travail qui consistait à mettre une concentration faible de la bactérie *Staphylococcus* dans le milieu de fermentation de *Penicillium* comme indicateur. Il a été conclu de cette réalisation que cette bactérie a servi comme inducteur pour l'augmentation de rendement en ce métabolite secondaire à caractère antibiotique.

Le résultat obtenu est plus qu'important, la production de l'activité antibactérienne a été augmentée d'une manière très significative, et l'observation microscopique en fin de fermentation a montré que cette bactérie a été éliminée, ce qui prouve l'efficacité de cette méthode.

*Références
bibliographiques*

5 Références bibliographies

1. Asthana, M. and Kumar, A. (2018) Understanding the Diversity of Penicillium Using Next-Generation Sequencing. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 19–43.
2. Abd-ElGawad, A. M., Rashad, Y. M., Abdel-Azeem, A. M., Al-Barati, S. A., Assaeed, A. M., Mowafy, A. M. (2020). Calligonum polygonoides L. shrubs provide species-specific facilitation for the understory plants in coastal ecosystem. *Biology*, 9(8), 232.
3. Bader, J., Albrecht, D., Kriete, G., and Bange, F. (2020) Penicillin production: an update on penicillin biosynthesis, penicillin-resistant strains and synthetic penicillins. 319.
4. Ball, A.P., Gray, J.A., and Murdoch, J.McM. (1978) The Natural Penicillins — Benzylpenicillin (Penicillin G) and Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V). In *Antibacterial Drugs Today*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 6–18.
5. Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L., and Cogan, T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int Dairy J* 11: 259–274.
6. Brakhage (1998) Molecular regulation of beta-lactam biosynthesis in filamentous fungi. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 62: 547–585.
7. Brakhage, A. (1998) 4.07 Biosynthesis of b-Lactam Compounds in Microorganisms.
8. Bryskier, A. (2000) Ketolides—telithromycin, an example of a new class of antibacterial agents. *Clin Microbiol Infect* 6: 661–669.
9. Bush, K. and Bradford, P.A. (2016) β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a025247.
10. Cazeau, G., Chazel, M., Jarrige, N., Sala, C., Calavas, D., Gay, E. (2010). Utilisation des antibiotiques par les éleveurs en filière bovine en France. Congrès International sur la Rencontre Recherche Ruminants, 3, 08-09.
11. Chandra, N. and Kumar, S. (2017) Antibiotics Producing Soil Microorganisms. In *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils*. Soil Biology. Hashmi, M.Z., Strezov, V., and Varma, A. (eds). Cham: Springer International Publishing, pp. 1–18.
12. Chen, Y., Li, X., Yang, M., Yang, L., Han, X., Jiang, X., et al. (2017). High sensitive detection of penicillin G residues in milk by surface-enhanced raman scattering. *Talanta*, 167, 236-241.
13. Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., Traore, A. S. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 198-210.
14. Cox, Jr, L. A., Popken, D. A., Mathers, J. J. (2009). Human health risk assessment of penicillin/aminopenicillin resistance in enterococci due to penicillin use in food animals. *Risk Analysis*, 29(6), 796-805.

Référence bibliographique

15. Dayalan, S.A.J., Darwin, P., and Prakash, S. (2011a) Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. *Asian Pac J Trop Biomed* 1: 15–19.
16. Dayalan, S.A.J., Darwin, P., and Prakash, S. (2011b) Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. *Asian Pac J Trop Biomed* 1: 15–19.
17. Dar, G. H., Kamili, A. N., Nazir, R., Bandh, S. A., Jan, T. R., Chishti, M. Z. (2015). Enhanced production of α -amylase by *Penicillium chrysogenum* in liquid culture by modifying the process parameters. *Microbial Pathogenesis*, 88, 10-15.
18. De Almeida, M. N., Guimarães, V. M., Falkoski, D. L., Paes, G. B., Ribeiro, J. I., Jr, Visser, E. M., Alfenas, R. F., Pereira, O. L., de Rezende, S. T. (2014). Optimization of endoglucanase and xylanase activities from *Fusarium verticillioides* for simultaneous saccharification and fermentation of sugarcane bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172(3), 1332–1346.
19. Díez, B., Gutiérrez, S., Barredo, J.L., Van Solingen, P., Van Der Voort, L.H., and Martín, J.F. (1990) The cluster of penicillin biosynthetic genes. Identification and characterization of the pcbAB gene encoding the alpha-aminoadipyl-cysteinyl-valine synthetase and linkage to the pcbC and penDE genes. *J Biol Chem* 265: 16358–16365.
20. Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M . (1989). *Fusarium moniliforme* keratitis, *Acta ophthalmol., Scand.* 67, 710-713 *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1.p: 156-160
21. Elander, R.P. (2003) Industrial production of b-lactam antibiotics.
22. Embley, T.M. and Stackebrandt, E. THE MOLECULAR PHYLOGENY AND SYSTEMATICS OF THE ACTINOMYCETES.
23. Fernandes, R., Amador, P., and Prudêncio, C. (2013) β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Rev Med Microbiol* 24: 7–17.
24. Fernandez-Bunster, G. (2021). Diversity, phylogenetic profiling of genus *Penicillium*, and their potential applications. Industrially important fungi for sustainable development. Ed. Springer, Cham. Pages 335-361.
25. Fierro, F., Vaca, I., Castillo, N. I., García-Rico, R. O., Chávez, R. (2022). *Penicillium chrysogenum*, a vintage model with a cutting-edge profile in biotechnology. *Microorganisms*, 10(3), 573.
26. Fox, P.F., Guinee, T.P., Cogan, T.M., and McSweeney, P.L.H. (2017) *Fundamentals of Cheese Science*, Boston, MA: Springer US.
27. Gao, M., Glenn, A.E., Blacutt, A.A., and Gold, S.E. (2017) Fungal Lactamases: Their Occurrence and Function. *Front Microbiol* 8: 1775.
28. Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., Frandsen, R., Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal Biology and Biotechnology*, 4, 8.

Référence bibliographique

29. Gordon, J.J., Grenfell, E., Knowles, E., Legge, B.J., Mcallister, R.C.A., and White, T. (1947) Methods of Penicillin Production in Submerged Culture on a Pilot-Plant Scale. *Microbiology* 1: 187–202.
30. Jean-noel , J . (2013). Les techniques de laboratoire utilisé en mycologie.
31. Hakenbeck, R., Brückner, R., Denapaite, D., and Maurer, P. (2012) Molecular mechanisms of β -lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Future Microbiol* 7: 395–410.
32. Harrigan, W; McCance, M. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London: P 21-277.
33. Hooper, D.C. (2000) Mechanisms of Action and Resistance of Older and Newer Fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 31: S24–S28.
34. Houbraken, J., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. (2011) Fleming’s penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus* 2: 87–95.
35. Houbraken, J., Frisvad, J. C., Seifert, K. A., Overy, D. P., Tuthill, D. M., Valdez, J. G., et al. (2012). New penicillin-producing *Penicillium* species and an overview of section chrysogena. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 29, 78.
36. Hui, Y.H. ed. (2004) Handbook of food and beverage fermentation technology, New York: Marcel Dekker.
37. Hutchings, M.I., Truman, A.W., and Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 51: 72–80.
38. Josephine, H.R., Kumar, I., and Pratt, R.F. (2004) The Perfect Penicillin? Inhibition of a Bacterial DD-Peptidase by Peptidoglycan-Mimetic β -Lactams. *J Am Chem Soc* 126: 8122–8123.
39. Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010) How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8: 423–435.
40. Kumar, A., Asthana, M., Gupta, A., Nigam, D., and Mahajan, S. (2018) Secondary Metabolism and Antimicrobial Metabolites of *Penicillium*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 47–68.
41. Larpent-Gourgaud M. & Sanglier J. J. (1992). Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.
42. Lima, L.M., Silva, B.N.M.D., Barbosa, G., and Barreiro, E.J. (2020) β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem* 208: 112829.
43. Liras, P. and Martín, J.F. (2006) Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? *Int Microbiol Off J Span Soc Microbiol* 9: 9–19.
44. Liszkowska, W., Berłowska, J. (2021). Yeast fermentation at low temperatures: adaptation to changing environmental conditions and formation of volatile compounds. *Molecules*, 26(4), 1035.

Référence bibliographique

45. Leo, V. V., Viswanath, V., Deka, P., Ramji, D. R., Pachuau, L., Carrie, W., Malvi, Y., Singh, G., Singh, B. P. (2021). Saccharomyces and their potential applications in food and food processing industries. Industrially important fungi for sustainable development. Ed. Springer, Cham. Pages 393-427.
46. Ma, C., Zhu, Z., Li, J., Zhu, Y., and Ding, Y. (2018) Advances in the industrial production of penicillins. Bioengineered.
47. Maplestone, R.A., Stone, M.J., and Williams, D.H. (1992) The evolutionary role of secondary metabolites — a review. *Gene* 115: 151–157.
48. Michael, J.W., Neil, L.M., John, S.R., and Gary, H. (2001) Industrial Microbiology, Osney Mead.
49. Modesto, H. R., Lemos, S. G., Dos Santos, M. S., Komatsu, J. S., Gonçalves, M., Carvalho, W. A., Carrilho, E., Labuto, G. (2021). Activated carbon production from industrial yeast residue to boost up circular bioeconomy. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(19), 24694–24705.
50. Mohamed, A. H., Balbool, B. A., Abdel-Azeem, A. M. (2021). Aspergillus from different habitats and their industrial applications. Industrially important fungi for sustainable development. Ed. Springer, Cham. Pages 85-106.
51. Nguyen, P.-A., Strub, C., Fontana, A., and Schorr-Galindo, S. (2017) Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biol Control* 104: 10–27.
52. Oteng-Gyang, K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud
53. Pandey, N. and Cascella, M. (2022) Beta Lactam Antibiotics. In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
54. Park, H. S., Jun, S. C., Han, K. H., Hong, S. B., Yu, J. H. (2017). Diversity, application, and synthetic biology of industrially important Aspergillus fungi. *Advances in Applied Microbiology*, 100, 161–202.
55. Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., and Bonomo, R.A. (2011) Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 4943–4960.
56. Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2022) Fungi and Food Spoilage, Cham: Springer International Publishing.
57. Pitt, J. I. (2014). Penicillium | Penicillium and Talaromyces: Encyclopedia of Food Microbiology, 2 nd Ed. Elsevier, 3, 6-13.
58. Pitt, J. I., Hocking, A. D. (2009). Penicillium and related genera. In: Fungi and Food Spoilage, Ed. Springer, 169-273.
59. Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., Pourghassem Gargari, B. (2021). Yeast exopolysaccharides and their physiological functions. *Folia Microbiologica*, 66(2), 171– 182.
60. Rahman, S. U., Rasool, M. H., Rafi, M. (2012). Penicillin production by wild isolates of *Penicillium chrysogenum* in Pakistan. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 476-481

Référence bibliographique

61. Ropars, J., Caron, T., Lo, Y. C., Bennetot, B., Giraud, T. (2020). La domestication des champignons *Penicillium* du fromage [The domestication of *Penicillium* cheese fungi]. *Comptes rendus. Biologies*, 343(2), 155-176.
62. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J.A., and Charlier, P. (2008) The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32: 234–258.
63. Suárez, T. and Peñalva, M.A. (1996) Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB*–*pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol Microbiol* 20: 529–540.
64. Suhaib A. Bandh (2011) Identification of some *Penicillium* species by traditional approach of morphological observation and culture. *Afr J Microbiol Res* 5:.
65. Tahlan, K. and Jensen, S.E. (2013) Origins of the β -lactam rings in natural products. *J Antibiot (Tokyo)* 66: 401–410.
66. Toghueo, R., Boyom, F. F. (2020). Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 10(3), 107.
67. Oteng-Gyang, K. (1984). Introduction à la microbiologie alimentaire dans les pays chaud
68. Vinale, F., Salvatore, M. M., Nicoletti, R., Staropoli, A., Manganiello, G., Venneri, T., Borrelli, F., DellaGreca, M., Salvatore, F., Andolfi, A. (2020). Identification of the main metabolites of a marine-derived strain of *Penicillium brevicompactum* Using LC and GC MS Techniques. *Metabolites*, 10(2), 55.
69. Vining, L.C., 1992. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity—a review. *Gene*. 115 (1-2), 135-140.
70. Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Higton, G. (2001) *Industrial Microbiology: An Introduction*.
71. Weber, S.S., Bovenberg, R.A.L., and Driessen, A.J.M. (2012) Biosynthetic concepts for the production of β -lactam antibiotics in *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol J* 7: 225–236.
72. Xia, M.-C., Bao, P., Liu, A.-J., Zhang, S.-S., Peng, T.-J., Shen, L., et al. (2018) Isolation and identification of *Penicillium chrysogenum* strain Y5 and its copper extraction characterization from waste printed circuit boards. *J Biosci Bioeng* 126 : 78–87.
73. Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N., et al. (2018) Biodiversity of the Genus *Penicillium* in Different Habitats. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, pp. 3–18.
74. Zapun, A., Contreras-Martel, C., and Vernet, T. (2008) Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 32: 361–385.
75. Ziemons, S., Koutsantas, K., Becker, K., Dahlmann, T., and Kück, U. (2017) Penicillin production in industrial strain *Penicillium chrysogenum* P2niaD18 is not dependent on the copy number of biosynthesis genes. *BMC Biotechnol* 17 : 16.

Résumé :

Ce mémoire de fin d'étude se concentre sur l'isolement des champignons producteurs de métabolites à activité antibactérienne. Dans cet objectif, des échantillonnages ont été effectués de différentes origines, tels que le sol et les agrumes pourris (orange et citron).

Les échantillons ont été traités et ensemencés sur un milieu de culture sélectif favorable à la croissance des champignons en utilisant des techniques de laboratoire appropriés. La purification des isolats a été réalisée en mettant l'accent sur le genre *Penicillium*, le premier genre connu pour la production des métabolites secondaires à structures bêta-lactamines.

Une étude d'antagonisme a été effectuée par une confrontation directe contre, principalement, une bactérie sensible appartenant au genre pathogène en l'occurrence *Staphylococcus*, puis, contre d'autres bactéries en guise de confirmation. L'observation des halos transparents autour des colonies des isolats à tester a permis leur sélection. En effet, quinze isolats fongiques ont été obtenus et deux isolats appartenant au genre *Penicillium*, suivant l'observation microscopique (observations des filaments et la tête conidienne) et macroscopique (considération de l'aspect et la couleur des colonies) ont été criblés.

Une fermentation sur milieu liquide en fioles a été réalisée en utilisant des milieux de culture conventionnels, dans lesquels les isolats de *Penicillium* ont été cultivées afin de produire des métabolites secondaires susceptibles de développer une activité antibiotique. Le potentiel antibiotique efficace de ces champignons a été démontré par la méthode de l'antibiogramme. La production de l'antibiotique a été observée depuis le quatrième jour de fermentation avec un optimum, obtenu en huitième jour, en constatant que cette production demeure en progression. Une approche innovante a été testée dans ce travail qui consistait à mettre une concentration faible de la bactérie *Staphylococcus* dans le milieu de fermentation de *Penicillium* comme indicateur. Le résultat obtenu est plus qu'important, la production de l'activité antibactérienne a été augmentée d'une manière très significative, et l'observation microscopique en fin de fermentation a montré que cette bactérie a été éliminée, ce qui prouve l'efficacité de cette méthode.

Mots clés : champignons, isolement, *Penicillium*, *Staphylococcus*, antagonisme, fermentation, milieu liquide conventionnel.

Abstract

This study focuses on the isolation of reproductive fungi from antibacterial metabolites. For this purpose, samples were taken from different sources, such as soil and rotten citrus fruits (orange and lemon).

The samples were treated and seeded to a fungal-friendly selective culture medium using appropriate laboratory techniques. The purification of the isolates was carried out with an emphasis on the genus *Penicillium*, the first genus known for the production of secondary metabolites with beta-lactam structures.

An antagonism study was conducted through direct confrontation with, primarily, a sensitive bacterium belonging to the pathogenic genus *Staphylococcus*, and then against other bacteria as confirmation. The observation of transparent halos around colonies of isolates to be tested allowed their selection. In fact, fifteen fungal isolates were obtained and two isolates belonging to the genus *Penicillium*, according to microscopic observation (observations of filaments and conidial head) and macroscopic (consideration of appearance and color of colonies) were screened.

Fermentation on a liquid medium in vials was carried out using conventional culture media, in which the *Penicillium* isolates were grown to produce secondary metabolites likely to develop antibiotic activity. The effective antibiotic potential of these fungi has been demonstrated by the antibiogram method. Production of the antibiotic has been observed since the fourth day of fermentation with an optimum, obtained in the eighth day, noting that this production remains in progression. An innovative approach was tested in this work, which involved placing a low concentration of *Staphylococcus* bacteria in the *Penicillium* fermentation medium as an indicator.

The result obtained is more than important, the production of antibacterial activity has been increased in a very significant way, and microscopic observation at the end of fermentation showed that this bacterium was eliminated, which proves the effectiveness of this method.

Key words: Fungi, isolation, *Penicillium*, *Staphylococcus*, antagonism, fermentation, conventional liquid medium.

ملخص

تركز هذه الأطروحة على عزل الفطريات التي تنتج نواتج الأيض ذات النشاط المضاد للبكتيريا. لهذا الغرض، تم أخذ عينات من أصول مختلفة، مثل التربة والحمضيات الفاسدة (برتقال وليمون).

تمت معالجة العينات وتلقيحها في وسط زراعة انتقائي موات لنمو الفطريات باستخدام تقنيات معملية مناسبة. تمت تنقية العازلات مع التركيز على جنس *Penicillium*، وهو أول جنس معروف بإنتاج المستقبلات الثانوية بتركيبات بيتا لاكتام.

تم إجراء دراسة العداء من خلال المواجهة المباشرة، بشكل أساسي، ضد بكتيريا حساسة تنتمي إلى الجنس الممرض، في هذه الحالة *Staphylococcus*، ثم ضد بكتيريا أخرى كتأكيد. سمحت مراقبة الهالات الشفافة حول مستعمرات العازلات المراد اختبارها باختيارها. وبالفعل تم الحصول على خمسة عشر عزلة فطرية وعزلتين من جنس البنسليوم بعد الملاحظة المجهرية (ملاحظات الخيوط والرأس الكونيدي) والعينية (النظر في مظهر ولون المستعمرات).

تم إجراء التخمر على وسط سائل في قوارير باستخدام وسط زراعة تقليدي، حيث تمت زراعة عازلات *Penicillium* من أجل إنتاج مستقبلات ثانوية قادرة على تطوير نشاط المضادات الحيوية. تم إثبات قدرة المضادات الحيوية الفعالة لهذه الفطريات من خلال طريقة المضاد الحيوي. وقد لوحظ إنتاج المضاد الحيوي منذ اليوم الرابع للتخمر على النحو الأمثل، والذي تم الحصول عليه في اليوم الثامن، مع ملاحظة أن هذا الإنتاج لا يزال قيد التقدم. تم اختبار نهج مبتكر في هذا العمل والذي يتكون من وضع تركيز منخفض من بكتيريا *Staphylococcus* في وسط تخمير *Penicillium* كمؤشر.

النتيجة التي تم الحصول عليها أكثر من مهمة، تم زيادة إنتاج النشاط المضاد للبكتيريا بشكل كبير للغاية، وأظهرت الملاحظة المجهرية في نهاية التخمر أنه تم القضاء على هذه البكتيريا، مما يثبت فعالية هذه الطريقة.

هذا الدراسة تركز على عزل سلالات الفطر المنتجة لمركبات β -talactamine. ولتحقيق هذا الهدف تم جمع العينات من مصادر مختلفة مثل التربة والحمضيات (برتقال وليمون) باستخدام التقنيات المعملية المناسبة. تمت معالجة العينات وتلقيحها في وسط استنبات انتقائي يؤدي إلى نمو الفطريات. بعد أيام قليلة من الحضانة، تم إجراء زراعة فرعية للحصول على سلالات نقية، مع التركيز على السلالات ذات المظهر الشبيه *Penicillium* وهو أول جنس معروف بإنتاج بيتا لاكتام. أجريت دراسة التضاد من خلال المواجهة المباشرة مع *Staphylococcus* ضد عدة سلالات تم الحصول عليها. تم إنتاج كميات صغيرة من مادة β -lactamine في القوارير باستخدام وسط استنبات سائل تقليدي، حيث تمت زراعة سلالات البنسليوم في ظل الظروف المثلى لدرجة الحرارة، ودرجة الحموضة. تمت تنقية المادة المنتجة، ثم تحليلها لاحقاً لتحديد تركيبها ونشاطها المضاد للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: الفطر، العزل، *Penicillium*، *Staphylococcus*، العداء، إنتاج، وسط سائل تقليدي

Annexe 1. Composition des milieux de cultures**PDA (Potato Dextrose Agar)**

Pomme de terre	200 g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

Muller-Hinton

Hydrolysate acide de caséine (peptone)	17,5 g
Extrait de viande	2,0 g
Amidon	1,5 g
Calcium	20 à 25 mg
Magnésium	10 à 12,5 mg
Agar	15,0 g
Eau distillé	1000ml

Sabouraud

Glucose	20g
Peptones	10g
Agar	15g
Vitamine et facteurs de croissance	//
Eau distillé	1000ml

Bouillon nutritif

Peptones	10g
Extrait de bœuf	1g
Extrait de levure	2g
Chlorure de sodium	5g

Annexe

Eau distillée	1000ml
---------------	--------

Milieu 863

Glucose	10g
---------	-----

Peptone	10g
---------	-----

Extrait de levure	10g
-------------------	-----

Eau distillé	1000ml
--------------	--------

Annexe 2. Milieux de production**Milieu de fermentation FMP**

Lactose monohydrate	130g
Corn steep liquide	42g
Sulfate d'ammonium	8g
Carbonate de calcium	10g
Phosphate de potassium monobasique	4g
Sulfate de sodium	2g
Eau distillé	1000ml

Annexe 3. Bleu coton Lactophéno

Cristaux de phéno	20 g
Acide lactique	20 ml
Glycérine ou de glycérol	40 ml
Eau distillée	20 ml

en vue de l'obtention de Diplôme du Master
Filière : Biotechnologies
Spécialité : Biotechnologie et Contrôle Qualité

Thème : Recherche et isolement des champignons à activité Béta-lactamine

Résumé

Ce mémoire de fin d'étude se concentre sur l'isolement des champignons producteurs de métabolites à activité antibactérienne. Dans cet objectif, des échantillonnages ont été effectués de différentes origines, tels que le sol et les agrumes pourris (orange et citron). Les échantillons ont été traités et ensemencés sur un milieu de culture sélectif favorable à la croissance des champignons en utilisant des techniques de laboratoire appropriés. La purification des isolats a été réalisée en mettant l'accent sur le genre *Penicillium*, le premier genre connu pour la production des métabolites secondaires à structures bêtalactamines. Une étude d'antagonisme a été effectuée par une confrontation directe contre, principalement, une bactérie sensible appartenant au genre pathogène en l'occurrence *Staphylococcus*, ensuite, contre d'autres bactéries en guise de confirmation. L'observation des halos transparents autour des colonies des isolats à tester a permis leur sélection. En effet, quinze isolats fongiques ont été obtenus et deux isolats appartenant au genre *Penicillium*, suivant l'observation microscopique (observations des filaments et la tête conidienne) et macroscopique (considération de l'aspect et la couleur des colonies) ont été criblés. Une fermentation sur milieu liquide en fioles a été réalisée en utilisant des milieux de culture conventionnels, dans lesquels les isolats de *Penicillium* ont été cultivés afin de produire des métabolites secondaires susceptibles de développer une activité antibiotique. Le potentiel antibiotique efficace de ces champignons a été démontré par la méthode de l'antibiogramme. La production de l'antibiotique a été observée depuis le quatrième jour de fermentation avec un optimum, obtenu en huitième jour, en constatant que cette production demeure en progression. Une approche innovante a été testée dans ce travail qui consistait à mettre une concentration faible de la bactérie *Staphylococcus* dans le milieu de fermentation de *Penicillium* comme indicateur. Le résultat obtenu est plus qu'important, la production de l'activité antibactérienne a été augmentée d'une manière très significative, et l'observation microscopique en fin de fermentation a montré que cette bactérie a été éliminée, ce qui prouve l'efficacité de cette méthode.

Mots clés : champignons, isolement, *Penicillium*, *Staphylococcus*, antagonisme, fermentation, milieu liquide conventionnel

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), FSNV, UMC1

Jury d'évaluation

Encadreur : Pr. KACEM CHAOUICHE Norednine Université frères Mentouri Constantine 1.
Président de jury : Dr. HARZALLAH Besma Université frères Mentouri Constantine 1.
Examinatrice : Dr. MILET Asma Université frères Mentouri Constantine 1.
Tutrice : GARES Maroua Université frères Mentouri Constantine 1.