

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université Saad Dahleb Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Biologie

Mémoire de fin d'Études

En vue de l'obtention du diplôme de master dans le domaine SNV Filière
sciences biologiques

Option : Microbiologie

Thème

**L'étude de l'activité antimicrobienne des *Beauveria bassiana*,
*Clonostachys rosea***

Présenté par :

Date de la soutenance : 12/09/2021

- **GUEMDANI Sarah**
- **TELDJOUNE Nour el houda**

Devant le jury :

MEKLAT A.	Professeur/USDB1	Présidente
MOHAMED MAHMOUD. F.	M.C.B /U.S.D.B1	Promotrice
LOUNACI L.	M.C.B /U.S.D.B1	Examinatrice

Année universitaire: 2020-2021

Remercîment

*Remerciement et Louange à Dieu Seigneur des Mondes. Nous adressons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur **Mme. Mohamed Mahmoud** qui a guidé, surveillé le déroulement et l'exécution du travail de ce mémoire en nous prodiguant tout aide possible, et en nous consacrant beaucoup de son temps précieux.*

*Nos vive remerciements vont au **Mme MEkLAT** .A enseignante à l'université de Blida d'avoir accepté de présider le jury de soutenance du*

*Mémoire, ainsi qu'aux **LOUNACI** .L'enseignante à l'université de Blida d'avoir accepté de juger ce modeste travail.*

Enfin, nous ne pouvons oublier de remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

*A L'ETRE LE PLUS CHER DE MA VIE, MA MERE, A MON CHER
PERE ET A MES CHERES SŒURS ET FRERE*

Nour el houda

Dédicace

A mes chers parents qui m'ont donné toute les belles choses: existence, amour, tendresse, confiance, qui a partagé avec moi toutes mes instants de joie et de tristesse, qui m'ont soutenue dans toutes les circonstances de ma vie, qui m'ont toujours épaulé, aidé, orienté vers les bons sens.

A mes frères et sœurs :Marwa ,Safa et Abd raouf

A mes amies et amis : Tamani et Mohamed

Et à toutes personnes ayant contribué de près ou de loin pour ce travail.

Sarah

Résumé

Les bactéries multi résistantes cause un sérieux problème de santé publique ce qui a accentué les travaux sur la recherche de nouvelles substances bioactives (métabolites, nanoparticules) produites plus spécialement par des champignons endophytes. Pour pallier à ce problème, ce travail est basé sur l'activité antimicrobienne de deux souches de *C. rosea* (G133, G312) et de *B. bassiana* (Sn 182) à l'encontre d'*Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans* par méthodes de confrontation directe, de disques et de puits. L'activité antimicrobienne par méthode de confrontation directe a montré que *C. rosea* et *B. bassiana* exercent des activités antibactériennes plus ou moins considérables contre les bactéries à Gram négatif *E.coli* et *P. aeruginosa*, par rapport au Gram positif *S.aureus*. L'effet antifongique de *C. rosea* (G 133, G312) vis-à-vis de *C. albicans*, se traduit par l'inhibition de sa croissance mycélienne. Alors que *B. bassiana* (Sn 182) n'a montré aucun effet sur cette levure. Ces activités sont exercées soit par effets d'antibiose ou bien par phénomène de compétition vis à vis de l'espace et les nutriments. La détermination de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion sur disque a révélé une capacité importante d'extrait chloroformique de *C. rosea* (G 133, G312) et de *B. bassiana* (Sn 182) a inhibé la croissance de souches utilisées par rapport à celle d'acétate d'éthyle. En présence de *P. aeruginosa*, une zone d'inhibition de 8 mm a été enregistrée en contact avec l'extrait chloroformique de *C. rosea* (G 133), alors qu'une faible activité (diamètre) a été constatée en présence de l'extrait acétate d'éthyle de *C. rosea* (G312). *C. rosea* et *B. bassiana* peuvent synthétiser les nanoparticules et plus spécialement les nanoparticules d'argent .La capacité de produire les nanoparticules d'argent a été confirmé par spectrophotométrie à UV-Visible et Zétamétrie qui a révélé une variation de taille (entre 14 et 57 nm) et de charge (entre 4 et 42 mv). Aucun effet n'a été constaté lors de l'utilisation des nanoparticules par la méthode de diffusion par puits. Par contre, les nanoparticules d'argent synthétisés par *C. rosea* (G 133) ont exercées des activités antibactériennes vis-à-vis de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 11 mm, 7 mm et 6 mm respectivement et aussi une activité antifongique de 11 mm contre *C. albicans*. D'après les résultats de l'antibiogramme, les substances bioactives de *C.rosea* ont un effet similaire de celui des antibiotiques Erythromycine (E 15), Oxacilline (OX5), Gentamicine (GMI 15) et Céfalexine (CN 30).

En revanche, en comparant avec les diamètres des zones d'inhibition des autres antibiotiques, les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait brut sont considérés comme faibles. D'après ces résultats, la souche *C. rosea* (G 133) peut représenter une source de nouvelles molécules bioactives pour résoudre le problème de la multi-résistance aux antibiotiques.

Mots clés : *C. rosea*, *B. bassiana*, activité antimicrobienne, nanoparticules d'argent, microorganismes pathogènes

Abstract

Multidrug resistant bacteria cause a serious public health problem which has accentuated research on new bioactive substances (metabolites, nanoparticles) produced more specifically by endophytic fungi. To overcome this problem, this work is based on the antimicrobial activity of two strains of *C. rosea* (G133, G312) and *B. bassiana* (Sn 182) against *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and *C. albicans* by direct confrontation, disc and well methods. Antimicrobial activity by direct confrontation method showed that *C. rosea* and *B. bassiana* exert more or less significant antibacterial activities against Gram-negative bacteria *E. coli* and *P. aeruginosa*, compared to Gram-positive *S. aureus*. The antifungal effect of *C. rosea* (G 133, G312) against *C. albicans* results in the inhibition of its mycelial growth. While *B. bassiana* (Sn 182) showed no effect on this yeast. These activities are exerted either by antibiosis effects or by competition for space and nutrients. The determination of the antagonist activity by the disk diffusion method revealed a significant capacity of chloroform extract of *C. rosea* (G 133, G312) and *B. bassiana* (Sn 182) inhibited the growth of the strains used compared to that of ethyl acetate. In the presence of *P. aeruginosa*, an inhibition zone of 8 mm was recorded in contact with the chloroform extract of *C. rosea* (G 133), while a low activity (diameter) was observed in the presence of *C. rosea* ethyl acetate extract (G312). *Clonostachys rosea* and *Beauveria bassiana* can synthesize nanoparticles and more especially silver nanoparticles. The ability to produce agent nanoparticles was confirmed by UV-Visible spectrophotometry and Zetametry which revealed a variation in size (between 14 and 57 nm) and load (between 4 and 42 mv). No effect was seen when using nanoparticles by the well diffusion method. On the other hand, the silver nanoparticles synthesized by *C. rosea* (G 133) exerted antibacterial activities against *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. aureus* with zones of inhibition of 11 mm, 7 mm and 6 mm respectively and also an antifungal activity of 11 mm against *C. albicans*.

According to the results of the antibiogram, the bioactive substances of *C.rosea* have a similar effect to that of the antibiotics Erythromycin (E 15), Oxacillin (OX5), Gentamicin (GMI 15) and Cefalexin (CN 30). On the other hand, when compared with the diameters of the zones of inhibition of other antibiotics, the diameters of the zones of inhibition of the crude extract are considered to be small. According to these results, the *Clonostachys rosea* strain (G 133) may represent a source of new bioactive molecules to solve the problem of multi-resistance to antibiotics.

Mots clés : *C. rosea*, *B. bassiana*, Antimicrobial activity, silver nanoparticles, pathogenic microorganisms.

ملخص

تسبب البكتيريا المقاومة للأدوية المتعددة مشكلة صحية عامة خطيرة والتي أبرزت الأبحاث حول المواد النشطة بيولوجيًا الجديدة (المستقلبات والجسيمات النانوية) التي تنتجها الفطريات الداخلية بشكل أكثر تحديدًا. للتغلب على هذه المشكلة ، يعتمد هذا العمل على النشاط المضاد للميكروبات لسلاطين من *Clonostachys rosea* (G133 ، G312) و *Beauveria bassiana* (Sn 182) ضد الإشريكية القولونية ، الزائفة الزنجارية ، المكورات العنقودية الذهبية ، والمبيضات البيضاء عن طريق المواجهة المباشرة والقرص والبئر. أساليب. أظهر النشاط المضاد للميكروبات بطريقة المواجهة المباشرة أن *C. rosea* و *B. bassiana* يمارسان أنشطة مضادة للجراثيم أكثر أو أقل ضد البكتيريا سالبة إيجابية الجرام. يؤدي *Staphylococcus aureus* ، مقارنة مع *Pseudomonas aeruginosa* و *E.coli* الجرام التأثير المضاد للفطريات لـ *Clonostachys rosea* (G 133 ، G312) ضد المبيضات البيضاء إلى تثبيط نمو الفطريات. بينما لم يظهر *Beauveria bassiana* (Sn 182) أي تأثير على هذه الخميرة. يتم ممارسة هذه الأنشطة إما عن طريق التأثيرات المضادة للتضاد أو عن طريق التنافس على الفضاء والمغذيات. كشف تحديد نشاط المضاد بواسطة طريقة الانتشار القرصي عن قدرة كبيرة لمستخلص الكلوروفورم من *Clonostachys rosea* (G 133 ، G312) و *Beauveria bassiana* (Sn 182) (على تثبيط نمو السلالات المستخدمة مقارنةً بخلات الإيثيل. في وجود *P. aeruginosa*، تم تسجيل منطقة تثبيط مقدارها 8 مم عند التلامس مع مستخلص الكلوروفورم من *C. Rosea* (G 133) ، بينما لوحظ نشاط منخفض (قطر) في وجود *C. I* . استخراج (G312). (يمكن لـ *Clonostachys rosea* و *Beauveria bassiana* تخليق الجسيمات النانوية وخاصة الجسيمات النانوية الفضية ، وقد تم تأكيد القدرة على إنتاج الجسيمات النانوية العامل بواسطة القياس الطيفي المرئي فوق البنفسجي و Zetametry الذي أظهر تباينًا في الحجم (بين 14 و 57 نانومتر) والحمل (4 ente) و 42 . (mv.) لم يلاحظ أي تأثير عند استخدام الجسيمات النانوية بطريقة الانتشار الجيد. من ناحية أخرى ، فإن جزيئات الفضة التي تم تصنيعها بواسطة *C. rosea* (G 133) (تمارس نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد نشاط 11 ملم ضد *C. albicans* . وفقًا لنتائج المضاد الحيوي ، فإن المواد النشطة بيولوجيًا في *C* . من ناحية أخرى ، عند مقارنتها بأفطار مناطق تثبيط المضادات الحيوية الأخرى ، تعتبر أفطار مناطق تثبيط المستخلص الخام صغيرة. وفقًا لهذه النتائج ، قد تمثل سلالة *Clonostachys rosea* (G 133) مصدرًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا الجديدة لحل مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية .

الأساسية الكلمات :جزيئات الفضة النانوية ، نشاط مضاد للميكروبات ، *C. Rosea* ، *B. bassiana* .الكائنات الحية

Liste des abréviations

LPS : Lipo- Poly- Saccharide

AgNP : Nanoparticules d'argent

NPs : les nanoparticules.

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB: Potato Dextrose Broth

ATB: Antibiotique.

AND: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

Liste des figures

Figure 1: Mécanismes d'action des antimicrobiens sur le microorganisme pathogène

Figure 2: Vue microscopique des Blastospores de *B. bassiana*

Figure 3: Des conidies et des hyphes du *Beauveria bassiana* vu en microscopie optique à balayage

Figure 4 : Caterpillar d'*Hypsipyla grandella* présentant des symptômes d'infection par *Beauveria bassiana*

Figure 5 : Observation microscopique de *Clonostachys rosea*. (A) et (B) : *Clonostachys rosea* sur *Sonesimiagrossa*. (C) Conidiophores primaires, phialides et conidies. (D) Conidiophores secondaires, phialides et conidies. (E) Conidies

Figure 6 : Observation macroscopique de *Clonostachys rosea* sur PDA

Figure 7 : Observation macroscopique et microscopique de *Candida albicans*. (A) : Colonies blanches crémeuses (Ahmad, 2017). (B) : blastopores

Figure 8 : Observation macroscopique et microscopique de *S. aureus*. (A) : culture et colonies de *Staphylococcus aureus* doré (Chibi, 2015). (B) : *S. aureus*

Figure 9 : Observation macroscopique et microscopique d'*E. coli*. (A) : Culture et colonies d'*E. coli* sur GN. (B) : *E. coli* sous microscope électronique

Figure 10 : Observation macroscopique et microscopique de *Pseudomonas aeruginosa*. (A) : Colonies de *P. aeruginosa* sur gélose (XLD) (Sibanarayan, 2017), (B) : *P. aeruginosa* fixées sur du verre, par microscopie à balayage électronique

Figure 11. Souches fongiques utilisées : (A) : *Beauveria bassiana* (Sn182), (B et C) : *Clonostachys rosea* (G 312) et (G133)

Figure 12 : Schéma récapitulatif des étapes de fermentation et extraction des substances bioactives des champignons par l'acétate d'éthyle et le chloroforme

Figure 13: Préparation de la culture. (A) Les disques mycéliens de *Clonostachysrosea* (G 312), (B) Dépôt des disques de *C. rosea* dans le milieu PDB

Figure 14 : Fermentation des cultures fongiques. (A) : Flacons de PDB fermés par du papier aluminium contenant les disques mycéliens de *B.bassiana*(Sn182), *C.rosea*(G133), (C312). (B): l'agitation horizontal des Flacons

Figure 15: Filtration du bouillon de culture. (A) : par compresses stériles. (B) : par papiers filtre stérile. (C): Pompe de filtration (micro filtre 0,22 µm)

Figure 16: Centrifugation du filtrat de culture à 1500 tour /min pendent 20 mn

Figure 17 : Extraction avec chloroforme et acétate d'éthyle dans des ampoules à décanter et la récupération de la phase organique

Figure 18 : Evaporation du solvant de la phase organique par rotavapeur (Type BUCHI)

Figure 19 : Les extraits séchés après vaporisation

Figure 20 : La révélation de la présence des nanoparticules d'argent dans les filtrats de culture. (A) : méthode colorimétrique, (B) : Incubation des tubes

Figure 21 : Détection de la présence des nanoparticules par spectrophotométrie (HITACHI U-5100)

Figure 22: Quantification des nanoparticules par Zetamétrie

Figure 23 : L'aspect macroscopique des souches testées

Figure 24 : Technique de diffusion par disque

Figure 25 : L'aspect macroscopique des champignons étudiés

Figure 26 : Résultats du test colorimétrique de la mise en évidence de la présence des nanoparticules d'argents dans les filtrats de cultures des souches fongiques testées. Changement de la coloration du (filtrat+ AgNO₃) de (Sn 182) à gauche, G312 au centre, et G133 à droite

Figure 27 : Des boites de Pétri présentant les résultats de l'activité antagoniste (confrontations directes) exercée par les trois souches fongiques. (A) : *Staphylococcus aureus*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Condida albicans*, (D) : *Escherichia coli*.

Figure 28 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par *Beauveria bassiana*(Sn 182) et *Clonostachys rosea* G133, G312 contre les souches testées par la technique des cylindres d'agar

Figure 29 : Des boites de Pétri montrant les activités antimicrobiennes des trois souches fongiques testées par la technique des disques

Figure 30 : Diamètres des zones d'inhibition déterminés lors de l'utilisation de l'extrait organique acétate d'éthyle de *B. bassiana* (Sn 182) et *C.rosea* G133 et G312

Figure 31 : Diamètre des zones d'inhibition déterminé lors de l'utilisation de l'extrait organique chloroformique de *B. bassiana* (Sn 182) et *C.rosea*G133 et G312

Figure 32 : Des boites de Pétri montrant les activités antimicrobiennes du filtrat but des trois souches fongiques testées par la technique des puits

Figure 33 : Des boites de Pétri montrant les activités antimicrobiennes des filtrats additionnés de nitrate d'argent des trois souches fongiques testées par la technique des puits

Figure 34 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les nanoparticules d'argent des champignons utilisés contre les souches testées par la technique des puits

Figure 35 : Des boites de Pétri montrant les résultats d'antibiogramme exercés par les trois souches bactériennes *P. aeruginosa*, *E.coli* et *S. aureus*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Origine des champignons utilisés

Tableau 2 : Les antibiotiques utilisés pour chaque bactérie

Tableau 3: Le rendement des extraits fongiques

Tableau 4: Identification des nanoparticules dans des filtrats bruts et du filtrats + AgNO₃ par UV à 440nm

Tableau 5: Mesures du Zeta potentiel et de la taille des nanoparticules dans les filtrats additionnés de nitrate d'argent

Tableau 6: Mesures du Zeta potentiel et de la taille des nanoparticules dans les filtrats bruts

Tableau 7: Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme d'*E. coli*.

Tableau 8: Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme de *P. aeruginosa*.

Remercîment

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I.1. ACTIVITE ANTIMICROBIENNE	3
I.1.1. Généralités.....	3
I.1.2. L'origine des antimicrobiens.....	3
I.1.3. Les antimicrobiens	3
I.1.3.1 Les antimicrobiens antivirales	3
I.1.3.2. Les antimicrobiens antibactériens	4
I.1.3.3. Les nanoparticules.....	4
I.1.4. Les mécanismes d'action des antimicrobiens.....	6
I.1.5. Problématiques actuelles liées aux antimicrobiens.....	7
I.2. SOURCES NATURELLE DES ANTIMICROBIENS.....	8
I.2.1. <i>Beauveria bassiana</i>	9
I.2.1.1. Les métabolites produits par <i>Beauveria bassiana</i>	10
I.2.1.2. Mode d'action.....	10
I.2.1.3. Les nanoparticules de <i>Beauveria bassiana</i>	11
I.2.2. <i>Clonostachys rosea</i>	11
I.2.2.1. Mode d'action et le Rôle de <i>C. rosea</i> dans la lutte biologique	13
I.2.2.2. Les nanoparticules de <i>Clonostachys rosea</i>	14
I.3. LES MICROORGANISMES PATHOGENES.....	14

I.3.1. <i>Candida albicans</i>	14
I.3.1.1. Morphologie	14
I.3.1.2. Effet pathologique.....	15
I.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
I.3.2.1. Morphologie	16
I.3.2.2. Effet pathologique	16
I.3.2.3. La résistance aux antibiotiques.....	17
I.3.3. <i>Escherichia coli</i>	17
I.3.3.1. Morphologie	18
I.3.3.2. Effet pathologique.....	19
I.3.3.3. La résistance aux antibiotiques.....	19
I.3.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
I.3.4.1. Morphologie	20
I.3.4.2. Effet pathologique.....	20
I.3.4.3. La résistance aux antibiotiques.....	21
 CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	
II.1. MATERIEL.....	22
II.1.1. Matériel biologique	22
II.1.1.1. Souches fongiques.....	22
II.1.1.2. Les microorganismes pathogènes.....	23
II.1.2. Matériel non biologique	23
II.2. METHODES.....	23
II.2.1. Régénération et purification des souches fongiques.....	23
II.2.2. Caractérisation macroscopique des cultures bactériennes	23
II.2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires	23
II.2.4. Régénération des microorganismes testés	28
II.2.5. Révélation de la présence des nanoparticules totales et des nanoparticules d'argent.....	28
II.2.5.1. Révélation de la présence des nanoparticules totales dans les filtrats de culture fongiques.....	28
II.2.5.2. Révélation de la présence des nanoparticules d'argent dans les filtrats de culture fongiques	28

II.2.7. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne	31
II.2.7.1. Préparation de l'inoculum	31
II.2.7.2. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)	31
II.2.7.3. Techniques des disques et des puits	32
II.2.7.4. Technique des disques	32
II.2.7.5. Technique des puits.....	33
II.2.8. L'antibiogramme	33
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION	
III.1. CARACTERISATION MACROSCOPIQUE DES CULTURES BACTERIENNES.....	35
III.2. CARACTERISATION MACROSCOPIQUE DES CULTURES FONGIQUES.....	35
III.3. LE RENDEMENT DES EXTRAITS FONGIQUES APRES FERMENTATION	36
III.3. REVELATION DE LA PRESENCE DES NANOPARTICULES TOTALES ET DES NANOPARTICULES D'ARGENT	36
III.3.1. Colorimétrie	36
III.3.2. Identification par UV – Visible	37
III.3.3. Zetamétrie	37
III.3. LA MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	38
III.3.1. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)	38
III.3.2. Techniques des disques et des puits	40
III.3.2.1. Technique des disques.....	40
III.3.2.2. Techniques des puits	42
III.3. L'ANTIBIOGRAMME.....	44
CONCLUSION	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	53
ANNEXES	

INTRODUCTION

Introduction

Le développement des méthodes d'analyses utilisées dans le domaine de la biotechnologie, le nombre de produits naturels découverts ces dernières années dépasse un million, environ 5% sont d'origine microbienne (Hyde soytong, 2008).

Depuis leur découverte, les agents antibactériens se sont révélés très précieux dans la lutte contre les maladies d'origine bactérienne touchant l'homme. Les antibiotiques avaient suscité un grand espoir de voir les maladies infectieuses à éradiquées, révolutionné la médecine moderne et a fortement diminué la souffrance humaine. Malheureusement l'émergence de microorganismes résistants aux traitements a mis un terme à cette vague d'optimisation (Walger, 2016).

La résistance aux antibiotiques s'est progressivement développée et concerne aujourd'hui l'ensemble des bactéries pathogènes tel que' *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus*, ces bactéries sont soit naturellement résistantes aux antibiotiques ou bien ont développé des mécanismes de résistance (Vincent, 2011).

En effet, la solution était de développer ou chercher des alternatives et de nouvelles molécules antimicrobiennes pour contrer les résistances microbiennes (AKoua et *al.*, 2004, Guessennd et *al.*, 2004). Bien que des recherches ont montré un immense potentiel des microorganismes et plus spécialement les champignons ont reçu une attention considérable et sont maintenant considérés comme étant une source riche de nouveaux métabolites secondaires biologiquement actifs (Zhang et *al.*, 2006). Ces molécules bioactifs sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques d'environnement (AbuSeidah, 2003). Certaines espèces endophytes produisent ces métabolites comme *Clonostachys rosea*, qui sont connus pour influencer la croissance et le développement des plantes, ainsi que les interactions avec d'autres organismes. Certains métabolites secondaires sécrétés par cette espèce peuvent interférer avec la croissance des agents pathogènes (Samsudin et *al.*, 2017). *Beauveria bassiana* qui est bien connu pour produire une vaste gamme de métabolites biologiquement actifs tel que beauvericines et les boversetines agissant comme des antibactériens (Marcelo et *al.*, 2017 ; Berestetskiya et *al.*, 2018).

Les nanoparticules et plus spécialement les nanoparticules d'argent (AgNPs) ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de leur utilisation potentielle dans des applications biomédicales telles que la lutte contre les infections et les activités antibactériennes et antifongiques (Yongqing et *al.*, 2013). *B. bassiana* et *C.rosea* produisent des nanoparticules qui peuvent être utilisés comme substances antimicrobiennes contre les germes multirésistants.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif est basé sur l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique de l'extrait brut de *Clonostachys rosea* et de *Beauveria bassiana*.

CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Activité Antimicrobienne

I.1.1. Généralités

L'activité antimicrobienne c'est l'effet d'un agent antimicrobien sur les microorganismes, en inhibant leur prolifération ou en induisant leur mort cellulaire. Lorsque l'agent antimicrobien est capable de tuer le microorganisme, on dit qu'il est **bactéricide** pour les bactéries, fongicide pour les champignons, virucide pour les virus, etc. Lorsqu'il inhibe la prolifération du microorganisme, on dit plutôt qu'il est **bactériostatique**, fongistatique, etc. Pour simplifier le texte, les termes bactéricide et bactériostatique seront utilisés pour l'ensemble des microorganismes tués ou inhibés (Petitpas, 2018).

I.1.2. L'origine des antimicrobiens

Les antimicrobiens sont des substances chimiques qui peuvent être naturels, c'est-à-dire des métabolites isolés directement d'organismes vivants tels que les végétaux et les microorganismes (bactéries, champignons, micro-algues, etc...). Ils peuvent être aussi semi-synthétiques, le résultat d'une modification d'une molécule naturelle pour augmenter son efficacité, sa spécificité, son spectre d'action ou encore pour diminuer les effets secondaires sur la santé humaine. Certaines sont aussi synthétiques, c'est-à-dire produits par synthèse organique en laboratoire (Dhanasekaran et *al.*, 2015).

I.1.3. Les antimicrobiens

Le terme agent antimicrobien est un terme général qui englobe tous les agents antibactériens, antifongiques, antiviraux, et antiparasitaires (VanMeter et *al.*, 2015).

I.1.3.1. Les antimicrobiens antivirales

Les infections virales sont souvent mortelles et sont la cause de l'émergence de résistance aux médicaments et la recherche de composés antiviraux efficaces revêt d'une importance particulière. De nombreux agents antiviraux sont rapportés chez les microorganismes pour but de lutter contre les virus et sa résistance comme le champignon *Aspergillus fumigatus* et *Pleospora tarda* qui inhibent le virus de l'herpès simplexe par leur métabolites : l'alternariol et alternariol- (9) –méthyléther (Singh et Dubey, 2015).

I.1.3.2. Les antimicrobiens antibactériens

La fréquence croissante des souches pathogènes multi résistantes a limité l'effet d'un traitement antibactérien traditionnel, ce qui implique le besoin de nouveaux agents thérapeutiques contre les maladies infectieuses (Zhang et *al.*, 2012).

La communauté scientifique a montré un vif intérêt pour l'exploration de microorganismes endophytes associées aux plantes médicinales pour des applications biotechnologiques au cours des dernières décennies tel que *Fusarium sp* et *Alternaria sp*.

Actuellement, de nombreux composés antibactériens avaient été isolés et caractérisés à partir d'une source naturelle, tels que les alcaloïde, peptides, stéroïdes, terpénoïdes, phénols, quinine et flavonoïdes (Zhang et *al.*, 2012). Il existe d'autres molécules possédant cette propriété antimicrobienne tel que les nanoparticules qui sont également considérés comme agents antibactériens et antifongiques (Wang et *al.*, 2017).

I.1.3.3. Les nanoparticules

L'organisation Internationale de Normalisation (ISO 2008) définit le terme nanomatériau comme un matériau avec des dimensions externes à l'échelle nanométrique ou ayant une structure interne ou structure de surface à l'échelle nanométrique (gamme de taille approximative 1 nm à 100 nm). Les nanoparticules (NPs) ont suscité l'intérêt en raison de leurs petites tailles, présentant des propriétés émergentes comme les points quantiques ou des propriétés optiques non linéaires, thermiques, électriques et chimiques (Dadi, 2019).

Les nanoparticules se trouvent de différente nature: les nanoparticules à base de carbone, les métaux, les oxydes métalliques et les nanoparticules d'inspiration biologique. Ces nanoparticules regroupent des structures dans lesquelles une substance biologique est encapsulée, emprisonnée ou absorbée à la surface, les lipides, les peptides et les polysaccharides utilisés comme vecteurs pour le transport ciblé de médicaments, récepteurs, agents chimiques en imagerie médicale ou encore acides nucléiques(El-Shanshoury et *al.*,2011).

-Les approches de synthèse

Le principal défi dans la synthèse de nanomatériaux est le contrôle de leurs caractéristiques telles que la distribution de taille des particules, la forme, la morphologie, la composition

chimique et la structure cristalline. Il existe un nombre considérable de méthodes de synthèse des nanoparticules dans la littérature telle que la technique « top-down et bottom-up » et l'approche vert et non-vert (Vigneshwaran et *al.*, 2006).

-La synthèse verte des nanoparticules du champignon

Les méthodes biologiques peuvent être utilisés pour synthétiser des nanoparticules d'argent sans l'utilisation de substances chimiques coûteuse et toxiques (Husseiny et *al.*, 2006).

La bio-réduction d'ions métalliques par des combinaisons des biomolécules présentes dans les extraits de certains organismes (enzymes/protéines, acides aminés, polysaccharides, vitamines) sont inoffensifs pour l'environnement. Le mécanisme de production de nanoparticules d'argent par les champignons suit les étapes suivantes : piégeage des ions Ag^+ à la surface des cellules fongiques et réduction subséquente des ions d'argent par les enzymes présentes dans le système fongique (Jha et *al.*, 2009). Les enzymes extracellulaires telles que des naphthoquinones et anthraquinones facilitent la réduction.

-La caractérisation des nanoparticules par les méthodes expérimentales

La formation et la caractérisation des nanoparticules métalliques peut être étudié par plusieurs techniques expérimentales, telle que la spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), les microscopies: électronique à balayage (SEM), à force atomique (AFM) ou la diffraction des rayons X.

-Le rôle et les applications des nanoparticules

Les nanoparticules sont d'un grand intérêt en raison de leur très petite taille et grande surface à rapport volumique, qui conduisent à la fois à des différences chimiques et physiques de leurs propriétés par rapport à la masse de même composition chimique, tel que mécanique, biologique et propriétés stériques, l'activité catalytique, la conductivité thermique et électrique, l'absorption optique et le point de fusion par exemple les nanoparticules d'argent ont également de nombreuses applications notamment dans la pharmacie et la médecine.

Les nanoparticules d'argent peuvent être considéré comme un traitement de la dermatite, inhibition la réplication de VIH-1, un traitement de la colite ulcéreuse et l'acné, et aussi comme agent antimicrobien très efficaces contre les organismes infectieux, ensuite les

nanoparticules jouent un rôle important dans l'imagerie moléculaire des cellules cancéreuses (Wang et *al.*, 2017).

Les nanoparticules peuvent toutefois présenter une efficacité antimicrobienne qui leur est propre en fonction de leur taille et de leur forme. Ainsi Kowshik et *al.* (2003) ont observé que seules les nanoparticules d'argent dont le diamètre est compris entre 1 et 10 nm interagissent avec différentes bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *V. cholera* et *S. typhus*) en inhibant la viabilité cellulaire (Kowshik et *al.*, 2003)

I.1.4. Les mécanismes d'action des antimicrobiens

Les composés antimicrobiens affectent la viabilité des cellules de bactéries, des moisissures et des levures et autres pathogènes par différents mécanismes d'actions. Dans la plupart des cas, la structure et les groupes fonctionnels présents chez les molécules antimicrobiennes expliquent pourquoi elles ont des cibles moléculaires distinctes (Sun et *al.*, 2015). Cependant, dans tous les cas, les antimicrobiens agissent sur des processus essentiels à la survie ou à la prolifération du ou des microorganismes ciblés. Selon le processus qu'ils inhibent, les antimicrobiens peuvent être séparés en plusieurs catégories de mécanismes d'actions. Plusieurs agents antimicrobiens agissent au niveau de :

- la synthèse de la paroi cellulaire (comme les pénicillines et les céphalosporines)
- la synthèse des protéines en inhibant une étape de la traduction (aminoglycosides)
- la traduction de l'ARN messager en protéine.
- la réplication et de la transcription de l'ADN (comme les quinolones)
- l'intégrité de la membrane cellulaire des microorganismes (les polymixines)
- Bloquant les lipopolysaccharides (LPS) des endotoxines retrouvées à la surface de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif.
- D'interférer dans l'une des voies métaboliques essentielles chez le microorganisme, soit la voie de synthèse de l'acide folique, un précurseur des nucléotides (**Figure 1**) (Sun et *al.*, 2015).

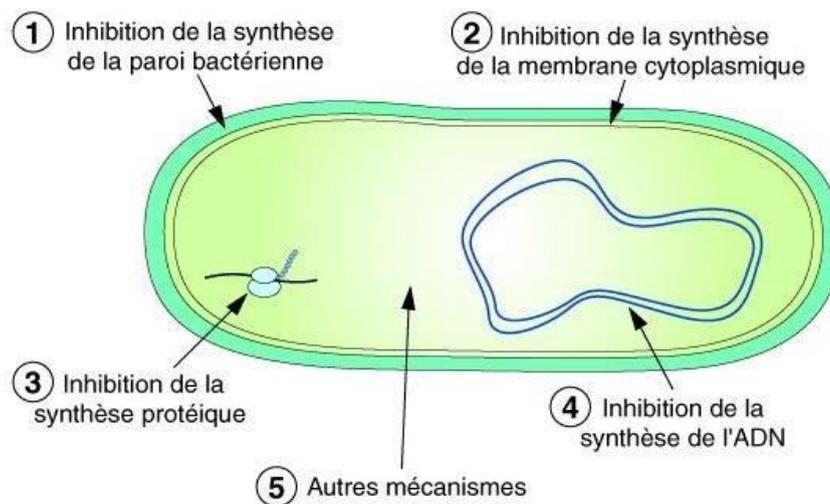


Figure1: Mécanismes d'action des antimicrobiens sur le microorganisme pathogène (Moroni, 2007).

I.1.5. Problématiques actuelles liées aux antimicrobiens

Partout dans le monde, les infections bactériennes, fongiques à levure font partie des principales causes de décès chez l'humain. Ces infections représentent un défi de taille dans le secteur de la santé publique et celui-ci est accentué par l'émergence constante de microorganismes résistants aux antimicrobiens conventionnels. En effet, l'évolution par des modifications génétiques chez les microorganismes, favorise leur survie. Par exemple, le microorganisme peut devenir résistant suite à la modification de la cible moléculaire de l'antimicrobien ou encore par l'expression de nouvelles enzymes capables de bloquer l'activité de l'antimicrobien (Ventola, 2015).

Ce phénomène de résistance acquise a été perçu pour la première fois dans les années 1940 chez la bactérie *Staphylococcus aureus* suite à l'introduction de la pénicilline G en clinique, ces efforts ont cependant mené à l'émergence de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthériciline (SARM), l'une des plus importantes sources d'infection en milieu hospitalier (Shrestha et al., 2012).

Plusieurs ouvrages suggèrent que ce problème est causé principalement par la prescription abusive d'antibiotiques, ainsi que l'utilisation intensive d'agents antimicrobiens dans les dernières décennies (Ventola, 2015).

La synthèse de molécules synthétiques ayant des propriétés antimicrobiennes est souvent plus coûteuse et ces molécules peuvent avoir des répercussions importantes sur

l'environnement et les écosystèmes (Chen et *al.*, 2014). Ces problèmes motivent plus particulièrement le développement d'antimicrobiens d'origine naturelle qui ayant de nouveaux mécanismes d'action pour lesquels les microorganismes n'ont pas développé de résistance et plus précisément des molécules ayant une forte sélectivité pour les cellules de microorganismes pathogènes afin d'éviter les effets secondaires et la toxicité chez les cellules mammifères (Farha et *al.*, 2016).

Dans ce contexte, nous avons sélectionné deux champignons endophytes *Beauveria bassiana*, *Clonostachys rosea*, qui pourraient avoir des antimicrobiens possédants de nouveaux mécanismes d'action sur les microorganismes pathogènes.

I.2. Sources naturelle des antimicrobiens

I.2.1. *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana a été découverte par Agostino Bassi di Lodi en 1834 en tant que pathogène causant la muscardine blanche du ver à soie (*Bombyx mori*). L'identification initiale a été faite par Balsamo-Crivellis comme étant *Botrytis bassiana*, tandis que Spegazzini l'a appelé *Sporotrichum Globoliferum*, mais nommée plus tard *B. bassiana* par Vuillemin en 1912 (Lipa et *al.*, 2017).

Selon Huang et *al.* (2002.), *Beauveria bassiana* appartient à :

- Monde : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Classe : *Sordariomyceta*
- Ordre : *Hypocreales*
- Famille : *Cordycipitaceae*
- Genre : *Beauveria*
- Espèce : *Beauveria bassiana*

C'est un champignon entomopathogène qui peut être isolé à partir des cadavres d'insectes ou du sol dans les zones boisées (Beilharz et *al.*, 2002). Il produit des colonies qui se développent relativement lentement et peuvent apparaître poudreuses ou laineuses, avec des couleurs allant du blanc au jaune et parfois rosées, les hyphes aériens (conidiophores) sont septés, lisses, hyalins et d'une largeur d'environ 2 µm à extrémité terminale en zigzag formant

de façon sympodiale de petites spores unicellulaires (Figure 2). Les hyphes submergés sont structurés de la même façon, mais plus grands (1,5 à 3 μm) (Saranraj et Jayaprakash, 2017).

Les conidies sont produites sur des épis courts donnant un aspect épineux aux cellules conidiogènes. En condition aérobie, le champignon produit des conidiospores de forme sphériques (1-4 μm de diamètres) et en condition anaérobie où il produit de blastospores de forme ovales (2-3 μm de diamètre) (Figure 3). Les blastospores sont aussi infectieux que les conidiospores (Sabbahi, 2008).

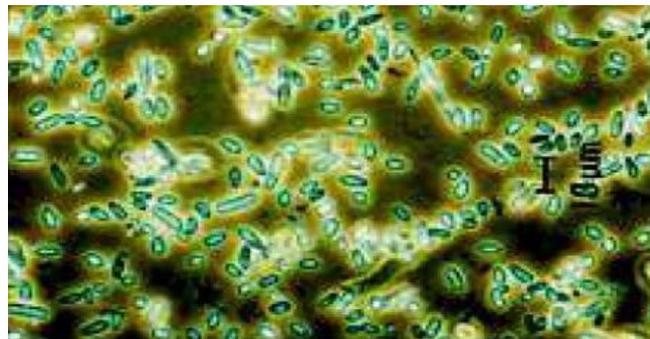


Figure 2 : Vue microscopique des Blastospores de *B. bassiana* (Halouane, 2008)

Ce champignon croît et sporule sur une large variété de milieux de culture et peut être conservé à des températures de 5 à 8°C sans toutefois perdre sa viabilité et sa capacité de sporulation (Tong-kwee et *al.*, 1989).



Figure 4 : Caterpillar d'*Hypsipyla grandella* présentant des symptômes d'infection par *Beauveria bassiana*(Marcelo et *al.*, 2017).

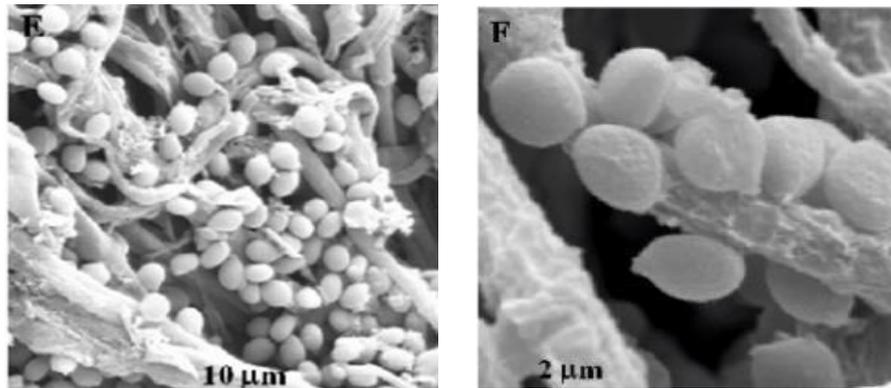


Figure 3 : Des conidies et des hyphes du *Beauveria bassiana* vu en microscopie optique à balayage (Marcelo et al., 2017)

I.2.1.1. Les métabolites produits par *Beauveria bassiana*

B. bassiana est bien connu pour produire une vaste gamme de métabolites biologiquement actifs. Il existe principalement des composés organiques volatils, des alcaloïdes (tennéline, bassianine, pyridovéricine, pyridomacrolidine), des pigments non peptidiques (oosporéine), des cyclodepsipeptides non synthétisés par le ribosome (beauvericines et allobévericines, bassianolides et beauveriolides) (Marcelo et al., 2017).

I.2.1.2. Mode d'action

B. bassiana est utilisé comme insecticide biologique pour lutter contre un certain nombre d'organismes nuisibles, tels que les coleoptères, les hyménoptères, les lépidoptères, les hétéroptères, les homoptères et les diptères (keswani et al., 2015). Comme chez d'autres champignons entomopathogènes, les espèces de *Beauveria* attaquent leurs insectes hôtes par voie percutanée. Lorsque l'insecte meurt, le champignon sécrète un antibiotique pigmenté rouge, l'oosporéine, qui lui permet de surmonter la compétition des bactéries saprophytes dans le tube intestinal de l'insecte (Inglis et al., 2001). Il est connu que *B. bassiana* produit plusieurs métabolites secondaires tels que beauvericines et les boversetines agissant comme antibactérien notamment chez les *Bacillus subtilis*, *Candida tropicalis* et *E. coli* (Berestetskiya et al., 2018).

I.2.1.3. les nanoparticules de *Beauveria bassiana*

Beuaveria bassiana comme tous les autres microorganismes à la capacité de produire différents nanoparticules tal que las nanoparticules d'argent (Najitha Banu et Balasubramanian, 2014) et les nanoparticules de Zinc (Khooshe-Bast et *al.*, 2016). Ces derniers peuvent toutefois présenter une efficacité antimicrobienne qui leur est propre en fonction de leur taille et de leur forme sur différentes microorganismes pathogènes. Cette capacité de synthèse des nanoparticules serait avantageuse pour le développement de nanoparticules métalliques propres, rentables, non toxiques et acceptables pour l'environnement (Prabakaran et *al.*, 2016). Les nanoparticules d'argent de *B. bassiana* jouent un rôle majeur dans la lutte antibactérien contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et aussi antifongiques (*Aspergillus brasiliensis*), et dans la lutte contre les insectes comme le vecteur de la dengue *Ae. Aegypti* (Najitha.A et *al.*, 2014)

I.2.2. *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea est un hyphomycète qui produit des conidies unicellulaires dans des formes conidiophores pénicillées ou verticillées (**Figure 5**) (Rodrigo et *al.*, 2015).

Selon Forin et *al.* (2020), *Clonostachys rosea* appartient à :

- Monde : *Fungi*
- Phylum: *Ascomycota*
- Classe: *Sordariomycetes*
- Ordre: *Hypocreales*
- Famille: *Bionectriaceae*
- Genre: *Clonostachys*
- Espèce: *Clonostachys rosea*

Ce champignon est présent dans divers habitats, notamment dans les régions tropicales, tempérées, désertiques et subarctiques. Il a été signalé dans des prairies et des terres boisées cultivées, des forêts, des landes, des eaux douces et des sols côtiers, en particulier ceux à pH neutre à alcalin. Bien qu'il soit naturellement présent dans le sol, le champignon peut coloniser les débris végétaux et les tiges, les feuilles, les fruits, les graines et les racines des mauvaises herbes et des cultures (Sutton et *al.*, 1997).

En outre, ce champignon est un endophyte isolé à partir des racines de palmier dattier d'Alicante Espagne (Mohamed Mahmoud et *al.*, 2017).

C. rosea peut produire un grand nombre de spores adhésives qui adhèrent à la transmission des nématodes et infectent ou tuent l'hôte. *Clonostachys rosea* digère les matériaux dans le sol en tant que saprophyte et est également connu comme parasite des champignons et des nématodes (Toledo et *al.*, 2006).

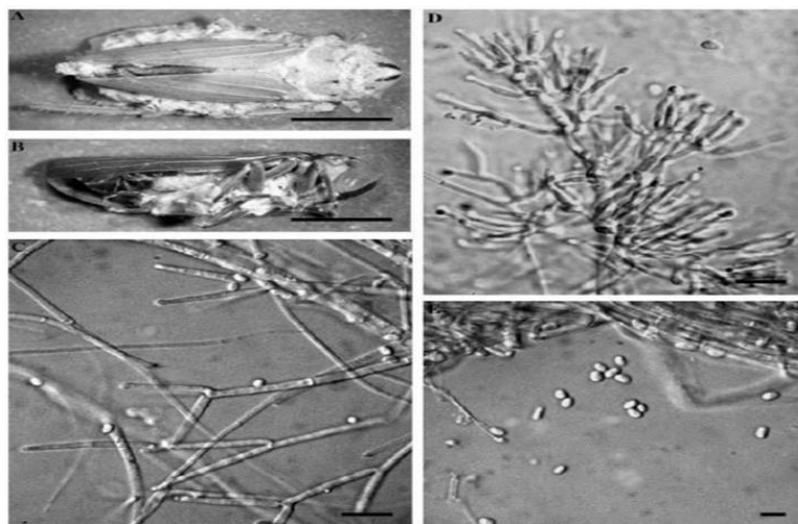


Figure 5 : Observation microscopique de *Clonostachys rosea*.(A) et (B) : *Clonostachys rosea* sur *Sonesimiagrossa*. (C) Conidiophores primaires, phialides et conidies. (D) Conidiophores secondaires, phialides et conidies. (E) Conidies (Toledo et *al.*, 2006).

Les couleurs des colonies de *C. rosea* varient selon les conditions. Les colonies sont blanc grisâtre dans un environnement plus sombre, mais semblaient jaunes à orange dans des conditions plus claires sur un milieu gélose au dextrose de pomme de terre (Figure 6) (Sutton et *al.*, 1997).

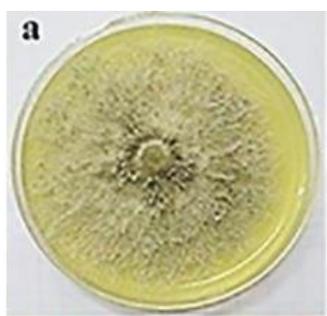


Figure 6 : Observation macroscopique de *Clonostachys rosea* sur PDA (Gharizadaetal.,2004).

I.2.2.1. Mode d'action et le Rôle de *C. rosea* dans la lutte biologique

En tant qu'excellent agent biologique, *C. rosea* joue un rôle crucial dans le contrôle biologique de nombreux types d'agents pathogènes. À ce jour, *C. rosea* a été signalé comme agissant contre de nombreux agents pathogènes fongiques des plantes (Samsudin et al. 2017). *Clonostachys rosea* présente également une capacité de lutte biologique contre les nématodes et des insectes (Rodríguez-Martínez et al., 2018).

Le mécanisme de contrôle biologique de *C. rosea* contre les agents pathogènes est principalement attribué à la sécrétion des enzymes dégradant la paroi cellulaire, à la production de métabolites secondaires tels que les antibiotiques et les toxines, et à l'induction de la résistance des plantes (Chatterton et Punja 2009 ; Fatema et al., 2018).

Bien que les métabolites secondaires produits par les champignons ne soient pas essentiels, ils sont connus pour influencer la croissance et le développement des plantes, ainsi que les interactions avec d'autres organismes. Certains métabolites secondaires sécrétés par *C. rosea* peuvent interférer avec la croissance des agents pathogènes (Samsudin et al., 2017).

Les métabolites secondaires, y compris les bisorbicillinoïdes et les TMC-151 C et E dérivés de *C. rosea*, ont montré une puissante activité antibactérienne contre six bactéries différentes, dont *B. megaterium*, *B. subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus tetragenus*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* (Zhai et al., 2016). Quatre composés obtenus à partir de *C. rosea*, la 11'-désoxyverticilline A, la verticilline A, Sch52900 et Sch52901, agissent contre *C. elegans* et *P. redivivus* (Dong et al., 2005).

De plus, de nouveaux métabolites peptaibiotiques ont été isolés de *C. rosea* et ont présenté une activité antifongique contre *S. sclerotiorum* (Rodríguez et al., 2011). La perturbation d'un gène codant pour la polykétidesynthase chez *C. rosea* a entraîné une perte de la capacité de produire les polykétidesclonoroséines A et B, auparavant inconnues, qui présentaient une activité antifongique contre *B. cinerea* et *F. graminearum* (Fatema et al., 2018).

Dans la littérature scientifique disponible, on ne trouve aucun rapport suggérant que le *C. rosea* puisse causer des effets néfastes sur des animaux et l'homme (Copping, 2004).

I.2.2.2. les nanoparticules de *Clonostachys rosea*

Clonostachys rosea peut produire une grande variété de nanoparticules en métal, tels que les nanoparticules d'argent qui sont l'un des nanoparticules les plus populaires et les plus utilisés. La formation de nanoparticules se produit de manière intracellulaire dans les mycéliums vivants de *Clonostachys rosea*. Cette propriété de synthèse des nanoparticules ayant un effet antimicrobien a mis en jeu l'utilisation de *Clonostachys rosea* avec succès comme agent de lutte biologique contre des pathogènes végétaux divergents (Bharath et al., 2020). Ces nanoparticules Présentent des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* et contre *Candida albicans* (Zhai, M et al., 2016).

I.3. Les microorganismes pathogènes

I.3.1. *Candida albicans*

Candida albicans est une levure qui appartient à la flore commensale des individus sains, mais qui, lorsque le fragile équilibre entre le parasite et l'hôte est rompu, devient opportuniste et colonise les surfaces mucocutanées et les cavités orales et gastro-intestinales de nombreux mammifères. Chez l'homme, cette levure constitue un sérieux problème de santé, notamment chez des patients immunodéprimés et ceux sous thérapies immunosuppressives. En effet, ces dernières affectent les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les monocytes/macrophages, qui constituent la première et unique ligne de défense de l'hôte immunodéprimé (Lagane, 2007).

Selon Tan et al., (2010), *Candida albicans* appartient à :

- Monde : *Fungi*
- Phylum : *Ascomycota*
- Classe : *Saccharomycetes*
- Ordre : *Saccharomycetales*
- Famille : *Debaryomycetaceae*
- Genre : *Candida*
- Espèce : *Candida albicans*

I.3.1.1. Morphologie

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes se reproduit de façon

asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) formant ainsi des colonies blanches crémeuses (Figure 7) (Graser et *al.*, 1996).

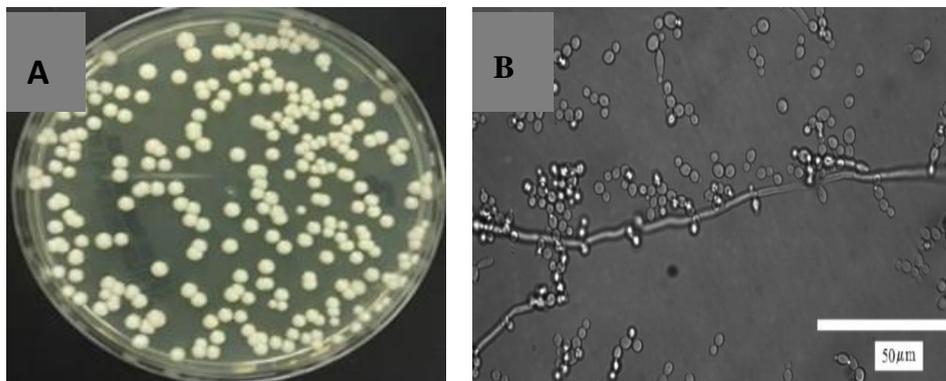


Figure 7 : Observation macroscopique et microscopique de *Candida albicans*. (A) : Colonies blanches crémeuses (Ahmad, 2017). (B) : blastospores (Prasanna,2006).

I.3.1.2. Effet pathologique

La candidose est une infection due à *Candida albicans*, qui se manifeste par des lésions cutané muqueuses, une fongémie et parfois une infection focale de divers organes. Les symptômes dépendent du site d'infection et comprennent une dysphagie, des lésions de la peau et des muqueuses, une cécité, des symptômes vaginaux (un prurit, des brûlures, des leucorrhées), de la fièvre, un choc, une oligurie, une insuffisance rénale et une coagulation intravasculaire disséminée. Le traitement repose sur l'amphotéricine B, le fluconazole, les échinocandines, le voriconazole ou le posaconazole (Sanjay, 2019).

I.3.2. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries ubiquitaires présentes sur la peau, les muqueuses et la sphère rhinopharyngée chez les animaux à sang chaud (mammifères, oiseaux) et en particulier chez l'homme. Les staphylocoques producteurs de coagulase sont responsables de mammites cliniques et sub-cliniques chez les vaches et chez les autres ruminants (Jaishri et *al.*,2016).

Selon Cole et *al.*,(2019),*S. aureus* appartient à :

- Domaine :*Bacteria*
- Phylum : *Firmicutes*
- Classe :*Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille :*Staphylococcaceae*

- Genre : *Staphylococcus*
- Espèce : *Staphylococcus aureus*

I.3.2.1. Morphologie

S. aureus est une coque à coloration de Gram positive. Il mesure de 0,5 à 1 µm de diamètre, ne sporule pas, est immobile, aéro-anaérobie facultatif et possède une catalase et une coagulase. *S. aureus*, espèce type du genre *Staphylococcus*, parfois appelée staphylocoque doré, produit de nombreuses toxines dont les entérotoxines staphylococciques, produites par certains *S. aureus* et qui sont responsables d'épidémies liées à cette bactérie (Figure 8) (Prescott et al., 2002).

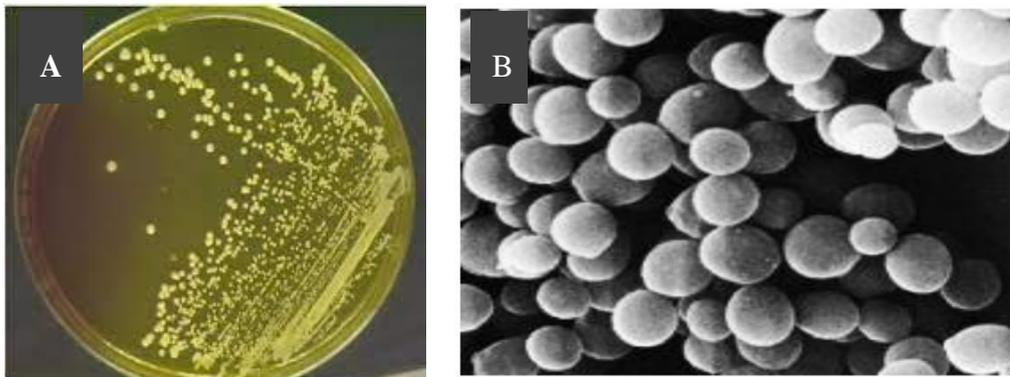


Figure 8 : Observation macroscopique et microscopique de *S. aureus*. **(A) :** culture et colonies de *Staphylococcus aureus* doré (Chibi, 2015). **(B) :** *S. aureus* (Prescott et al., 2002).

I.3.2.2. Effet pathologique

Il est responsable d'infections suppuratives superficielles et profondes ainsi que de syndromes liés à l'action de toxines (Isabelle et al., 2000).

- **Infections suppuratives superficielles et profondes :** *S. aureus* est principalement responsable d'infections suppuratives loco-régionales, de septicémies, d'endocardites, de pneumopathie, d'ostéomyélites, d'arthrites, de méningites ou d'infection urinaire (Isabelle et al., 2000).
- **Infections non suppuratives d'origine toxique :** Les toxémies staphylococciques sont l'apanage de l'espèce *S. aureus* : syndromes cutanés staphylococciques, choc toxique staphylococcique et intoxication alimentaire.
- **Intoxications alimentaires :** Par opposition, les intoxications alimentaires sont dues à l'ingestion d'une toxine préformée dans un aliment contaminé (les entérotoxines). Ces

toxines thermostables sont produites par les souches de *S. aureus* contaminant l'aliment (Isabelle, V. et al., 2000).

- **Maladies possiblement liées aux toxines staphylococciques** : En dehors de ces pathologies, les toxines super antigéniques staphylococciques pourraient être impliquées dans l'étiologie du syndrome de Kawasaki, la mort subite du nourrisson et semblent au moins représenter un facteur aggravant de l'eczéma atopique. (Isabelle, V. et al., 2000).

I.3.2.3. La résistance aux antibiotiques

S. aureus est sensible naturellement envers tous les antibiotiques comme l'aztréonam, colistine et à l'acide nalidixique. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines.

S. aureus sont également résistants aux fluoroquinolones, macrolides, fosfomycine et tétracyclines grâce à la complexité de son génome et le pouvoir d'acquisition d'éléments génétiques mobiles sans oublier les mutations spontanées (Grace et Fesch, 2018).

I.3.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des animaux à sang chaud. La plupart des souches sont inoffensives. Certaines en revanche, comme *E. coli* producteur de shigatoxines, peuvent provoquer de graves maladies d'origine alimentaire. La transmission à l'homme passe principalement par la consommation d'aliments contaminés, comme de la viande hachée crue ou mal cuite, du lait cru, des légumes crus et des graines germées contaminés (Oulymata, 2007).

Selon Wadley et al. (2019), *Escherichia coli* appartient à :

- Domaine : *Bacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *Escherichia*
- Espèce : *Escherichia coli*

I.3.3.1. Morphologie

Escherichia coli ou colibacille est une bactérie asporulée mesurant 2 à 4 μm de long sur 0,4 à 0,6 μm de large à coloration de Gram négative. C'est une bactérie fine et allongée à extrémité arrondie, mobile grâce à une ciliature péritriche. Ce germe, non exigeant sur gélose ordinaire, il donne des colonies lisses, brillantes et homogènes. Sa température de croissance optimale est de 37 °C (Figure 9) (Oulymata, 2007).

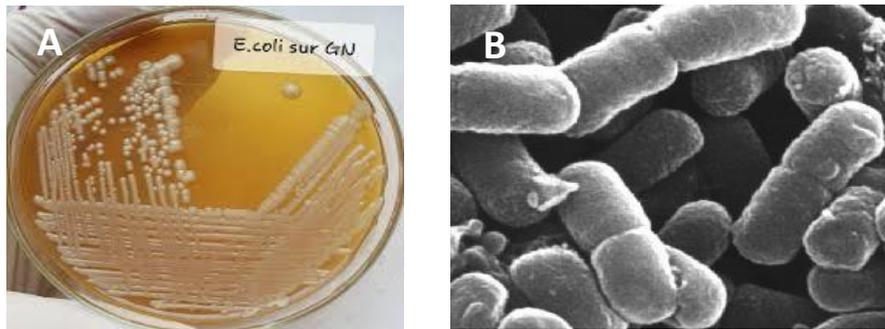


Figure 9 : Observation macroscopique et microscopique d'*E. coli*. (A) : Culture et colonies d'*E. coli* sur GN. (B) : *E. coli* sous microscope électronique (Avrilet *al.*,2000).

I.3.3.2. Effet pathologique

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont capables de se multiplier et de persister dans le tractus digestif de l'hôte en contournant les défenses immunitaires et d'induire des dommages cellulaires. L'étude des différents modes d'interactions entre l'hôte et la bactérie lors des infections permet de classer les souches d'*E. coli* pathogènes en deux principaux pathotypes regroupant les pathogènes extra intestinaux (ExPEC), responsables d'infections urinaires, de méningites chez les nouveau-nés ou de septicémies et les pathogènes intestinaux (InPEC) responsables de maladies entériques. *E. coli* peut provoquer une prostatite et une maladie pelvienne inflammatoire. Certaines souches d'*E. Coli* acquies des gènes qui favorisent les infections intestinales (KernBenaibout, 2006).

D'autres souches sont susceptibles d'entraîner une infection extra-intestinale si les barrières intestinales anatomiques normales sont rompues (par exemple, par une ischémie, une maladie intestinale inflammatoire, ou un traumatisme), des infections hépatobiliaires, péritonéales, cutanées et pulmonaires sont également possibles. Une bactériémie à *E. coli* peut également se manifester sans point de pénétration évident (Larry, 2020).

I.3.3.3. La résistance aux antibiotiques

E. coli est sensible à beaucoup d'antibiotiques tel que le céfazoline, le céftriaxone et céfixitine mais l'acquisition de la résistance à un large spectre d'antibiotiques est très fréquente surtout en milieu hospitalier, elle est résistante à certains antibiotiques mais à des fréquences différentes. Elle résiste beaucoup plus également à l'amoxicilline, au sulfaméthoxazole-triméthopime, à l'association amoxicilline-acide clavulanique, à la ciprofloxacine, à la gentamicine, aux nitrofuranes, à l'amikacine, à la fosfomycine et à la céphalosporine de troisième génération « C3G » par production de β -lactamases à spectre élargi « BLSE » (Arsalane et al., 2014).

I.3.4. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie qui provoque des infections aiguës ou chroniques, parfois graves et mortelles. Elle sévit particulièrement en milieu hospitalier et expose les patients présentant un faible système immunitaire. La résistance croissante de certaines souches de cette bactérie aux antibiotiques fait de ces infections un véritable problème de santé publique.

Selon Winstanley et al. (2009), *Pseudomonas aeruginosa* appartient à :

- Domaine : *Bacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Classe : *Gammaproteobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*

I.3.4.1. Morphologie

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobic strict, non sporulé, fin, mobile grâce à une ciliature polaire. Sa culture est aisée, entre 10°C et 42°C, Les colonies peuvent présenter différentes morphologies (morphotypes). Dans leur grande majorité, les souches cliniques se développent sur les milieux gélosés sous la forme de colonies lisses, bombées et de taille moyenne (1-2 mm après 18heures d'incubation) (Figure 10).

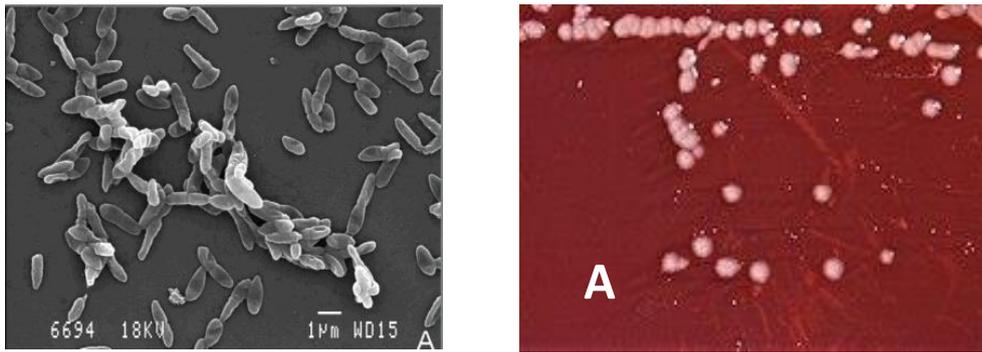


Figure 10 : Observation macroscopique et microscopique de *Pseudomonas aeruginosa*. **(A)** : Colonies de *P. aeruginosa* sur gélose (XLD) (Sibanarayan, 2017), **(B)** : *P. aeruginosa* fixées sur du verre, par microscopie à balayage électronique (Deligianni et al., 2010).

I.3.4.2. Effet pathologique

La plupart des infections à *P. aeruginosa* apparaissent chez le patient hospitalisé, particulièrement ceux qui ont une neutropénie ou qui sont affaiblis ou immunodéprimés. *P. aeruginosa* est une cause fréquente d'infection en unité de soins intensifs (USI). Les patients infectés par le VIH et ceux qui présentent une mucoviscidose sont à risque de développer des infections à *P. aeruginosa* contractées en ville (Berthelot et al., 2005).

P. aeruginosa se développe dans de nombreux sites, notamment la peau, le tissu sous-cutané, les os, les oreilles, les yeux, les voies urinaires, les poumons et les valvules cardiaques. Le siège varie suivant la porte d'entrée et la réceptivité particulière du patient (Maria, 2020).

I.3.4.3. La résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est naturellement résistante aux pénicillines, aux céphalosporines de première et deuxième génération, et à la kanamycine Tétracycline, céfotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, ciprofloxacine, Ertapénème et Triméthoprime (Banerjee et al., 2000 ; Poole, 2004). Et elle a également de nouvelle résistance acquise qui fait appel à plusieurs mécanismes : Hyper-expression de la bêta-lactamase naturelle, acquisition d'enzyme plasmidique (pénicillinase, BLSE, carbapénémase), modification des cibles. Les phénomènes d'efflux actifs procurent une résistance croisée entre les bêtalactamines et les fluoroquinolones (Bouskraoui et al., 2017).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

Le présent travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne de trois champignons vis-à-vis de quatre souches de microorganismes. Ce travail a été réalisé au niveau de trois laboratoires différents en fonction des tests réalisés, le laboratoire de phytopathologie (département de biotechnologie, faculté de sciences de la nature et de la vie), le laboratoire de génie des procédés du département de chimie de l'université Blida 1 ainsi qu'au niveau du laboratoire central de l'hôpital de Kolea (W. de Tipaza).

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Souches fongiques

Les trois champignons utilisés dans la présente étude appartiennent à la collection du laboratoire de phytopathologie (Département de Biotechnologie Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Blida 1). Ces champignons sont des endophytes isolés à partir des racines du palmier dattier d'Alicante Espagne par Mohamed Mahmoud (2017) (Tableau 1) (Figure 11).

Tableau 01 : Origine des champignons utilisés.

Champignons	Nom scientifique	Plante d'origine	Source	Région
Sn 182	<i>Beauveria bassiana</i>	Racines du palmier dattier	Collection du laboratoire de phytopathologie	Sun Juan (Alicante Espagne)
G133	<i>Clonostachys rosea</i>			Guardamar (Alicante Espagne)
G312				

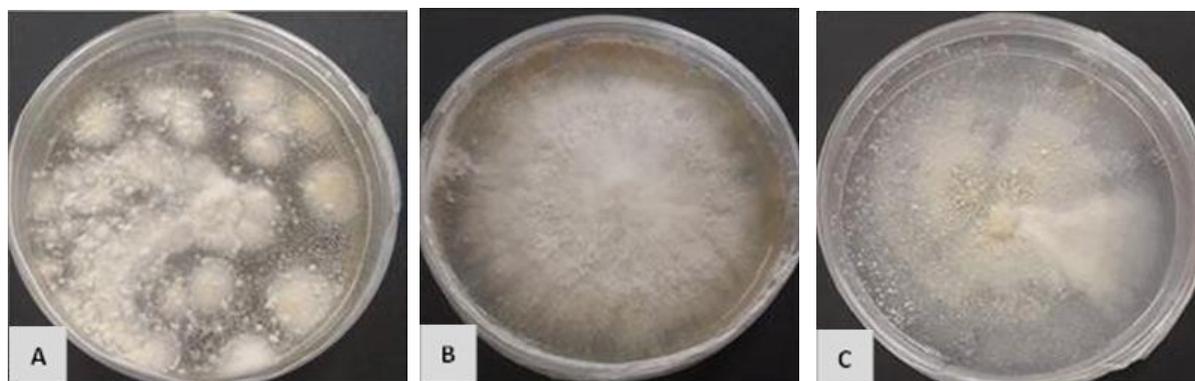


Figure 11. Souches fongiques utilisées :(A) : *Beauveria bassiana* (Sn182), (B et C) : *Clonostachys rosea* (G 312) et (G133).

II.1.1.2. Les microorganismes pathogènes

Pour réaliser le test d'antagonisme, nous avons utilisé des microorganismes pathogènes provenant du laboratoire de l'hôpital de Kolea. Une souche de *Condida albicans* provient du cracha (expectorations) et une souche d'*Escherichia coli* de l'ECBU, *Staphylococcus aureus* est isolée d'une hémoculture alors que, la souche de *Pseudomonas auroginosa* provient d'un prélèvement de pus.

II.1.2. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans ce travail est constitué de milieux de culture (annexe 1), des produits chimiques, la verrerie et l'appareillage (annexe 2).

II.2. Méthodes

II.2.1. Régénération et purification des souches fongiques

La régénération et la purification des souches a été réalisé par repiquage des disques mycéliens à partir des cultures conservées sur milieu PDA (Potato Dextrose Agar)(Johnston et booth, 1983) (Annexe 1), puis les boites sont incubées à 28°C pendant 7 jour.

II.2.2. Caractérisation macroscopique des cultures bactériennes

Les souches fongiques, ainsi que les souches bactériennes ont été observées d'une manière macroscopique après culture des microorganismes, l'observation de celles-ci à l'œil nu.

II.2.3. Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Après l'obtention de cultures pure âgées de 7 jours, des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu PDB, ont été inoculés par 15 disques de culture à raison de cinq répétitions pour chaque souche (Figure.13), puis les flacons sont recouverts avec du papier aluminium et incubés à une température ambiante avec une agitation continue pendant 15 jours selon Xiayoling et *al.*,(2010) (Figure14). Après cette période de fermentation, le contenu des flacons est filtré en trois étapes, la première est réalisée par des compresses stériles, la deuxième par un papier filtre stérile ensuite la troisième par filtration sous vide à l'aide d'un filtre de 0,22 µm de diamètre (Figure.15). Le filtrat obtenu est centrifugé par la suite à 1500 tour/min pendant 20 mn dans une centrifugeuse (Hettich Universal) et le surnageant a été récupéré pour être utilisé ultérieurement (Figure16).

Pour l'extraction des substances bioactives, deux solvants organiques ont été utilisés : l'acétate d'éthyle et le chloroforme. A chaque filtrat un volume égal de solvant est ajouté, puis le mélange est agité afin de séparer les substances. Les mélanges ont été transvasés dans des ampoules à décanter pour séparer les deux phases : la phase organique et la phase inorganique (Figure 17).

Après la séparation, la phase organique est récupérée pour la concentrer sous la pression par évaporation de solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Type BUCHI) (Figure 18). Dans des boîtes de Pétri en verre stérile, les extraits obtenus sont séchés, pesés et conservés pour utilisation ultérieure (Figure 19).

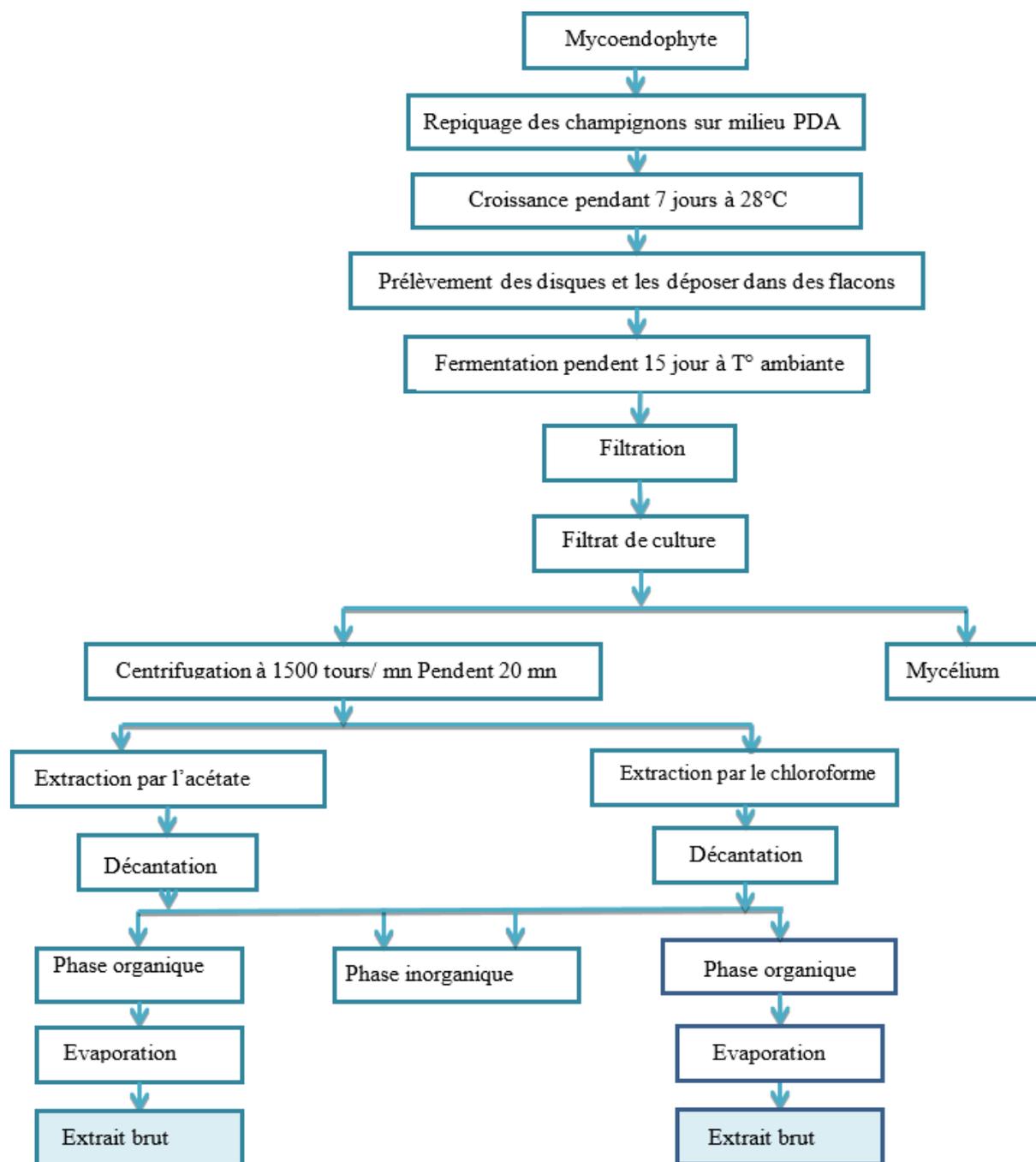


Figure 12 : Schéma récapitulatif des étapes de fermentation et extraction des substances bioactives des champignons par l'acétate d'éthyle et le chloroforme.

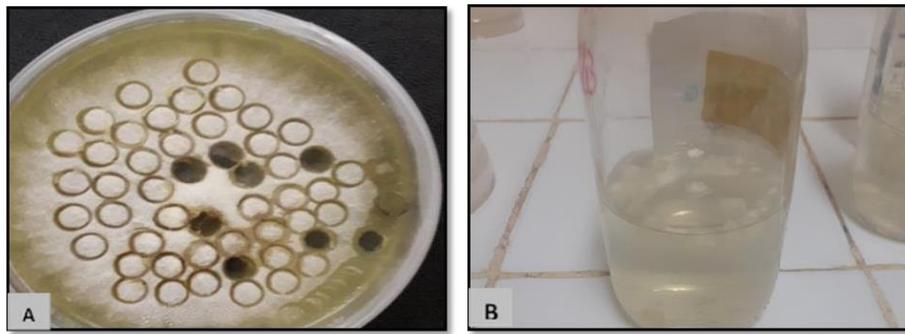


Figure 13: Préparation de la culture. (A) Les disques mycéliens de *Clonostachyrosea* (G 312), (B) Dépôt des disques de *C. rosea* dans le milieu PDB.



Figure14 : Fermentation des cultures fongiques. (A) : Flacons de PDB fermés par du papier aluminium contenant les disques mycéliens de *B.bassiana* (Sn182), *C.rosea* (G133), (C312). (B): l'agitation horizontale des Flacons.



Figure 15: Filtration du bouillon de culture. (A) : par compresses stériles. (B) : par papiers filtre stérile. (C): Pompe de filtration (micro filtre 0,22 μm).



Figure 16: Centrifugation du filtrat de culture à 1500 tour /min pendant 20 mn.



Figure17 : Extraction avec chloroforme et acétate d'éthyle dans des ampoules à décanter et la récupération de la phase organique.



Figure18 : Evaporation du solvant de la phase organique par rotavapeur (Type BUCHI).

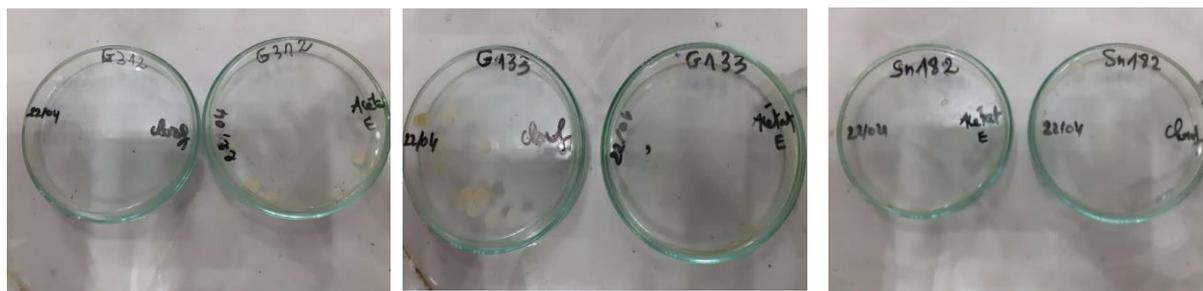


Figure 19 : Les extraits séchés après vaporisation.

II.2.4. Régénération des microorganismes testés

La régénération des microorganismes a été effectuée par ensemencement sur des milieux sélectifs. La vérification de la pureté des souches a été réalisée par observation macroscopique sur milieux sélectifs : Chapman pour *S. aureus*, Hecktoen pour *E.coli*, gélose nutritive pour *P. aeruginosa* et *C. albicans*. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

II.2.5. Révélation de la présence des nanoparticules totales et des nanoparticules d'argent

II.2.5.1. Révélation de la présence des nanoparticules totales dans les filtrats de culture fongiques

La révélation de la présence des nanoparticules totale a été effectuées par filtration de bouillon de culture de chaque champignon à l'aide d'un micro filtre à seringue de 0,22 μm de diamètre et les filtrats obtenus sont déposés dans des tubes stériles de 10ml. La présence des nanoparticules totales est révélée par identification de ces derniers en utilisant la spectrophotométrie UV-Visible, et les quantifier par zetamétrie.

II.2.5.2. Révélation de la présence des nanoparticules d'argent dans les filtrats de culture fongiques

La présence des nanoparticules d'argent est révélée par colorimétrie, identification par spectrophotométrie UV-Visible, et quantification par zetamétrie.

II.2.6.2.1. Colorimétrie

Dans des tubes de 10 ml, 5 ml des filtrats bruts précédemment obtenues ont été déposés avec 1 ml de nitrate d'argent AgNO_3 , après agitation pendant 2 minutes à la main, les tubes sont incubés à 28 °C pendant 24, 48 et même quelque jours pour révéler la présence des nanoparticules d'argent détectées par le changement de la couleur de la solution (marron ou noir) (Figure 20).

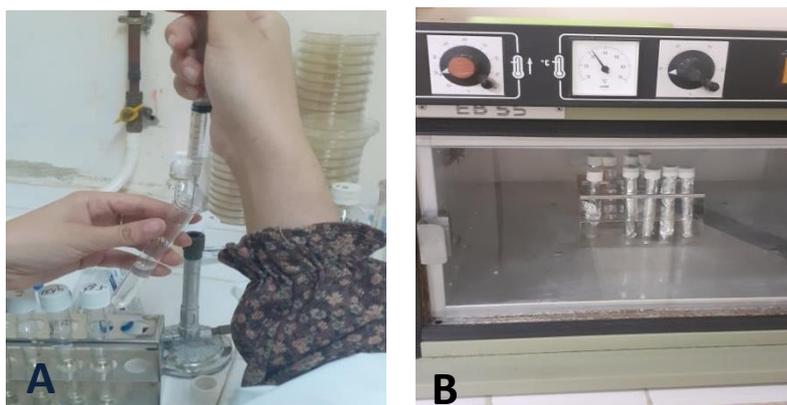


Figure 20 : La révélation de la présence des nanoparticules d'argent dans les filtrats de culture. (A) : méthode colorimétrique, (B) : Incubation des tubes.

II.2.6.2.2. Identification par UV-Visible

Les filtrats brut obtenus précédemment et le filtrat brut additionné avec du nitrate d'argent et le standard (l'eau distillée) ont été traversés dans une cuve en quartz pour être balayés dans une longueur d'onde de $\lambda = 440 \text{ nm}$ par un spectrophotomètre à UV-Visible (HITACHI U-5100).

La présence ou l'absence des nanoparticules totales dans les filtrats et les filtrats additionnés avec du nitrate d'argent ont été déterminées à l'aide d'un logiciel en fonction des maximums d'absorbance chez le standard. La présence de la bande d'absorption maximale (λ_{max}) du standard dans l'extrait indique partiellement la présence des nanoparticules dans l'échantillon (Figure 21).



Figure 21 : Détection de la présence des nanoparticules par spectrophotométrie (HITACHI U-5100).

II.2.6.2.3. Quantification par zetamétrie

La diffusion dynamique de la lumière (DLS :Dynamic Light Scattering) est une technique non invasive afin de mesurer la taille et la distribution des nanoparticules dans les filtrats et les filtrats additionnés avec du nitrate d'argent par Zeta Potential Analyzer (HORIBA Scientific Nanoparticle SZ-100).

Les filtrats bruts et les filtrats additionnés avec du nitrate d'argent dispersés sont placés dans une cellule de mesure en quartz puis mesurés en trois fois par l'appareil. Les résultats sont représentés sous forme de graphes et de valeurs à l'aide d'un logiciel (Figure 22).

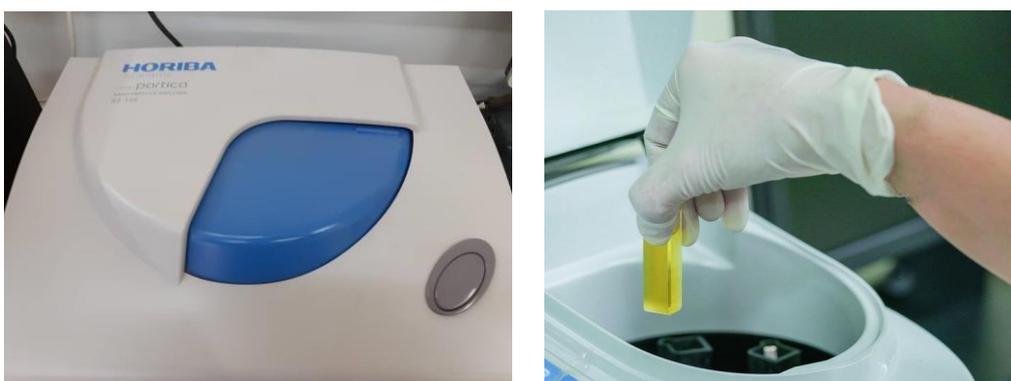


Figure 22 : Quantification des nanoparticules par Zetamétrie.

II.2.7. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Le but de cette méthode est la recherche du pouvoir antibactérien et antifongique des extrait et des filtrats obtenus (additionnés ou non avec du nitrate d'argents) à partir de *Beauveria bassiana* et *Clonostachys rosea* vis-à-vis de quatre microorganismes, il s'agit de deux bactérie à Gram négative *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et une bactérie a Gram positive *Staphylococcus aureus*, et la levure *condida albicans*. Trois techniques ont été choisies : technique des cylindres d'agar (contacte directe entre le champignon et la bactérie ou la levure), technique des disques et technique des puits (par l'utilisation du l'extrait brut et le filtrat brute de la fermentation des cultures fongiques additionné ou non avec du nitrate d'argent).

II.2.7.1. Préparation de l'inoculum

Les tests antibactériens ont été réalisés à partir de cultures jeunes (18 à 24 heures), en phase de croissance exponentielle. L'opacité de la suspension bactérienne dans l'eau physiologique (0,9% NaCl) stérile, doit être équivalente à 0,5 Mc Farland de concentration bactérienne estimée à 10^6 UFC/ml (Isu et Onyeagba, 2002).

II.2.7.2. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)

Les souches fongiques ont étéensemencées sur milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar) (annexe1). Après 10 jours d'incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été perforés à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton, ces derniers sont incubés à 28°C pendant 48 heures. Ensuite, ils sontensemencés par écouvillonnage selon la technique du NCCLS (National Commite for Clinical Laboratory Standard) par les bactéries et la levure, et sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures (Madigan et *al.*, 1997).

L'activité inhibitrice se traduit soit par l'apparition d'une zone d'inhibition après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C (effet d'antibiose) soit par la colonisation ou l'envahissement de toute la boite de Pétri par la culture fongique (phénomène de compétition vis-à-vis de l'espace et des nutriments).

II.2.7.3. Techniques des disques et des puits

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

II.2.7.4. Technique des disques

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

Après incubation, la lecture se fait en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition qui sont représentés par une auréole claires formé autour des disques à l'aide d'un pied à coulisse, puis les comparer aux valeurs de l'antibiogramme de chaque bactérie (Figure 23).

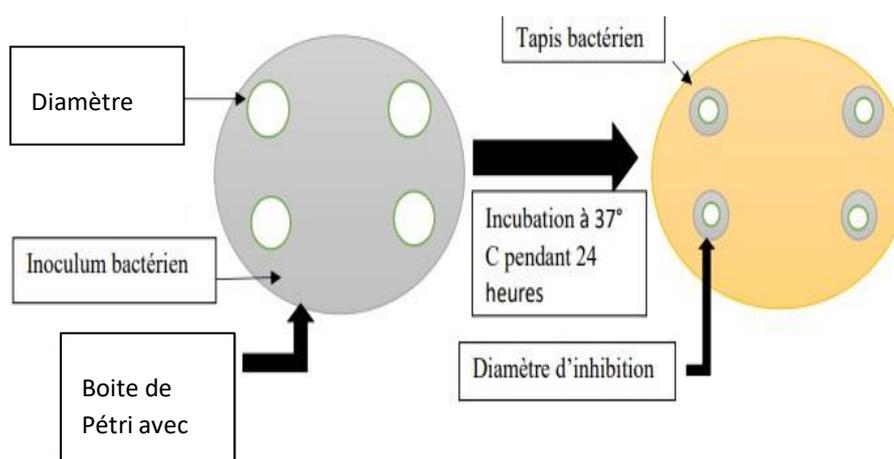


Figure 23 : Technique de diffusion par disque.

II.2.7.5. Technique des puits

Des boîtes de Pétri contenant une couche de gélose Mueller-Hinton d'une épaisseur de 4 mm, sont préparées avec les bactéries et la levure. Après un séchage de 5 ou 4 min, la gélose est perforée avec un cylindre en cuivre de 3 mm de diamètre stérile. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 10 µl de l'extrait brut de filtrat de culture et du filtrat avec nanoparticules d'argent. Les boîtes sont déposées à la température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C pendant 24 à 48 heures (Tortorano et *al.*, 1979).

II.2.8. L'antibiogramme

La méthode d'antibiogramme par diffusion en milieu gélosé (MH) est la méthode historique qui reste à ce jour encore très utilisée. Elle repose sur la mise en culture d'un tapis bactérien sur un milieu gélosé sur lequel sont déposés des disques d'antibiotiques (CLSI, 2012) (Tableau2)

Tableau2 : Les antibiotiques utilisés pour chaque bactérie.

Les bactéries utilisées	Les antibiotiques	
<i>Staphylococcus aureus</i>	Rifampicine (RIF 30)	Streptomycine (S10)
	Lincomycine (L2)	Oxacilline (OX 5)
	Cefoxitin (FOX 30)	Erythromycine (E 15)
	Vancomycine (VA30)	Triméthoprim (COT 25)
	Tétracycline (TE 30)	Acide fusidique (FC 10)
	Gentamicine (GMI 15)	Doxycycline (DO 30)

	Les antibiotiques	
<i>Echerichai coli</i>	Fosfomicine (F300)	Ciprofloxacine (CIP5)
	Triméthoprim (COT 25)	Céfalexine (CN 30)
	Gentamicine (GMI 15)	Ceftriaxone (CTR 30)
	Céfotaxime (CTX 30)	Amoxicilline (AMC)
	Fosfomycine (FO 200)	

	Les antibiotiques
	Acide pipémidique(PI 100)
	Gentamicine (GEN 10)
	Aztréonam (AT 30)
	Amikacine (AK 30)
	Tobramycine(TOB 10)
	Ceftazidime (CAZ 30)
	Ticarcilline (Tic 75)
	Ticarcilline + acide clavulanique (TCC 75 /10)
	Tétracycline (TC 75)

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractérisation macroscopique des cultures bactériennes

L'observation macroscopique des cultures bactériennes a été effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C sur des milieux sélectifs. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température d'incubation. On observe des colonies jaunes à jaune-saumon sur milieu Hektoen caractéristique des espèces bactériennes d'*Escherichia coli*. Des colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol (+) sur le milieu Chapman, sont des *Staphylococcus aureus*, et *P. aeruginosa* se développent sur les milieux gélosés sous la forme de colonies lisses, bombées et de taille moyenne. Les colonies blanc crème sont des *Condida albicans* sur milieu GN (Figure 24).

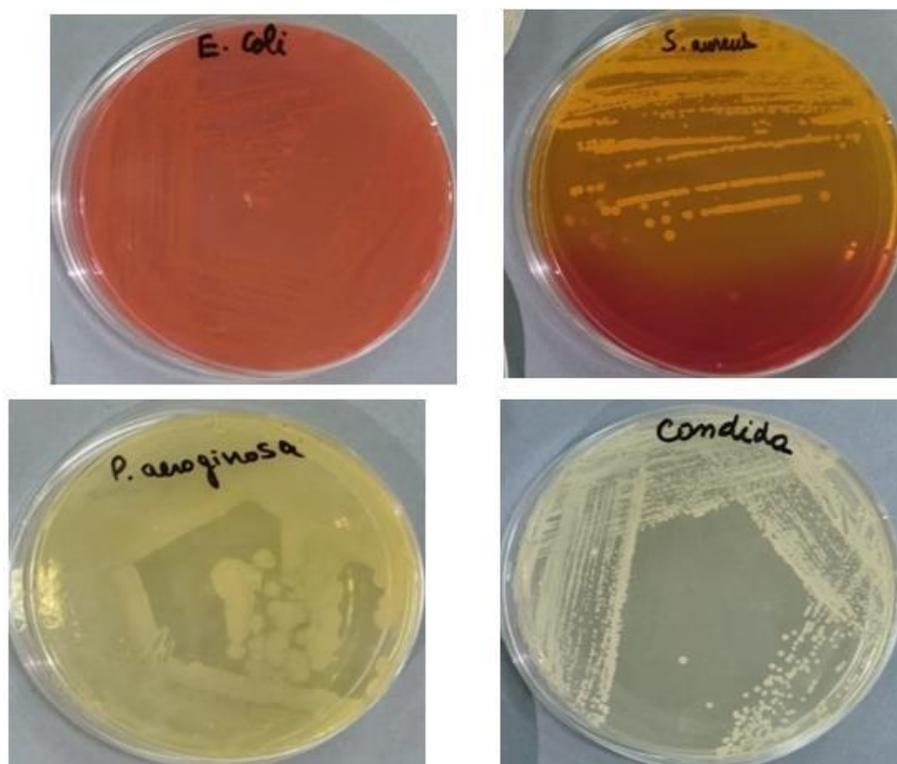


Figure 24: L'aspect macroscopique des souches testées.

III.2. Caractérisation macroscopique des cultures fongiques

L'observation macroscopique des champignons a été effectuée après 10 jours d'incubation à 28°C (Figure 25).

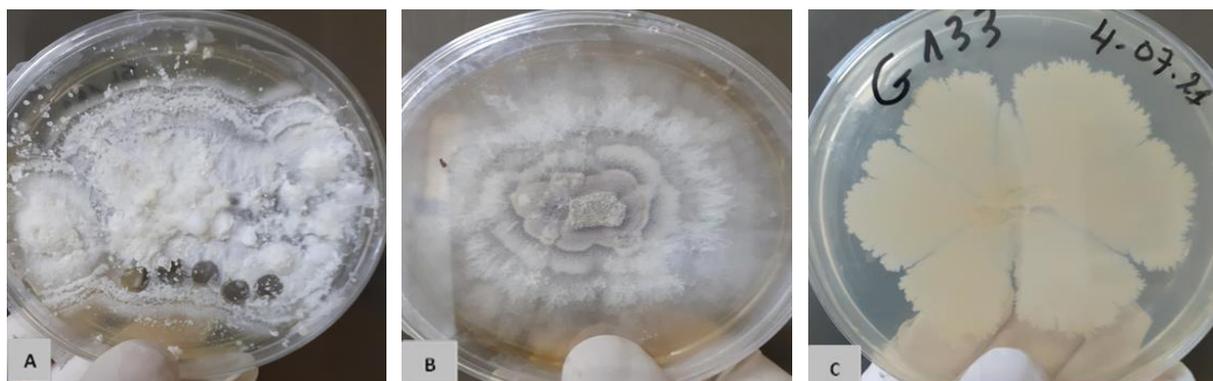


Figure 25 : L'aspect macroscopique des champignons étudiés.

III.3. Le rendement des extraits fongiques après fermentation

Le rendement des extraits fongiques représente la quantité d'extrait que l'on obtient après le processus d'extraction.

Le rendement est habituellement exprimé en masse par le calcul de la différence entre les boîtes Pétri en verre contenant d'extrait et les boîtes Pétri vides (Tableau 3).

Tableau 3: Le rendement des extraits fongiques

Le poids total d'extrait			
	G 312	G 133	Sn182
Acétate d'éthyle	1.96 g	2.9 g	1.97 g
Chloroforme	3.09 g	0.75 g	2.6 g

III.3. Révélation de la présence des nanoparticules totales et des nanoparticules d'argent

III.3.1. Colorimétrie

La figure 26 représente le changement de la coloration du filtrat de *Clonostachys rosea* G133 indiquant la formation de nanoparticules d'argent.



Figure 26 : Résultats du test colorimétrique de la mise en évidence de la présence des nanoparticules d'argents dans les filtrats de cultures des souches fongiques testées. Changement de la coloration du (filtrat+ AgNO₃) de (Sn 182) à gauche, G312 au centre, et G133 à droite.

III.2.2. Identification par UV-Visible

Les spectres d'absorption ultra-violet visible des nanoparticules totales et nanoparticules d'argent synthétisés ont été enregistrés contre l'eau distillée afin de mesurer l'absorbance des nanoparticules totales et d'argent (tableau 4).

Tableau 4: Identification des nanoparticules dans des filtrats bruts et du filtrats + AgNO₃ par UV à 440nm.

	Absorbance des NP dans les filtrats + AgNO ₃ (mol/l ⁻¹)	Absorbance des NP dans les filtrats brut (mol/l ⁻¹)
G 133	333	85
G 312	345	52
Sn 182	227	99

III.2.3. Zetamétrie

Le potentiel zêta est la charge d'une particule dans le plan de cisaillement, a été mesuré par la technique de micro-électrosphère (Tableau 5 et 6).

Tableau 5 : Mesures du Zeta potentiel et de la taille des nanoparticules dans les filtrats bruts.

	Potentiel Zeta	La taille
G133	43,8 mv	208nm
Sn182	68,9 mv	15,88nm
G312	-12,7 mv	97,8nm

Tableau 6 : Mesures du Zeta potentiel et de la taille des nanoparticules dans les filtrats additionnés de nitrate d'argent.

	Potentiel Zeta	La taille
G133 AgNo3	3,9mv	30,16nm
Sn182AgNo3	41,9mV	14,06nm
G312 AgNo3	31,2mV	57,3nm

III.3. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne

Les trois espèces fongiques ont été utilisées pour étudier leurs activités antibactériennes et antifongiques. Pour cela trois techniques ont été utilisées : la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

III.3.1. Technique des cylindres d'agar (confrontation directe)

L'apparition d'une zone claire autour des cylindres d'agar permet, après incubation, de déceler la présence des métabolites fongiques qui inhibent la croissance des souches testées. Un phénomène de compétition pour l'espace et les nutriments a été également observé lors de la vérification des boîtes de la confrontation (Figure27) (Figure28).

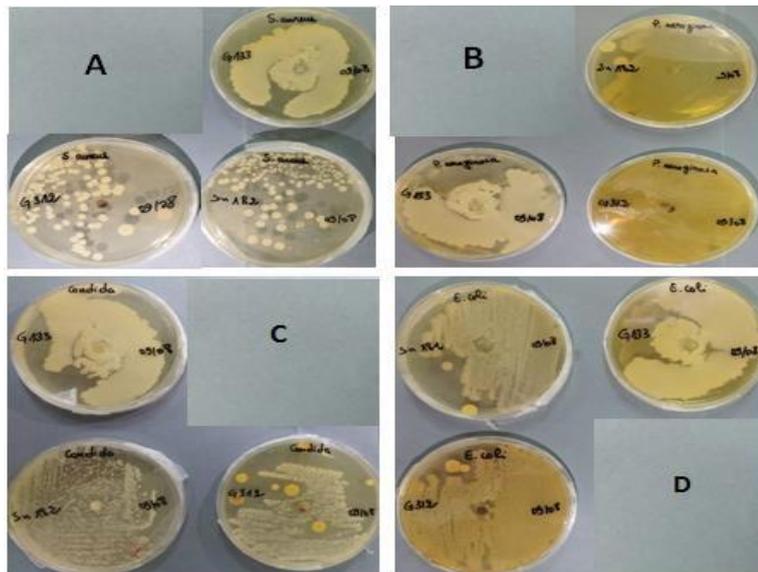


Figure 27 : Des boîtes de Pétri présentant les résultats de l'activité antagoniste (confrontations directes) exercée par les trois souches fongiques. (A) : *Staphylococcus aureus*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Candida albicans*, (D) : *Escherichia coli*.

Les résultats montrent que les trois espèces fongiques présentent une activité antimicrobienne contre *S. aureus* (Figure 10), où le diamètre de la zone d'inhibition été de 7 mm, contrairement à *Pseudomonas aeruginosa* sur laquelle toutes les espèces fongiques n'ont eu aucun effet. Concernant *Candida albicans* le diamètre de la zone d'inhibition été de 5 mm, alors que pour *E. coli*, il varie entre 2,3 mm et 6 mm (figure 11).

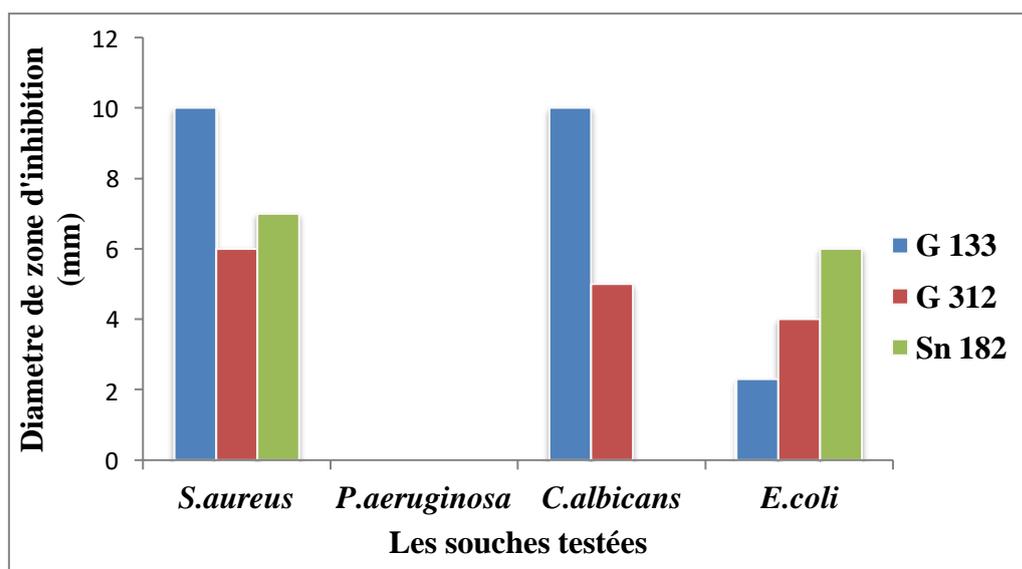


Figure 28 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par *Beauveria bassiana* (Sn 182) et *Clonostachys rosea* G133, G312 contre les souches testées par la technique des cylindres d'agar.

III.3.2. Techniques des disques et des puits

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

III.3.2.1. Technique des disques

Après extraction, l'effet antimicrobien des extraits organiques obtenus a été testé par la technique des disques, Cette technique a révélé que :

- L'extrait organique chloroformique de *Clonostachys rosea* G133 a exercé une activité antimicrobienne sur les souches testées. La moyenne des diamètres des zones d'inhibition était 8 mm en présence de *Pseudomonas aeruginosa*, 6 mm avec *E. coli*, 4,5 mm avec *Staphylococcus aureus*, et 4 mm avec *Candida albicans*. L'extrait d'acétate d'éthyle de G133, a montré une activité antibactérienne seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 3 mm.
- L'extrait organique chloroformique de *Clonostachys rosea* G312 présente une activité antibactérienne seulement sur *Pseudomonas aeruginosa* dont la zone d'inhibition est de 3,5 mm (figure 10). Alors que, aucune activité antibactérienne n'a été détectée en présence de l'extrait organique chloroformique et d'acétate d'éthyle de *Beauveria bassiana*(Sn 182) (Figure.29) (Figure.30)(Figure.31).

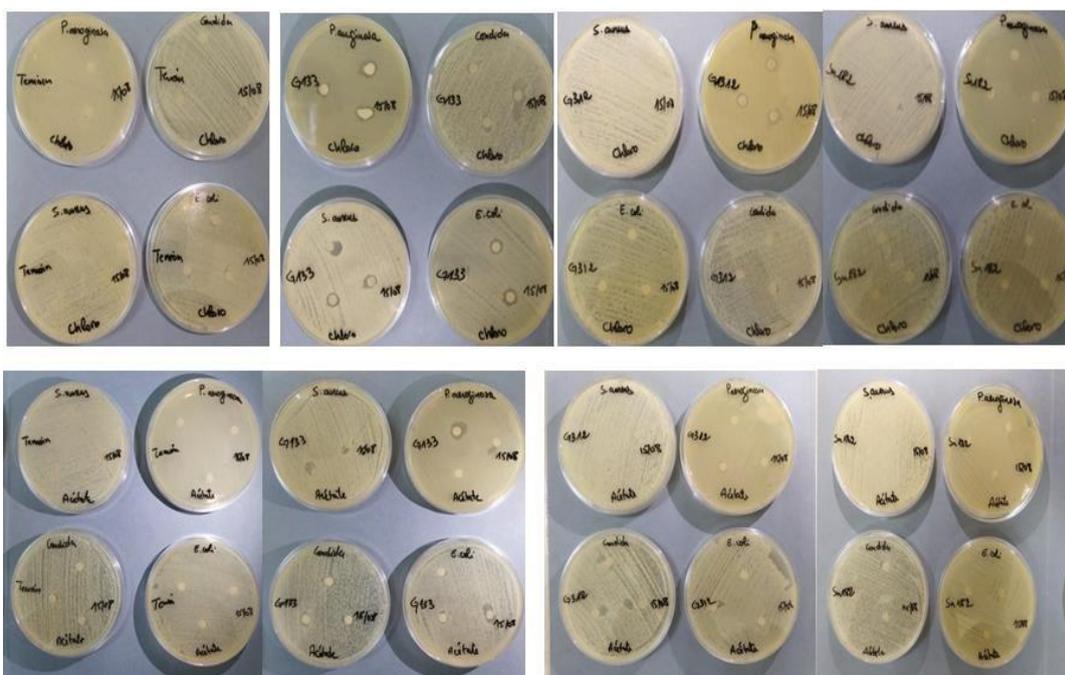


Figure 29: Des boîtes de Pétri montrant les activités antimicrobiennes des trois souches fongiques testées par la technique des disques.

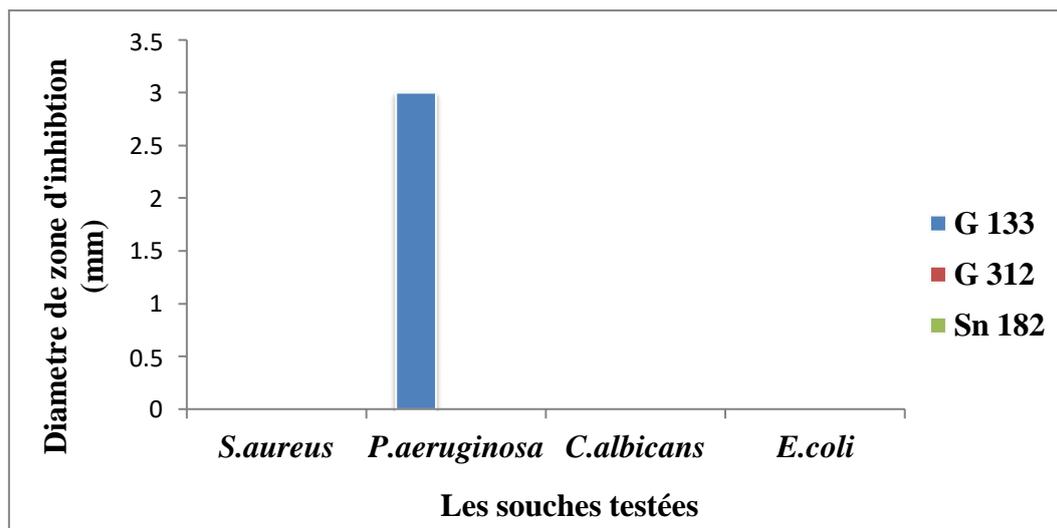


Figure 30 : Diamètres des zones d'inhibition déterminés lors de l'utilisation de l'extrait organique acétate d'éthyle de *B.bassiana* (Sn 182) et *C.rosea* G133 et G312.

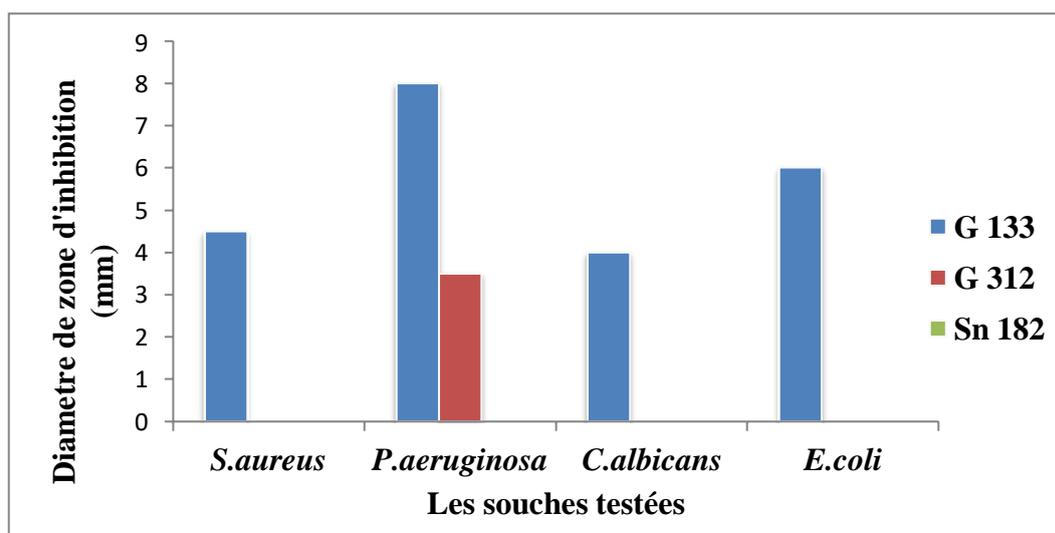


Figure 31: Diamètre des zones d'inhibition déterminé lors de l'utilisation de l'extrait organique chloroformique de *B.bassiana* (Sn 182) et *C.rosea* G133 et G312.

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

Le chloroforme et l'acétate éthyle sont deux solvants organiques souvent utilisés pour l'extraction des métabolites secondaires à effet antibactérien (Manila *et al.*, 2014).

Par ailleurs, nos résultats montrent que les deux extraits chloroformiques des deux souches G133 et G312 de *Clonostachys rosea* ont un pouvoir inhibiteur plus important par rapport à ceux de l'Acétate d'éthyle.

Ces résultats ont montré que le chloroforme peut être le meilleur solvant pour l'extraction des métabolites secondaires de *Clonostachys rosea*.

III.3.2.2. Techniques des puits

La technique des puits a été utilisée pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des nanoparticules totales et des nanoparticules d'argent. Pour le filtrat brut qui exprime les nanoparticules totales, les résultats obtenus ne montre aucune zone d'inhibition en présence des deux souches *B. bassiana* (Sn 182) et *C. rosea* G133 et G312 (Figure 32).

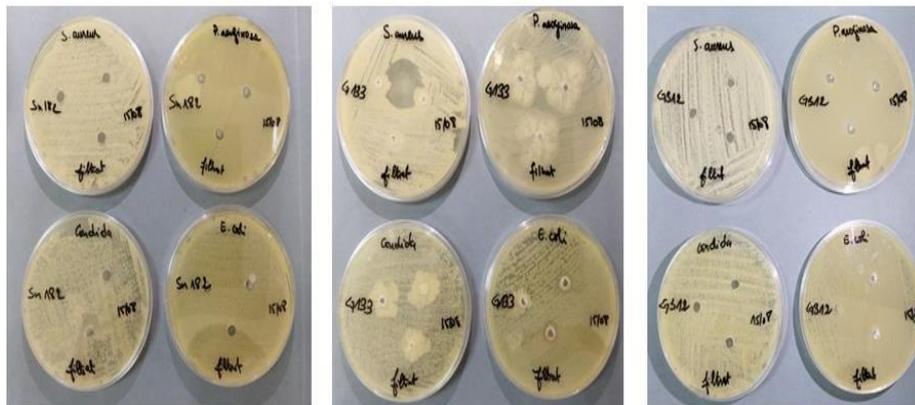


Figure 32: Des boîtes de Pétri montrant les activités antimicrobiennes du filtrat brut des trois souches fongiques testées par la technique des puits.

Pour le filtrat additionné de nitrate d'argent qui exprime les nanoparticules d'argent de, *C.rosea* G133, des zones d'inhibition ont été observée avec des diamètres de 11mm en présence de *P.aeruginosa* et *C.albicans*, 7mm avec *E.coli* et 6mm contre *S. aureus*. Par contre, en présence des nanoparticules d'argents de *B. bassiana* (Sn 182) et *C. rosea* G312 aucune zone d'inhibition n'a été observé (figure 33) (figure 34).

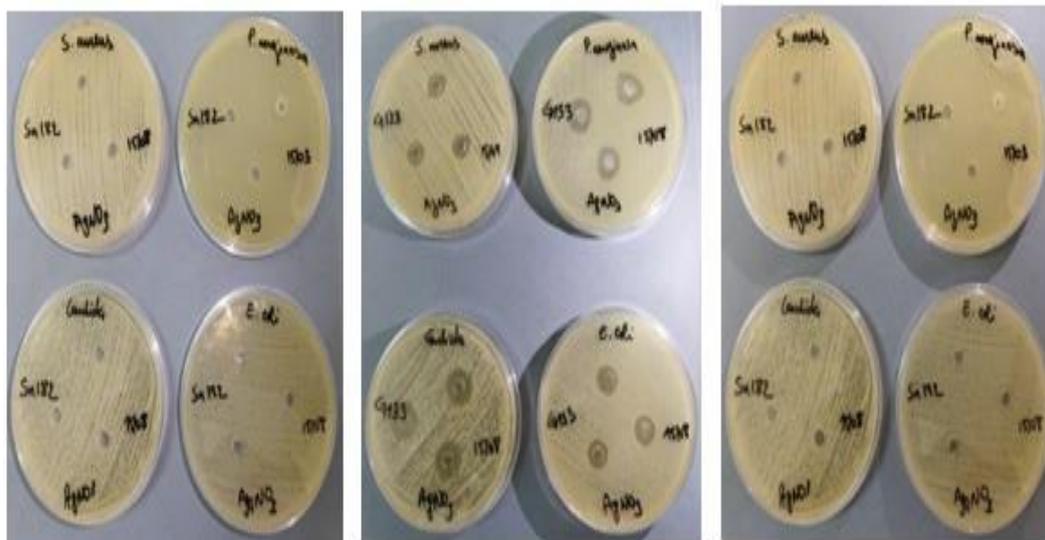


Figure 33 : Des boîtes de Pétri montrant les activités antimicrobiennes des filtrats additionnés de nitrate d'argent des trois souches fongiques testées par la technique des puits

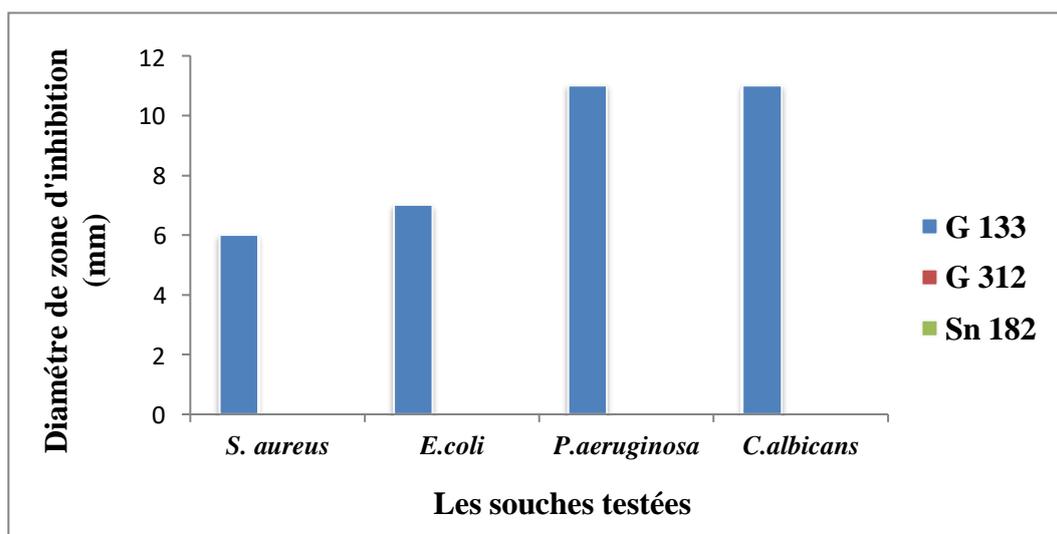


Figure 34 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les nanoparticules d'argent des champignons utilisés contre les souches testées par la technique des puits.

III.3. L'antibiogramme :

L'antibiogramme permet en effet de faire la distinction entre une souche de bactérie résistante et une souche sensible (figure 35)(tableau 7).

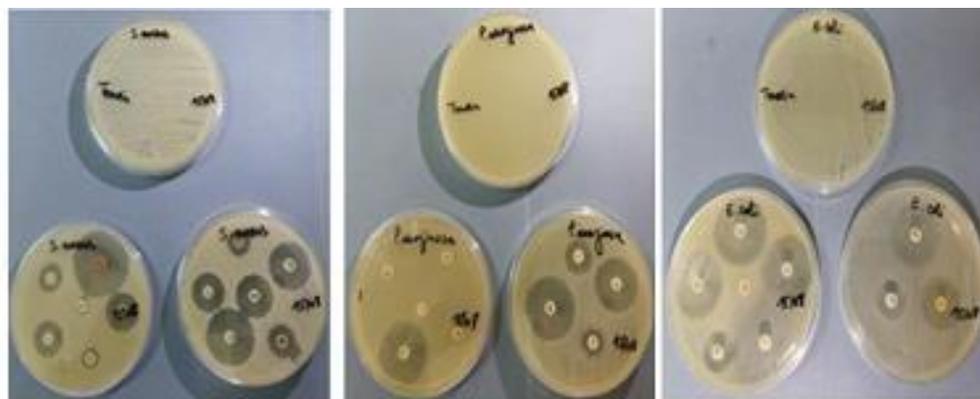


Figure 35 : Des boîtes de Pétri montrant les résultats d'antibiogramme exercés par les trois souches bactériennes *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*.

Tableau 7: Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme de *S. aureus*.

L'antibiotique	Le diamètre de la zone d'inhibition
RIF 30	19 mm
L 2	8 mm
FOX 30	11mm
VA 30	13 mm
TE 30	8 mm
GMI 15	13 mm
S 10	10 mm
OX 5	5 mm
E15	4 mm
COT 25	15 mm
FC 10	11 mm
DO 30	9 mm

Tableau 8: Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme d'*E. coli*.

L'antibiotique	Le diamètre de la zone d'inhibition
F 300	11 mm
COT 25	13 mm
GMI 15	8 mm
CTX 30	15 mm
FO 200	15 mm
CIP 5	19 mm
CN30	8 mm
CTR 30	13 mm
AMC	Abs

Tableau 9: Le diamètre des zones d'inhibition (mm) de l'antibiogramme de *P. aeruginosa*.

L'antibiotique	Le diamètre de la zone d'inhibition
PI 100	8 mm
GEN 10	12 mm
AT 30	6 mm
AK 30	15 mm
TOB 10	15 mm
CAZ 30	Abs
TIC 75	Abs
TCC 75 /10	Abs
TCC 75	Abs

Discussion

L'effet antimicrobien des deux souches fongiques *Clonostachys rosea* (G 133, G312) et *Beauveria bassiana* (Sn 182) à l'encontre de trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) ainsi contre une levure (*Candida albicans*) a été mis en évidence à travers l'utilisation des extraits bruts et des filtrats de culture de ces champignons.

Les résultats obtenus dans le test de confrontation indirecte, ont révélé la capacité de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) à inhiber ou ralentir la croissance des bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) et de la levure testée. En effet, selon Botton et al. (1990); Barrios et Mejia (2008), les champignons peuvent produire des quantités impressionnantes de substances bioactives et peuvent avoir une grande importance. *C. rosea* joue un rôle crucial dans le contrôle biologique de nombreux types d'agents pathogènes (Zhan-Bin Sun et al., 2020). Peipei et al. (2020) ont montré que les produits de *Clonostachys* sont abondants dans de nombreuses classes de métabolites secondaires et possèdent des activités antimicrobiennes, insecticides, antiparasitaires, phytotoxiques et cytotoxiques. *Beauveria bassiana* (Sn 182) a révélé la capacité d'inhiber ou ralentir la croissance des bactéries (*Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*). Selon Kershaw et al. (1990); Vey et al. (2001) et Rosset al. (2005); Parine (2010) ont montré que des métabolites toxiques ont été décrits dans l'agent de lutte biologique *Beauveria bassiana*. Certains de ces métabolites présentent des propriétés antibiotiques, et les résultats obtenus dans ce travail ont dévoilé l'incapacité de tous les champignons à inhiber *Pseudomonas aeruginosa* et *Candida albicans* en raison de la faible concentration des substances antimicrobiennes qui exerce un effet bactéricide ou fongicide sur ces microorganismes pathogènes.

Ces métabolites secondaires sont généralement produits par fermentation par un nombre limité d'organismes, principalement par les champignons, à la fin de leur cycle de croissance, souvent pendant la phase stationnaire, et sont connues par leur effet antibactérien, (Botton et *al.*, 1990 ; Barrios et Mejia, 2008). L'activité antimicrobienne de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) consiste à rechercher l'effet antibactérien de ces substances bioactives sur le développement d'*E. Coli*, *Staphylococcus aureus*, et *Pseudomonas aeruginosa*.

La sensibilité des microbes aux métabolites secondaires fongiques bruts varie selon l'espèce microbienne. *Pseudomonas aeruginosa* a montré une grande sensibilité aux substances bioactives de *C.rose* (G 133, G312), alors que *E. Coli*, a montré moins de sensibilité alors qu'une sensibilité modérée est observée pour *S. aureus*. *C.rosea* (G 133) a eu une activité antifongique vis à vis *Candida albicans*.

Les résultats montrent que l'effet inhibiteur le plus élevé est noté pour *Pseudomonas aeruginosa* donc cette inhibition est apparue autour des disques, la distance de cette inhibition a été exercée par les molécules produites par *C.rosea* (G 133, G312) et ayant diffusé dans le milieu de culture (Baker et Cook, 1974). En effet ces résultats pourraient être causés par des antibiotiques qui provoquent l'inhibition de la croissance des pathogènes testés. Ainsi, cette variabilité dans l'inhibition observée entre les souches testées dépend de la quantité d'antibiotiques produits.

La synthèse des antibiotiques est étroitement liée au métabolisme cellulaire, qui est à son tour liée à la disponibilité des éléments nutritifs ainsi que d'autres stimuli environnementaux tels que les éléments minéraux, les sources de carbone, le pH, la température ainsi que d'autres paramètres (Thomashow, 1996 ; Bender et *al.*, 1999). *Clonostachys* et *Beauveria* produisent des antibiotiques potentiels mais aussi plusieurs métabolites avec une activité antimicrobienne. Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien, ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement (Peipei H et *al.*, 2020).

Ces résultats se concordent avec les résultats de Zhai et *al.*, (2016) qui ont montré que *C.rosea* et *B. bassiana* ayant une activité antibactérienne considérable contre *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* donc l'activité antibactérienne contre les bactéries testées à Gram négatif apparaît plus importante que celle contre les bactéries à Gram positif *Staphylococcus aureus*.

Selon Sadrata et *al.* (2013) ; Tong et *al.* (2014), la raison de la différence de sensibilité entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif à l'antibiotique pourrait être attribuée aux différences morphologiques entre ces deux groupes de bactéries. Les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane supplémentaire à l'extérieur de leur paroi, ce qui rend la barrière externe plus épaisse et difficile à pénétrer par contre les bactéries à Gram positif possèdent uniquement une couche externe de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace.

Les résultats de l'effet antifongique de *Clonostachys rosea*(G 133, G312)vis-à-vis de *Candida albicans*, montrent une inhibition de la croissance mycélienne des colonies de la souche fongique. Par contre, *Beauveria bassiana*(Sn 182) n'a eu aucun effet sur la croissance de *Candida albicans* à cause de sa vitesse lente de croissance qui cèdent la place au champignon pathogène de poussé.

D'après les résultats obtenus, on constate que malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés *C. albicans* et les souches de *Clonostachys rosea*(G 133, G312), certaines de ces dernières ont pu exercer une activité inhibitrice sur le développement des colonies des champignons. Ceci s'expliquerait par la capacité de ces extraits à produire des substances qui sont capables de limiter et même de stopper la croissance des champignons.

Plusieurs études ont démontré que des champignons endophytes telle que *Clonostachys rosea* et *Beauveria bassiana*, résisterait à l'invasion et inhiberait un grand nombre de microorganismes nocifs pour l'homme, animaux et plantes par la production de métabolites secondaires (Strobel et *al.*, 2004 ;Pimentel et *al.*, 2011).

La production de métabolites secondaires impliqués dans l'antagonisme microbien est sous l'effet du milieu de culture (Meyer et Abdallah, 1987).L'activité antagoniste *in vitro* dépend non seulement des espèces et souches testées, mais aussi de la composition du milieu de culture qui est nécessaire à la production des molécules bioactives (Anwar et Iqbal, 2017).

Les travaux de Mohamed Mahmoud (2017), ont montré que les souches de *C. rosea* et *B. bassiana* ont la capacité d'inhiber la croissance des pathogènes. Cette inhibition de la croissance est due principalement à la compétition entre les endophytes et les pathogènes (Chaudhary et Prajapati 2004 ;et Mian et *al.*, 2010).

Les résultats obtenus à partir de la détermination de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion sur disque ont révélé la capacité de certains extraits de chloroforme et d'acétate d'éthyle des champignons endophytes testés à inhiber la croissance des souches pathogènes utilisés. Cette inhibition est due principalement à l'antibiose qui résulte de la production des substances (métabolites secondaires et nanoparticules). L'antibiose est définie comme un antagonisme induit par la production des métabolites spécifiques ou non des microorganismes qui sont nuisibles à la croissance ou aux activités métaboliques d'autres organismes. Il s'agit de la production d'antibiotiques, de composés organiques volatils bioactifs, d'agents lytiques, d'enzymes et de substances toxiques (Lipa et al., 2017).

D'après les résultats obtenus, l'apparition de la zone d'inhibition qui a été observée dans les extraits chloroforme de *C. Rosea* contre les quatre microorganismes pathogènes *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*, confirme l'activité antagoniste de cette souche. Les études de Santos et al. (2019) ont démontré que le type d'interaction entre les endophytes et les agents pathogènes était l'inhibition de la croissance par contact, ce qui suggère que la compétition pour l'espace comportait le mécanisme d'inhibition. Ainsi que Mohamed Mahmoud (2017) a montré que *C. rosea* applique le phénomène de l'antibiose qui se traduit probablement par la production des antibiotiques qui inhibent la croissance des pathogènes.

Les résultats ont montré que les extraits chloroformiques de *B. bassiana* ne présentent aucune activité antimicrobienne traduit par l'absence des zones d'inhibition, et les extraits d'acétate d'éthyle de *C. rosea* (G 312) révèlent activité positive vis-à-vis du *P. aeruginosa*. Cela peut être expliqué par deux hypothèses : (i) Il se peut que les composants actifs ne soient pas bien dissous dans les extraits par le solvant ou que de très petites quantités soient extraites, ce qui donne peu ou pas d'efficacité aux extraits.(ii) Il est fort probable que les composants bioactifs ont la polarité qui est la mieux extraite par l'acétate d'éthyle parmi les fractions de solvant (Ogundare et al., 2006).

D'autre part, les résultats de l'activité antibactérienne de la diffusion par puits, aucune activité antimicrobienne n'a été remarquée qui se traduit par l'absence des zones d'inhibitions, et cela peut être expliqué par la faible concentration des métabolites secondaire dans le filtrat.

Clonostachys rosea et *Beauveria bassiana* ont la capacité de synthétiser les nanoparticules et plus spécialement les nanoparticules d'argent, ces derniers sont des particules qui montrent des activités antimicrobiennes et anti-inflammatoires et peuvent inhiber efficacement divers organismes pathogènes, y compris les bactéries et les champignons (Botton et al., 1990 ; Guangquan et al., 2011).

D'après ces résultats, le changement de la couleur de filtrat additionné de nitrate d'argent des souches fongiques *Clonostachys rosea* G133 et *Beauveria bassiana* Sn182 en marron et en gris foncé, confirme la capacité de ces souches de produire les nanoparticules d'argent en quantité importante (Tárcio .S et al., 2021) De plus la spectrophotométrie UV-Visible montre que les trois souches fongiques testées *Clonostachys rosea* G133, G312 et *Beauveria bassiana* Sn182 synthétisent différents nanoparticules y compris les nanoparticules d'argent, qui sont en différente taille et charge montré par l'analyse de zétamétrie. Il y'a eu un changement de couleur du milieu par rapport à la diffusion des nano d'argent peut être due aux combinaisons des nano des champignons testées avec les nano des pathogènes et à leurs réaction dans le milieu. Beaucoup de travaux ont montré la capacité de *P. aeruginosa* et *S. aureus* de produire des nano (Patil .C et al., 2013)

Les résultats d'antibiogramme montrent que certaines métabolites secondaires de *C. rosea* ont même effet de celui des antibiotiques Erythromycine (E 15), Oxacilline (OX 5), Gentamicine (GMI 15) et Céfalexine (CN 30), où le diamètre de la zone d'inhibition est similaire.

Ce travail a montré que les champignons endophytes ont provoqué un effet antibactérien plus ou moins important, en fonction de la souche bactérienne (Tenguria et al., 2011).

D'après les résultats obtenus dans ce travail et l'intérêt grandissant pour la recherche de nouveaux agents antimicrobiens de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne *Clonostachys rosea* (G133 et G312) et *Beauveria bassiana* (Sn182) constituent un large réservoir de nouvelles molécules qui peuvent être exploitées dans le futur.

CONCLUSION

Conclusion

La résistance aux antibiotiques est devenue une préoccupation mondiale et constitue un problème majeur de santé publique. En effet de nombreux antibiotiques disponibles contre des infections bactériennes courantes deviennent de plus en plus inefficaces. Par conséquent les substances bioactives d'origine naturelle représentent la source de la majorité des composés utilisés par l'homme à intérêts thérapeutiques afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces.

Cette étude est basée sur deux parties. La première est consacrée à la fermentation et la récupération du filtrat de culture et du l'extrait brut de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) et de *Beauveria bassiana* (Sn 182). La deuxième est basée sur l'effet antimicrobien de ces filtrats et extrait de ces souches à l'encontre de trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, et une levure *Candida albicans* par l'utilisation de trois méthodes différentes : confrontation directe, méthode des disques et des puits. .

L'activité antimicrobienne à travers la confrontation directe a montré que *C.rosea* et *B.bassiana* ayant une activité antibactérienne contre les bactéries testées à Gram négatif *E.coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, par rapport à l'activité antibactérienne contre les Gram positif *Staphylococcus aureus* qui était plus au moins faible. L'effet antifongique de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) vis-à-vis de *Candida albicans*, se traduit par l'inhibition de la croissance mycélienne des colonies de la souche fongique. Par contre, *Beauveria bassiana* (Sn 182) n'a eu aucun effet sur la croissance de *Candida albicans*. Ces activités sont manifestées soit par l'apparition d'une zone d'inhibition effet d'antibiose soit par une bonne croissance et une colonisation du milieu des souches fongiques, phénomène de compétition vis-à-vis de l'espace et les nutriments.

L'évaluation de l'activité antibactérienne de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) et de *Beauveria bassiana* (Sn 182) à l'encontre des pathogènes étudiées, montre une variation selon l'extrait de culture et la souche testée.

La détermination de l'activité antagoniste par la méthode de diffusion sur disque a dévoilé une capacité importante d'extrait de chloroforme des de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) et de *Beauveri abassiana* (Sn 182) à inhiber la croissance des souches pathogènes utilisés par rapport à celle d'acétate d'éthyle de *Clonostachys rosea* (G 133, G312) et de *Beauveria bassiana* (Sn 182) à inhiber la croissance des souches pathogènes utilisés.

Particulièrement, en présence de *P. aeruginosa*, la zone d'inhibition la plus importante 8 mm a été enregistré en contact avec l'extrait de chloroforme de culture de *C. rosea* (G 133), alors que la plus faible activité (diamètre) a été constaté en présence du l'extrait acétate d'éthyle de *C. rosea* (G312).

Clonostachys rosea et *Beauveria bassiana* peuvent synthétiser les nanoparticules et plus spécialement les nanoparticules d'argent qui ont été révélé par le changement de la couleur de filtrat additionné de nitrate d'argent des souches fongiques *Clonostachys rosea* G133et *Beauveria bassiana* Sn182 en marron et en gris foncé, par la méthode de colorimétrie. La capacité de produire les nanoparticules d'agent a été confirmé par la spectrophotométrie UV-Visible et Zétamétrie qui a révélé une variation de taille (14 à 57 nm) et de charge (4 à 42 mv) .

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des nanoparticules du filtrat brut par la méthode diffusion par puits présente une activité négative qui se traduit par une bonne croissance des souches pathogènes. Par contre, les nanoparticules d'argent synthétisés par *C. rosea* (G 133) ont exercées des activités antibactériennes vis-à-vis de *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus* avec des zones d'inhibition de 11 mm, 7 mm et 6 mm respectivement et aussi une activité antifongique de 11 mm contre *C. albicans*.

Selon l'antibiogramme, les substances bioactives de *C. rosea* ont effet similaire de celui des antibiotiques Erythromycine (E 15), Oxacilline (OX5), Gentamicine (GMI 15) et Céfalexine (CN 30), où le diamètre de la zone d'inhibition est similaire. En revanche, en comparant avec les diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques Tobramycine(TOB 10), Ceftazidime (CAZ 30),Rifampicine (RIF 30),Triméthoprime (COT 25) etCéfotaxime (CTX 30) ,les diamètres des zones d'inhibition de l'extrait brut sont considérées comme faibles.

En conclus que les souches *Beauveria bassiana* et *C. rosea* est plus spécialement G 133 et ont montré des activités antifongiques sur *C. albicans* et des activités antibactériennes sur *P. aeruginosa*, *E. coli* et *S. aureus*. Cette activité antibactérienne apparait plus importante contre les bactéries à Gram négatif que celle contre les bactéries à Gram positif.

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

- Extraction, purification et identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises « HPLC, CPG etc. »
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- L'optimisation de la biosynthèse des MSF à des fins médicales.
- Extraire les nanoparticules et les tester directement contre les pathogènes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Afshari N., Hemmati R., 2017 Premiers signalements de la présence et de la pathogénicité de *Clonostachys rosea* sur féverole la Société australienne de pathologie végétale 46, pages 231–234.
- Ahmad M. Al-Thobity , Khalifa S. Al-Khalifa , Mohammed M. Gad , Mohammed Al-Hariri , Aiman A. Ali , Talal Alnassar, 2017 Évaluation in vitro de l'activité inhibitrice de Thymoquinone dans la lutte contre *Candida albicans* en Prévention de la stomatite dentaire p 4.
- Alt V., T. Bechert, P. Steinrucke, M. Wagener, P. Seidel, E. Dingeldein, E. Domann, R. Schnettler, et al., *Biomaterials*, 2004, 25, 4383–4391.
- Anwar W., Ali S., Nawaz K., Iftikhar S., Javed M.A., Hashem A., Alqarawi A.A., Abd_Allah E.F., Akhter A., 2018 - Entomopathogenic fungus *Clonostachys rosea* as a biocontrol agent against whitefly (*Bemisia tabaci*). *Biocontrol Science and Technology*, n° 10, p.p.1-12.
- Akoua-Koffi, C., Guessennd, N., Gbonon, V., Faye-Ketté, H., & Dosso, M. (2004). La méticillino-résistance de *Staphylococcus aureus* isolés à Abidjan (1998–2001): un nouveau problème en milieu hospitalier. *Médecine et maladies infectieuses*, 34(3), 132-136.
 - Anwar, J, Iqbal, Z. (2017). Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. *Sarhad Journal of Agriculture* 33, 501-510.

B

- Beilharz V.C., Parberry D.G., Swart H.J., 2002 - A selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, n° 79, p.p.507-511
- *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia*, 91(2), 365-385.
- *Biosyst. Eng.*, 2013, 36, 1613–1619, DOI: 10.1007/s00449-013-0937-z.
- Bouchara, J. P, et al. (2010). *Les levures et levures (Vol. 44): Bioforma.*
- Brown D: Antibiotic resistance breakers: can repurposed drugs fill the antibiotic discovery void? *Nature Reviews Drug Discovery* 2015,14(12):821
 - Botton, B., Bretton, A., Fever M., Gautier, S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond, P., Sanglier, J.J., Vayssier, Y and Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, (edn) Masson, Paris.

- Barrios, Gonzalez, j, Mejia, A. (2008). Production of antibiotics and other Commercially valuable secondary métabolites .p 302-336. In : Pendey A., Socol C.R and C. Larroche (Eds). Current developments in solid – state fermentation Asiatech Publishers, INC. SPRINGER, NEW Delhi
- Bender, C.L., Rangaswamy Vand Loper, J. (1999). Polyketide production by plant – associated *Pseudomonas* .Annu Rev. Phytopathologie

C

- C. D. Patil, P. Hemant, B. Bipinchandra, K. Salunke and S. V. Patil, Parasitol. Res., 2013, 112, 3283–3288, DOI: 10.1007/s00436-013-3507-z
- Charudattan R (2000) Current status of biological control of weeds. In: Kennedy GG, Sutton TB (eds) Emerging technologies for integrated pest management: concepts, research, and implementation. APS, St. Paul, pp 269–288.
- Chatterton, S. and Punja, Z.K. (2009) Chitinase and b-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. Can J Microbiol 55, 356–367.
- Chatterton, S. and Punja, Z.K. (2009) Chitinase and b-1,3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. Can J Microbiol 55, 356– 367.
- Chekiri-Talbi , M ... Denning, D.W., Estimation des infections fongiques en Algérie journal de mycologie médicale 2017.
- Chen Y, Geurts M, Sjollem SB, Kramer NI, Hermens JLM, Droge STJ: Acute toxicity of the cationic surfactant Cl2-benzalkonium in different bioassays : How test design affects bioavailability and effect concentrations. Environmental Toxicology and Chemistry 2014, 33(3):606-615
- *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. J Agric Food Chem 64, 2298– 2306.
- Cristescu C., 2003 - A new species of *Phomopsis* Sacc. (Mitosporic fungi) in Romania. RoumBoil–BiolVeget, n° 48, p.p.45–49.

D

- Dhanasekaran D, Thajuddin N, Panneerselvam A: Antimicrobials: synthetic and natural compounds: CRC Press; 2015.

- Dong, J.Y., He, H.P., Shen, Y.M. and Zhang, K.Q. (2005) Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *J Nat Prod* 68, 1510– 1513.

E

- El-Shanshoury, AER, ElSilk, SE, Ebeid, ME: Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using *Escherichia coli* ATCC 8739, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, and *Streptococcus thermophilus* ESh1 and their antimicrobial activities. *ISRN Nanotechnology* 2011, 1–7 (2011).
- Epanand RM, Walker C, Epanand RF, Magarvey NA: Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* 2016, 1858(5):980-987

F

- Farha MA, Brown ED: Strategies for target identification of antimicrobial natural products. *Natural product reports* 2016, 33(5):668-680.
- Fatema, U., Broberg, A., Jensen, D.F., Karlsson, M. and Dubey, M. (2018) Functional analysis of polyketide synthase genes in the biocontrol fungus *Clonostachys rosea*. *Sci Rep* 8, 15009.
- Federici B. A., H. W. Park and Y. Sakano, Insecticidal protein crystals of *Bacillus thuringiensis*, in *Inclusions in Prokaryotes*, ed. J. M. Shively, Springer, Berlin, 2006, pp. 195–236
- Firáková S., Šturdíková M., Múčková M., 2007 - Bioactive secondary metabolites produced by microorganisms associated with plants. *Bio logia*, Bratislava, Section Botany, n°62(3), p.p.251-257.

G

- Garcia-Reyne A, López-Medrano F et al (2011) cutaneous infection by *Phomopsis longicolla* in a renal transplant recipient from Guinea: first report of human infection by this fungus. *Transpl Infect Dis* 13:204–207.
- Gharizadeh, Kh.Khodaparast S, A. Mehrdad A. (2004)Une étude sur l'identification du bois habitant les Hyphomycètes dans la province de Gilan, Iran (II).
- Guardabassi L, Courvalili P: Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: *Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin*. American Society of Microbiology; 2006: 1-18.
-

H

- Halouane F., 2008 - Recherche Fondamentale sur l'entomopathogène *Beauveria bassiana* (Blas.-Criv.)Vuill. (Acsomycota:Hypocreales), Thèse de doctorat, Institut National Agronomique D'EL Harrach. Algérie.
- Health Canada: Guidance document - Disinfectant drugs. In. Edited by Minister of Health Petitpas Taylor. Ottawa, Ontario, K1A OK9; 2018.
- Hett A Nanotechnology: small matters many unknown.2004.
- Hu, Q., Li, F., and Zhang, Y., Risks of mycotoxins from mycoinsecticides to humans, *BioMed Res. Int.*, 2016. Article ID 3194321, 13 pages. <http://dx.doi.org/>. doi 10.1155/2016/3194321.
- Husseiny, M., Aziz, MAE, Badr, Y, Mahmoud, MA, "Biosynthesis of gold nanoparticles using *Pseudomonas aeruginosa*". *Spectrochimica. Acta. Part A.*, 2006. 67: p. 1003-1006.

I

- Inglis G.D., Goettel M.S., Butt T.M., Strasser H., 2001 - Use of Hyphomycetous Fungi for Managing Insect Pests. *Fungi as biocontrol agents*, p.p.23-69.
- Isabelle Verdier¹, Gérard Lina¹, Yves Gillet¹⁻² et François Vandenesch¹ (2000) Cours de Bactériologie Médicale Faculté de Médecine Laennec, Lyon, Service de Pédiatrie, Hôpital Edouard Herriot, Lyon.

J

- Jalgaonwala RE., Mohite BV., Mahajan RT. (2011). A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *Journal of microbiology biotechnology research*, 1(2), 21-32
- Jha, A., Prasad, K, Prasad, K, Kulkarni, AR, "Plant system: nature's nanofactory". *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2009. 73: p. 219-223.

K

- Keswani C., Singh S.P., Singh H.B., 2015 - *Beauveria bassiana*: Status, Mode of action, Applications and Safety issues. *Biotech Today*, n° 3(1), p.p.16-20.
- Kim K. J., W. S. Sung, B. K. Suh, S. K. Moon, J. S. Choi, J. G. Kim, D. G. Lee, et al., *BioMetals*, 2009, 235–242.

L

- Larry M. Bush, MD, FACP, Charles E.(2020) Infections par *Escherichia coli* , Schmidt College of Medicine, Florida Atlantic University; (Manuel MSD)

- Li S, Hartman GL, Boykin DL (2010a) Aggressiveness of *Phomopsis longicolla* and other *Phomopsis* spp. on soybean. *Plant Dis* 94:1035–1040
- Li YY, Wang MZ, Huang YJ, Shen YM (2010b) Secondary metabolites from *Phomopsis* sp. A123. *Mycology* 1:254–261.
- Lipa D.T., Rajesha R.K., Tombisanaa. ,Majumdera D., 2017 - Antagonistic potential of *Beauveria* sp. against phytopathogens. *Bull Env Pharmacol Life Sci*, n° 6(3), p.p.207-212.

M

- Marcelo Tavares de CASTRO, Sandro Coelho Linhares MONTALVÃO, Daniela Aguiar de SOUZA, Rose Gomes MONNERAT(2017) Présence et pathogénicité de *Beauveria bassiana* à *Hypsipyla grandella* recueillie à Brasilia, Faculté d'agronomie et de médecine vétérinaire, Université de Brasilia, District fédéral, Brésil.
- Maria T. Vazquez-Pertejo, MD, FACP, (2020) Infections à *Pseudomonas* et infections similaires, Wellington Regional Medical Center. (Manuel MSD).
- Ministère de l'écologie et du développement(MED) ,2006. Nanotechnologies et
- Mohamed Mahmoud F., 2017 - Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.).p191. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie.
- Mokhtari, M, Deneshpojoh, S, Seyedbagheri, S, Atashdehghan, R, Abdi, K, Sarkar, S, Minaian, S, Shahverdi, RH, Shahverdi, RA: Biological synthesis of very small silver nanoparticles by culture supernatant of *Klebsiella pneumoniae*: the effects of visible-light irradiation and the liquid mixing process. *Mater. Res. Bull.* 44, 1415–1421 (2009).
- Montecalvo MA: Ramoplanin: a novel antimicrobial agent with the potential to prevent vancomycin-resistant enterococcal infection in high-risk patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003.
- Mouekouba L.D.O., Zhang L., Guan X., Chen X., Chen X., Chen H., Zhang J., Zhang J., Li J., Yang Y., Wang A., 2014 - Analysis of *Clonostachys rosea*-Induced Resistance to Tomato Gray Mold Disease in Tomato Leaves. *Plos One*, n° 9(7), p.p.1- 15.
- Mouekouba, L.D., Zhang, L., Guan, X., Chen, X., Chen, H., Zhang, J., Zhang, J., Li, J. et al. (2014) Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to tomato gray mold disease in tomato leaves. *PLoS One* 9, e102690.
- Mourato A., M. Gadanho, A. R. Lino and R. Tenreiro, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2011, 546074
- Mugnai, L., Bridge, P. D., & Evans, H. C. (1989). A chemotaxonomic evaluation of the genus *Beauveria*. *Mycological Research*, 92(2), 199-209.

- Meyer, J M and Abdallah, M, A. (1978). The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens* : biosyntheses, purification and physio chemical properties J Gen Microbio.107.319.

N

- Najitha B. and C. Balasubramanian, Parasitol. Res., 2014, 113, 2869–2877, DOI: 10.1007/s00436-014-3948-z
Nanoparticules quels dangers quels risques. p53.

O

- Ortiz-Ribbing L, Williams MM (2006) conidial germination and germ tube elongation of *Phomopsis amaranthicola* and *Microsphaeropsis amaranthi* on leaf surfaces of seven *Amaranthus* species: implications for biological control. Biol Control 38:356–362.
- Oulymata G. Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif [Thèse]. Dakar : Université Cheikh Anta Diop de Dakar; 2007

P

- P. L. Nadworny, J. Wang, E. E. Tredget and R. E. Burrell, Nanomedicine, 2008, 4, 241–251.
- Peipei Han, Xuping Zhang, Dan Xu, Bowen Zhang, Daowan Lai et Ligang Zhou, 2020. Metabolites from *Clonostachys* Fungi and Their Biological Activities, , 6, 229; doi:10.3390/jof6040229
- Prasanna D. Khot, Peter A. Suci , R. Lance Miller , Raoul D. Nelson , and Bonnie J. Tyler 2006 , A Small Subpopulation of Blastospores in *Candida albicans* Biofilms Exhibit Resistance to Amphotericin B Associated with Differential Regulation of Ergosterol and β -1,6-Glucan Pathway Genes NOUVEAU!

R

- Rodrigo M., Saraiva-Kirk J., Czymmek, Álefe V., Borges-Nilmaria P., Caires., Maffia L.A., 2015 - Confocal microscopy study to understand *Clonostachys rosea* and *Botrytis cinerea* interactions in tomato plants. Biocontrol Science and Technology, n° 25(1), p.p.56-71.
- Rodríguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N. and Godeas, A. (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. J Appl Microbiol 110, 1177– 1186.
- Rodriguez, M.A., Cabrera, G., Gozzo, F.C., Eberlin, M.N. and Godeas, A. (2011) *Clonostachys rosea* BAFC3874 as a *Sclerotinia sclerotiorum* antagonist: mechanisms involved and potential as a biocontrol agent. J Appl Microbiol 110,1177–1186.

- Rodríguez-Martínez, R., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., Lopez-Arellano, M.E., Gamboa-Angulo, M., Hanako Rosas-Saito, G., Reyes-Estebanez, M. and Guadalupe García-Rubio, V. (2018) In vitro lethal activity of the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) against nematodes of five different taxa. *Biomed Res Int* 2018, 350182.
- Rodríguez-Martínez, R., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M.E., Gamboa-Angulo, M., Hanako Rosas-Saito, G., Reyes-Estébanez, M. and Guadalupe García-Rubio, V. (2018) In vitro lethal activity of the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) against nematodes of five different taxa. *Biomed Res Int* 2018, 3501827.
- Roskopf E.N., Charudattan R., DeValerio J.T., Stall W.M., 2000b - Field evaluation of *Phomopsis amaranthicola*, a biological control agent of *Amaranthus* spp. *Plant Dis*, n° 84, p.p.1225–1230.
- Roskopf E.N., Charudattan R., Shabana Y.M., Benny G.L., 2000a - *Phomopsis amaranthicola*, a new species from *Amaranthus* sp. *Mycologia*, n° 92, p.p.114–122.
- Rossman A.Y., Farr D.F., Castlebury L.A., 2007 - A review of the phylogeny and biology of the Diaporthales. *Mycoscience*, n° 48, p.p.135–144.

S

- Sabbahi R., 2008 - Utilisation de champignons entomopathogènes *Beauveria bassiana* dans une stratégie de gestion phytosanitaires des principaux insectes ravageurs Fraiseriaies, Thèse de doctorat, Université Québec. Canada.
- Samsudin, N.I., Rodriguez, A., Medina, A. and Magan, N. (2017) Efficacy of fungal and bacterial antagonists for controlling growth, FUM1 gene expression and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* on maize cobs of different ripening stages. *Int J Food Microbiol* 246, 72– 79.
- Saranraj P., Jayaprakash A., 2017 – Agrobeneficial Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana*: A review. *Indo-Asian Journal of Multidisciplinary Research (IAJMR)*, n° 3, p.p.1051-1087.
- Schroers, H. J., Samuels, G. J., Seifert, K. A., & Gams, W. (1999). Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to
- Shrestha B, Polchrel BM, Mohapatra TM: Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus*: A Review. *Recent Advances in Microbiology* 2012.

- Singh R., Dubey AK. (2015). Endophytic actinomycetes as emerging source for therapeutic compounds. *Indo Global Journal of pharmaceutical sciences*, 5, 106-116.
- Sinha S. H., L. Pan, P. Chanda and S. K. Sen, *J. Appl. Biosci.*, 2009, 19, 1113–1130
- Sintubin L., W. Verstraete and N. Boon, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109, 2422–2436.
- Soni N. and P. Soam, *Ann. Microbiol.*, 2013, 64, 1099–1111, DOI: 10.1007/s13213-013-0749-z.
- Sun Y, Shang D: Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators of Inflammation* 2015
- Sutton J.C., Li D.W., Peng G., Yu H., Zhang P., Valdebenito-Sanhueza R.M., 1997 – *Gliocladium roseuma* versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, n°81(4), p.p.316–328.
- Santos, T.S.; Passos, E.M.d.; Seabra, M.G.d.J.; Souto, E.B.; Severino, P.; Mendonça, M.d.C. Entomopathogenic Fungi Biomass Production and Extracellular Biosynthesis of Silver Nanoparticles for Bioinsecticide Action. *Appl. Sci.* 2021, 11, 2465. <https://doi.org/10.3390/app11062465>

T

- Toledo A., Virla E., Humber R., Paradell S., Lastra C.L., 2006 - First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopiatuc umana* and *Sonesimiagrossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. *Journal of Invertebrate Pathology*, n° 92, p.p.7–10.
- Tong-kwee, L., Muhamad, R., Fee Gait, C. and Lan Chiew, C. 1989. Studies on *Beauveria bassiana* isolated from the cocoa mirid, *Helopeltis theobromae*. *Crop Protection* 8: 358-362.
- Tong, W.Y., Ang S., Darah, I et Latiffah, Z. (2014). Antimicrobial Activity of *Penicillium Minioluteum* ED24, An Endophytic Fungus Residing In *Orthosiphon Stamineus* Benth. *Journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* 3, 121-132.
- Trujillo EE (2005) History and success of plant pathogens for biological control of introduced weeds in Hawaii. *Biol Control* 33:113–122.
 - Thomashow, L. (1996). Biological control of plant root pathogens. *Curr Opin . Biotechnol.* N° 7, 343- 347.
- Tenguria, R K., Khan F N and Quereshi S. (2011). Endophytes- mines of pharmacological therapeutics, *World Journal of Science and Technology*, 1(5) : 127149 ISSN : 2231 – 2587.

U

- Udayanga D., Liu X., 2011 - The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*, n° 50, p.p.189– 225.

V

- VanMeter KC, Hubert RJ: *Microbiology for the Healthcare Professional-EBook*: Elsevier Health Sciences; 2015.
- Ventola CL: The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics* 2015, 40(4):277-283.
- Vigneshwaran, N, Kathe, AA, Varadarajan, PV, Nachane, RP, Balasubramanya, RH: Biomimetics of silver nanoparticles by white rot fungus, *Phaenerochaete chrysosporium*. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 53, 55–59 (2006)

W

- Wink M: Evolutionary Advantage and Molecular Modes of Action of MultiComponent Mixtures Used in Phytomedicine. *Current Drug Metabolism* 2008, 9(10):996-1009.

Y

- Yongqing. Q, Y. Huimei, H. Dan, Y. Hui, W. Wanting, W. Xue and W. Li, *Bioprocess*

Z

- Zerroug A. (2011). *Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de retama raetam Forssk (Doctoral dissertation)*.89 pages. Mémoire de magister, microbiologie. Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université Ferhat Abbas, Sétif, Algérie.
- Zhai, M.M., Qi, F.M., Li, J., Jiang, C.X., Hou, Y., Shi, Y.P., Di,D.L., Zhang, J.W. et al. (2016) Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *Clonostachys rosea* YRS-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. *J Agric Food Chem* 64, 2298–2306.
- Zhang H., Bai X., Wu B. (2012). Evaluation of antimicrobial activities of extracts of endophytic fungi from *Artemisia annua*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 7(2), 120-123.
- Zimmermann G., *Biocontrol Science and Technology*, 2007, 17, 553–596.
- Zimmermann, G., Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*, *Biocontrol Sci. Technol.*, 2007, vol. 17, pp. 553–596.
 - Z.-B. Sun, S.-D. Li, Q. Ren, J.-L. Xu,X.Lu and M.-H. Sun (2020) *Biology and applications of Clonostachys rosea* .

ANNEXES

Annexe A**Composition des milieux de culture utilisés pour un litre de milieu****Milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) : (Jonsthor et Booth, 1983)**

Pomme de terre	200 g
----------------	-------

Glucose	20 g
---------	------

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

Eau distillée	10000 ml
---------------	----------

PH 6 autoclavage 20 min à 120°C

Milieu de culture PDB (Potato Dextrose Broth) : (Jonsthor et Booth, 1983)

Pomme de terre	200 g
----------------	-------

Glucose	20 g
---------	------

Eau distillée	10000 ml
---------------	----------

PH 6 autoclavage 20 min à 120°C

Milieu de culture Chapman :

Peptone	11.0 g
---------	--------

Extrait de viande	1.0g
-------------------	------

Chlorure de sodium	75g
--------------------	-----

Mannitol	10 g
----------	------

Rouge de phénol	0.025g
-----------------	--------

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

Ph 7.4

Milieu de culture MacConkey :

Peptone (Digestion pancréatique de gélatine) 17g

Protéose peptone (viande et caséine)	3 g
--------------------------------------	-----

Lactose monohydraté	10g
---------------------	-----

Les sels biliaires	1,5 g
--------------------	-------

Chlorure de sodium	5 g
--------------------	-----

Rouge neutre	0,03 g
--------------	--------

Violet cristallisé	0,001 g
--------------------	---------

Gélose	13,5 g
--------	--------

Milieu de culture GN (gélose nutritive)

Peptone	5 g
Extraits de viande :	1 g.
Extraits de levure :	2 g
Chlorure de sodium :	5 g
Agar	15 g

Annexe B**Appareils**

Non de l'appareil	Photo (original)	Non de l'appareil	Photo (original)
Agitateur		Etuve	
Autoclave		Balance	
Pied à collise		Hotte	

Microscope		Centrifugeuse	
-------------------	---	----------------------	---

Petit matériel

Aiguilles

Bavette

Bec bunsen

Boîtes pétrie en plastique et en verre.

Ciseaux

Coton

Entonnoirs en verre

Eprouvette en verre

Eprouvette graduée 100ml

Flacons 250ml.

Papier filtre

Papier aluminium

Para film

Pipete pasteur

Tubes à essai en plastique

