

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA- I



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire
Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de master II
Option : Microbiologie

Thème

Evaluation du potentiel antimicrobien d'*Aspergillus terreus*

Présenté par :

Mlle Lounas Imane

Mlle Lounas Feriel

Soutenu le 12/09/2020

Devant le jury composé de :

HAMAIDI F.

Professeur/ USDB1

Présidente

MOHAMED MAHMOUD F.

MCB /USDB1

Promotrice

MEKLAT A.

Professeur/USDB1

Examinatrice

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019 /2020

Remerciements

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

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nos plus vifs Remerciements à notre PROMOTRICE **MOHAMED Mahmoud f**, Merci pour vos conseils, votre soutien, votre esprit critique et votre disponibilité durant tout la période de travailles, merci pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant, merci pour ces encouragements et son amitié*

*Je remercie aussi Mme, **MaKaoui N** Co-promotrice qui a rendu possible la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à Professeur **Hamaïdi F**, Qui a accepté de a présider le jury de soutenance, pour tout ce qu'il a pu nous apprendre ; qu'il trouve ici l'expression de notre profonde et sincère reconnaissance.*

*J'exprime mes vifs remerciements à Mme **Meklat A**, pour nous avoir d'accepter d'examiner ce travail.*

*Je remercie très vivement Mme **SALMA**, ingénieure de laboratoire de Phytopathologie Pour leurs aides et leur gentillesse*

Mes remerciements s'adressent aussi à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

*A ma princesse maman **FATIHA** affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*A mon très cher père **ABED EL KADER** aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi.*

*A la fleur de notre maison **NAMIRA** et mon frère **AMINE** les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous.*

*A la plus belle et plus précieuse **CHIRAZ.** , je vous souhaite une vie plein de bonheur, et. Que Dieu vous protégé et consolide les liens sacrés qui nous unissent, A ma copine **Manal** puisse Dieu vous garder toujours auprès de moi dans le bonheur et la prospérité*

*Je dédie **CHAHIRA** et son mari **HAMICH** et aussi **IBTISSAM ET TARAK**, les mots ne sauraient exprimer l'étendu de mon affection et de ma gratitude*

*Tout amour et appréciation pour ma grand -Mère **MASOUDA** et mon grand-père **RACHID** qu'**ALLAH** te garde et te protège et lui offre le paradis. A **SAMAH** et **AMINA** A mes oncles **FISEL ET BOUALEM** aucune dédicace ne saurait exprimer l'estime le respect e l'amour que je vous porte.*

Liste des abréviations

LPS : Lipo- Poly- Saccharide

TSA : Trypticase-Caséine-Soja

UFC : Unité Formant Colonie

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

PNR : Peptides Non Ribosomaux

HMG-CoA : Hydroxyéthylglutaryl-CoA

AgNP : Nanoparticules d'argent

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

MSFB : Métabolite Secondaire Fongique Brut

MSB : Métabolites Secondaire Brut

ATB : Antibiotique.

Listes des figures

Figure 01 : Structure chimique de (A) : terpène. (B) : terpénoïde	5
Figure 02 : Structure chimique d'alcaloïde.....	6
Figure 03 : Exemple de polycétide (Geldanamycine)	6
Figure 04 : Exemple de peptide non-ribosomique illustrant la diversité de ces peptides	7
Figure 05 : Structure chimique de phénol	8
Figure 06 : Organigramme récapitulatif des principales voies des métabolites secondaires ...	9
Figure 07 : Mécanisme d'action des antibactériens	11
Figure 08 : Mécanisme d'action des antifongiques	14
Figure 09 : Les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> étudiées A (AA1101) ; B (B 1283) ; C (2257) ; D (T 1172) ; E et F montres le verso de boîte : <i>Aspergillus terreus</i>	28
Figure 10 : Schéma récapitulatif des étapes de récupération de filtrat de culture d' <i>Aspergillus terreus</i>	30
Figure 11 : Préparation des disques d' <i>Aspergillus terreus</i> . A, B, C, D : (B1283, T2257, AA1101, T1172).....	31
Figure 12 : Dépôt des disques mycéliens d' <i>Aspergillus terreus</i> (B1283, AA1101, T1172, T 2257) dans le milieu PDB.....	32
Figure 13 : Flacons contentent les disques mycéliens placés sous agitation continue.....	33
Figure 14 : Filtration du bouillon de culture. A : par mèche à gaz stérile B : par papier Filtre stérile.....	33
Figure 15 : Centrifugation du bouillon de culture à 1500 tours /min pendant 20 minutes....	34
Figure 16 : la coloration du Gram.....	36
Figure 17 : Illustration de la technique de diffusion par disque.....	38
Figure 18 : Trempage d'écouvillon dans la suspension bactérienne et emplacement de disque.....	38

Figure 19 : (A) Observation macroscopique (B) microscopique (G×32) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Figure 20 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique (G×100) (B) de <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Figure 21 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique (G × 100) d' <i>Escherichia coli</i>	42
Figure 22 : Observation d' <i>Aspergillus terreus</i> (A) macroscopique sous la loupe binoculaire et (B) microscopique (Gx32).....	42
Figure23 : (A) L'observation macroscopique (B) : Observation microscopique (G×100) d' <i>Aspergillus brasiliensis</i>	43
Figure 24 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique (G×100) de <i>Candida albicans</i>	44
Figure 25 : Zone d'inhibition exercée par les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> (AA1101. T2257. B1283, T1172) à l'encontre des souches bactériennes testées	46
Figure 26 : Zone d'inhibition exercée par les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> à l'encontre des souches bactériennes testées par la technique des disques : (A ; B) <i>Staphylococcus aureus</i> (C ; D) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (E ; F) <i>Escherichia Coli</i>	47
Figure 27 : Variation des zones d'inhibitions exercées par les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> vis-à-vis <i>C.albicans</i> et <i>A. brasiliensis</i>	49
Figure 28 : Zones d'inhibitions exercées par les filtrats de culture des souches d' <i>Aspergillus terreus</i> vis-à-vis des souches fongiques. (A) <i>Candida albicans</i> et (B) <i>Aspergillus brasiliensis</i>	50

Liste des tableaux

Tableau I : Mycètes producteurs d'antibiotiques.....	10
Tableau II : Les espèces d' <i>Aspergillus</i> producteurs des mycotoxines.....	15
Tableau III : La classification d' <i>Aspergillus terreus</i>	18
Tableau IV : La Classification de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
Tableau V : La classification d' <i>Escherichia coli</i>	21
Tableau VI : La classification de <i>Staphylococcus aureus</i>	22.
Tableau VII : La classification de <i>Candida albicans</i>	24
Tableau VIII : La classification d' <i>Aspergillus brasiliensis</i>	25
Tableau IX : Origine et provenance des endophytes fongiques.....	27
Tableau X : La moyenne des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	45
Tableau XI : La moyenne des zones d'inhibition (mm) exercées par des souches d' <i>Aspergillus terreus</i> vis-à-vis des souches fongiques testées.....	49
Tableau XII : Les zones d'inhibitions du premier essai (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	Annexe
Tableau XIII : Les zones d'inhibitions du deuxième essai (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	Annexe 04
Tableau XIV : La moyenne des zones d'inhibitions du premier essai (mm) exercées par les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> vis-à-vis les souches bactériennes testées.....	Annexe 04
Tableau XV : La moyenne des zones d'inhibition (mm) du deuxième essai des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	Annexe 04
Tableau XVI : Les zones d'inhibition (mm) des deux essais exercées par les souches d' <i>Aspergillus terreus</i> vis-à-vis <i>Candida albicans</i> et <i>Aspergillus brasiliensis</i>	Annexe 04

Résumé

Les métabolites secondaires d'origine microbienne, représentent une source potentielle dans le domaine pharmaceutique afin de traiter diverses maladies. En effet, les bactéries impliquées en pathologie humaine ont développé des mécanismes de résistance vis-à-vis de certains antibiotiques. Ce problème pousse à rechercher de nouvelles substances bioactives produites plus spécialement par des champignons endophytes. Pour palier à ce problème, ce travail est basé sur l'évaluation de l'effet antibactérien de quatre souches d'*Aspergillus terreus* (B1283, AA1101, T2257, T1172) à l'encontre de trois bactéries pathogènes (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) et deux champignon (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*) par méthode des disques.

L'observation macroscopique et microscopique des souches pathogènes précédemment citées confirme leurs purtés et leurs appartenances aux espèces étudiées l'évaluation de l'activité antibactérienne des souches d'*Aspergillus terreus* à l'encontre des pathogènes étudiées, montre une variation selon le filtrat de culture et la souche testée. En présence d'*E. coli*, la zone d'inhibition été plus importante 3,28 mm enregistré en contact avec le filtrat de culture de la souche B1283, alors que la plus faible 0,74 mm a été constaté en présence du filtrat de culture de la souche AA1101 d'*Aspergillus terreus*. Selon les valeurs critiques données par Ponce et al., (2003), ces souches sont considérées comme résistantes, intermédiaires ou sensibles. *E. coli* était sensible vis-à-vis de la souche B1283, *Pseudomonas aeruginosa* était sensible à l'encontre de B1283 et T2257, alors que *Staphylococcus aureus* était sensible seulement en présence de témoin positif utilisé (pénicilline).

L'activité antifongique a montré que vis-à-vis d'*Aspergillus brasiliensis*, la zone d'inhibition la plus élevé 0,45 mm a été constaté en présence du filtrat de culture de la souche (T1172), tandis que aucun effet n'a été enregistré à l'encontre de *Candida albicans* en présence de filtrat de culture de la souche (AA1101). En comparaison avec les valeurs critiques de Pappas et al., (2009), les souches d'*Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* sont considérées comme résistantes à l'égard de tous les filtrats de cultures étudiés.

D'après ces résultats *Aspergillus terreus* représente une source des nouvelles molécules bioactives. Qui peuvent résoudre le problème de la multi-résistance aux antibiotiques.

Mot clés : *Aspergillus terreus*, activité antimicrobienne, confrontation indirecte, *E. coli*, *Aspergillus brasiliensis*

Abstract

Secondary metabolites of microbial origin, represent a potential source in the pharmaceutical field to treat various diseases. In fact, the bacteria involved in human pathology have developed resistance mechanisms to certain antibiotics. This problem leads to the search for new bioactive substances produced especially by endophytic fungi. To address this problem, this work is based on the evaluation of the antibacterial effect of four strains of *Aspergillus terreus* (B1283, AA1101, T2257, T1172) against three pathogenic bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) and two fungi (*Candida albicans* and *Aspergillus brasiliensis*) by disc method.

The macroscopic and microscopic observation of the pathogenic strains mentioned above confirms their purteness and their belonging to the species studied the evaluation of the antibacterial activity of the strains of *Aspergillus terreus* against the pathogens studied, shows variation according to culture filtrate and strain tested. In the presence of *E. coli*, the inhibition zone was greater than 3.28 mm in contact with the culture filtrate of strain B1283, while the lowest 0.74 mm was found in the presence of the culture filtrate of *Aspergillus terreus* strain AA1101.. According to the critical values given by Ponce et al., (2003), these strains are considered resistant, intermediate or sensitive. *E. coli* was susceptible to B1283, *Pseudomonas aeruginosa* was susceptible to B1283 and T2257, while *Staphylococcus aureus* was susceptible only in the presence of used positive controls (penicillin).

The antifungal activity showed that, with respect to *Aspergillus brasiliensis*, the highest inhibition zone 0,45 mm was found in the presence of the strain culture filtrate (T1172), while no effects were observed in *Candida albicans* in the presence of culture filtrate of the strain (AA1101). In comparison with the critical values of Pappas et al. (2009), the strains of *Aspergillus brasiliensis* and *Candida albicans* are considered resistant to all crop filtrates studied.

According to these results, *Aspergillus terreus* is a source of new bioactive molecules. Which can solve the problem of multi-antibiotic resistance.

Keywords : *Aspergillus terreus*, Antimicrobial activity, indirect confrontation, *E. coli*, *Aspergillus brasiliensis*.

المخلص

تمثل نواتج المستقلبات الثانوية ذات الأصل الميكروبي مصدراً محتملاً في المجال الصيدلاني لعلاج مختلف الأمراض في الواقع، وضعت البكتيريا المشاركة في علم الأمراض البشرية آليات مقاومة لبعض المضادات الحيوية هذه المشكلة تؤدي إلى البحث عن المواد النشطة بيولوجيا جديدة التي تنتج بشكل أكثر تحديداً من الفطريات Endophytes.

هذه المشكلة تؤدي إلى البحث عن المواد النشطة بيولوجيا جديدة تنتجها الفطريات على وجه التحديد. لمعالجة هذه المشكلة ويستند هذا العمل تقييم تأثير مضاد للبكتيريا من أربع سلالات من سلالات أسبيرجيلوس تيريوس

(Pseudomonas aeruginosa) ، AA1101, T2257, T1172.) ضد ثلاث بكتيريا مسببة للأمراض (

Staphylococcus aureus، Escherichia coli) واثنين من الفطريات Aspergillus brasiliens و

Candida albicans). عن طريق المواجهة القرص الأسلوب.

المراقبة العيانية والمجهرية للسلالات المسببة للأمراض المذكورة أعلاه تؤكد تنقيتها وانتماءاتها إلى الأنواع التي تم دراستها تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من السلالات من أسبيرجيلوس تيريوس ضد المسببة للأمراض المدروسة، وتظهر تبايناً وفقاً للفترات اختبار الثقافة والسلالة.

يمثل B 1283 في وجود E.coli مرشح ثقافة أكبر بقيمة 3.28 مم في حين تم العثور على أدنى قيمة 0.74 مم في وجود الفترات ثقافة AA1101 من أسبيرجيلوس تيريوس ووفقاً للقيم الحاسمة التي قدمها بونس وآخرون (2003) ، وتعتبر هذه السلالات مقاومة أو وسيطة أو حساسة.

E. coli حساس لسلالات B1283، Pseudomonas aeruginosa حساسة ضد T2257 و B1283 في حين كانت Staphylococcus aureus حساسة فقط في وجود السيطرة الإيجابية المستخدمة (البنسلين).

أظهر النشاط المضاد للفطريات أنه ضد Aspergillus brasiliens ، لوحظ أعلى منطقة تثبيط 0.45 مم في وجود الفترات (T1172) بينما لم يلاحظ أي تأثير. تم تسجيله في Candida albicans في وجود الفترات ثقافة لسلالة (AA1101). بالمقارنة مع القيم الحرجة ل Pappas et al. (2009) تعتبر سلالات Aspergillus brasiliens و Candida albicans مقاومة لجميع الفترات ثقافة التي تمت دراستها.

وفقاً لهذه النتائج يمثل Aspergillus terreus مصدراً للجزيئات النشطة بيولوجياً الجديدة الذي يستطيع حل مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية.

الكلمات المفتاحية: Aspergillus terreus ، النشاط المضاد للميكروبات، لمواجهة غير المباشرة Escherichia coli ،

Aspergillus brasiliens

Table des matières

Résumé

Summary

الملخص

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

I.1.Généralité sur Les métabolites secondaires3

I.2.Classification des métabolites secondaires4

I.2.1.Les terpènes et les terpénoïdes.....4

I.2.2.Les alcaloïdes5

I.2.3.Les polycétides.....6

I.2.4.Les Peptides non ribosomiques.....7

I.2.5.Les composés phénoliques7

I.3.La biosynthèse des métabolites secondaires chez les microorganismes8

I.4.Les Activités biologiques des molécules bioactifs10

I.4.1. Les propriétés antibactériennes	10
I.4.2. Les propriétés antivirales	12
I.4.3. Les propriétés antioxydantes.....	12
I.4.4. Les propriétés anticancéreuses.....	13
I.4.5. Les propriétés antifongiques.....	13
I.5. <i>Aspergillus terreus</i>	16
I.5.1. La provenance des molécules bioactives	16
I.5.2. La classification d' <i>Aspergillus terreus</i>	17
I.6. Généralité sur les bactéries et les champignons pathogènes	18
I.6.1. Les bactéries pathogènes	18
I.6.1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
I.6.1.2. <i>Escherichia coli</i>	20
I.6.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
I.6.2. Les champignons pathogènes	23
I.6.2.1. <i>Candida albicans</i>	23
I.6.2.2. <i>Aspergillus brasiliensis</i>	24

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1. Matériel	27
II.1.1. Matériel biologique	27
II.1.2. Matériel non biologique	29
II.2. Méthodes	29
II.2.1. Régénération des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	29
II.2.2. Fermentation et récupération du filtrat de culture d' <i>Aspergillus terreus</i>	29

II.3. Régénération des souches bactériennes et fongiques testés.....	34
II.3.1. Observation morphologique des souches fongiques et bactériennes.....	34
II.4. Mis en évidence de l'activité antibactérienne	36
II.4.1. Technique des disques.....	37
II.4.2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	39

Chapitre III : Résultat et discussion

III.1. Résultats et interprétation	40
III.1.1. Caractérisation morphologique des souches fongiques et bactériennes étudiées.....	40
III.1.2. Activité antibactérienne	44
III.1.3. Activité antifongique	48
III.2. Discussions.....	51
IX. Conclusion	55
X. Références bibliographiques	
XI. Annexe	

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 développe 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 (**Abu Seidah, 2003**). Certaines espèces endophytes produisent ces métabolites et plus spécialement *Aspergillus terreus* qui est un producteur exceptionnel de ces molécules bioactif et possède une grande importance économique, écologique, médicale et pharmaceutique. Il a la capacité de produire des molécules avec des propriétés antibactériennes tel que la flavipine, la terreine. En raison à la fois de leur utilité et leur activité biologique des chercheurs, ont réalisé encore des études sur des nouvelles molécules thérapeutique (**Pedro et al., 2017**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à l'étude de l'activité antibactérienne et antifongique du filtrat de culture des quatre souches d'*Aspergillus terreus*. Plusieurs points sont pris en compte pour cette étude en l'occurrence :

INTRODUCTION

- La première partie théorique s'intéresse aux métabolites secondaires antimicrobiens et quelque bactérie et champignons pathogènes.
- La deuxième partie est une étude pratique a été réalisée selon les étapes suivantes :
- Etude des caractères morphologiques des souches fongiques et bactérienne
- L'activité antibactérienne et antifongique des souches d'*Aspergillus terreus* par la confrontation indirect (méthode des disques).

I- Synthèse Bibliographique

I.1.Généralité sur les métabolites secondaires

La majorité des métabolites secondaires sont synthétisés naturellement par les microorganismes (la lovastatine, la naringenine, et la citrinine). Ils sont souvent synthétisés après avoir terminé la phase de croissances tardives (idiophase) quand des stress de différentes natures commencent à s'exercer (**Bourgaud, 2013**).

Ces métabolites se caractérisent généralement par des faibles poids moléculaires, non directement impliquées dans le développement ou la reproduction d'un organisme, par opposition aux métabolites primaires qui interviennent dans le fonctionnement physiologique dans cet organisme, les métabolites secondaires sont largement utilisés en thérapeutique comme agents préventifs antiviraux, antimicrobiens, antiseptique, anticancéreux et anti-oxydants (**Ramakrishna et Ravishankar, 2011 ; Naik et al., 2016 ; Ouelbani et al., 2016**).

Il existe une grande variété de métabolites secondaires pouvant avoir des structures chimiques diverses et complexes et de très nombreuses activités biologiques comme la capacité de tuer ou inhiber la croissance des bactéries (antibiotiques), ou des champignons (antifongiques). D'autres composés peuvent jouer un rôle dans la régulation du métabolisme de l'organisme (enzymes). Certaines molécules peuvent également servir à la communication entre les cellules (quorum sensing). (**Kirst, 2010 ; Davies, 2013 ; Durairaj, 2018**).

Certains métabolites secondaires jouent le rôle d'inhibiteur d'enzymes, sont capables d'agir sur le niveau d'efficacité d'enzymes du métabolisme primaire. Ces propriétés ont donné lieu à de nombreuses applications notamment en médecine, comme la lovastatine (synthétisé par *Aspergillus terreus*) qui est capable d'inhiber l'action de la réductase d'HMG-CoA, une enzyme permettant la synthèse du mévalonate, précurseur du cholestérol (**Haas, 2015**). Les métabolites secondaires jouent plusieurs rôles dans différents domaines, ces biomolécules sont également intéressantes pour l'homme car elles sont à l'origine de nombreux médicaments. (**Mohan et al., 2009**).

I.2. Classification des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires synthétisés par les microorganismes sont très variés avec une grande diversité structurale. Leur classification est basée sur la structure chimique (présence de sucre), la composition (présence ou absence d'azote) et la voie par laquelle ils sont synthétisés. Les classes chimiques les plus retrouvées dans la nature sont les terpènes et les terpénoïdes, les alcaloïdes, les polycétides, les peptides non ribosomiques et les composés phénoliques (**Bruneton, 2009**).

I.2.1. Les terpènes et Les terpénoïdes

Les terpènes constituent le plus grand ensemble des métabolites secondaires des végétaux, notamment les plantes supérieures. Ils sont également rencontrés dans les autres types d'organismes vivants (algues, mousses, champignons, insectes) mais ils s'accumulent rarement dans les bactéries (**Guessoum, 2015**). Leur particularité structurale la plus importante est la présence dans leur squelette d'une unité isoprénique (**Boubekri, 2014**).

Les terpènes forment un groupe de produits naturels largement représenté et d'un intérêt chimique considérable très diversifié. Ils constituent le principe odoriférant des végétaux, sont généralement constitués d'unités de cinq carbones, de structures qui sont généralement libres, mais peuvent être modifiées ou transformées en esters et glycosides, ou attachées aux protéines (**Soulimani, 2016**). Ils sont formés de l'assemblage d'un nombre entier d'unités penta carbonées ramifiées dérivées du 2-méthylbutadiène, appelées unités isopréniques. Ces squelettes peuvent être arrangés de façon linéaire ou bien former des anneaux (**Figure 1**) (**Boubekri, 2014**).

Le terme « terpène » est utilisé de façon plus large en y incluant les terpénoïdes. Ces derniers peuvent être considérés comme des terpènes modifiés et ont des structures analogues aux terpènes mais ne sont pas des hydrocarbures, par exemple ils possèdent des atomes d'oxygènes donnant lieu à des groupements alcools ou cétones (**Sénéquier et Canard, 2016**). Cependant, les termes terpène et terpénoïde sont rarement séparés et couramment utilisés de manière interchangeable. Les terpénoïdes incluent, entre autres, les stéroïdes, et les caroténoïdes (**Ravan et al., 2014**).

Les terpénoïdes ont des activités biologiques et pharmacologiques variées : anti-inflammatoire, antivirus, analgésique, antibactériennes (**Bisoli et al., 2008 ; Bruneton, 2009**).

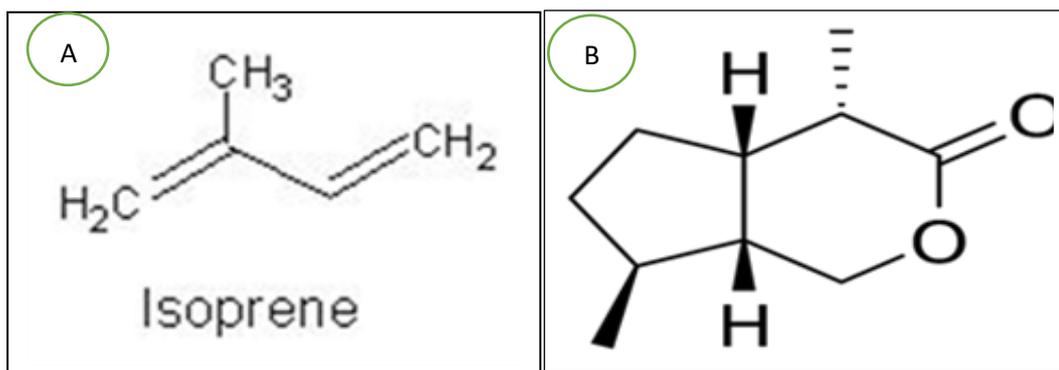


Figure 01 : Structure chimique de : (A) : terpène (Toubal, 2017). (B) : terpénoïde (Strobel et al., 1999).

I.2.2. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes sont des substances organiques azotées généralement cycliques où l'azote est assez souvent incorporé dans un noyau hétérocyclique. Généralement les alcaloïdes ont des propriétés très basiques, la plupart, ainsi comme leur nom l'indique ont une réaction alcaline, on peut les subdiviser en trois classes, alcaloïdes vrais, protoalcaloïdes et pseudoalcaloïdes (Meyer et al., 2008) (Figure 02).

- **Alcaloïdes vrais** : ce sont des dérivés d'acides aminés, dont l'atome d'azote est inclus dans le système hétérocyclique. Ils sont présents dans les plantes, soit sous forme libre, soit sous forme de sel, soit comme N-Oxyde. Ils représentent le plus grand nombre d'alcaloïdes et ils sont toxiques (Badiaga, 2011).

- **Protoalcaloïdes** : ce sont des amines simples dont l'azote n'est pas inclus dans un système hétérocyclique. Ils ont un caractère basique et sont élaborés in vivo à partir d'acides aminés. Ils sont souvent appelés « amines biologiques » et sont soluble dans l'eau (Bruneton, 2009).

- **Pseudoalcaloïdes** : présentent le plus souvent toutes les caractéristiques des alcaloïdes vrais, mais ne sont pas des dérivés des acides aminés. (Badiag, 2011).

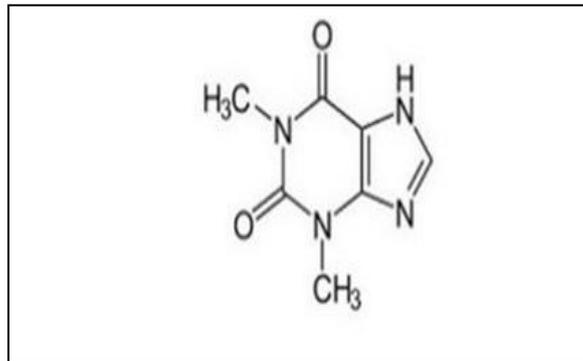


Figure 02 : Structure chimique de l'alcaloïde (Jeanot, 2005).

I.2.3. Les polycétides

Les polycétides sont un groupe de métabolites secondaires des bactéries, des champignons et des végétaux dont la diversité de leur structure et de leur activité biologique est remarquable (Gaitatzis *et al.*, 2002). Les polycétides sont connus pour être des molécules ayant des activités pharmacologiques variées, y compris des activités antimicrobiennes, antifongiques, anti parasitaires, anti-tumorales et aussi des propriétés agrochimiques, il existe une remarquable diversité de polycétide, tant en termes de structures que de fonctions (Shen, 2003) (Figure 03).

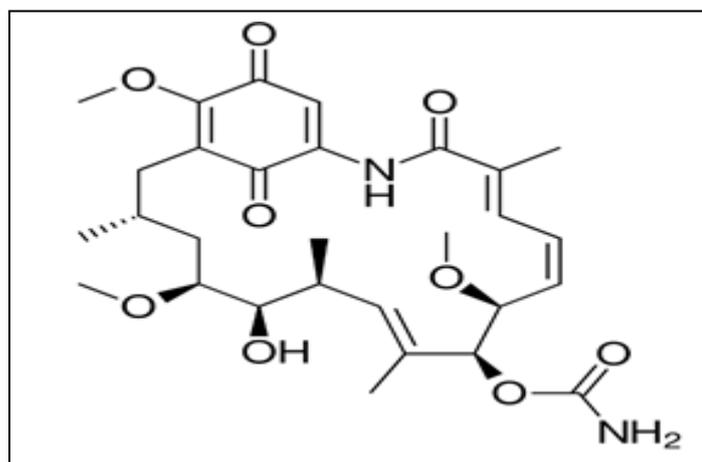


Figure 03 : Exemple de polycétide (Geldanamycine) (Shen, 2003).

I.2.4. Les peptides non ribosomiques

Les peptides non ribosomiques (PNR) sont une classe de métabolites secondaires peptidiques, généralement produits par des micro-organismes comme les bactéries et les champignons. Les peptides non ribosomiques se trouvent également dans les organismes supérieurs, tels que les nudibranches, mais ils seraient produits par des bactéries à l'intérieur de ces organismes. Les peptides non ribosomiques sont synthétisés par des synthétases peptidiques non ribosomales qui, contrairement aux ribosomes, sont indépendantes de l'ARN messager. Chaque peptide synthétase non ribosomale ne peut synthétiser qu'un seul type de peptide (**Dai et Ding, 2012**). Les diverses activités biologiques ont été classées en cinq classes : les antibiotiques, les anti-tumoraux, les toxines, les immuno-modulateurs, les sidérophores (**Schwarzer et al., 2003**) (**Figure 04**).

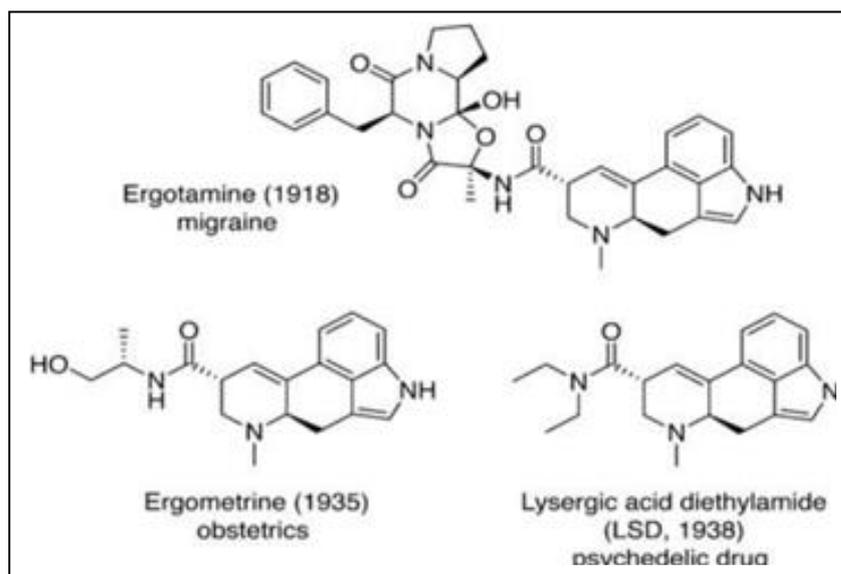


Figure 04 : Exemple de peptides non-ribosomiques illustrant la diversité de ces peptides (**Sieber et Marahiel, 2005**).

I.2.5. Les composés phénoliques

Les composés phénoliques ou les polyphénols (PP) sont une vaste classe de substances organiques cycliques très variées, dérivent du phénol. Ils constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal. Ils sont des produits du métabolisme

secondaires des plantes, le groupe le plus vaste et plus répandu des phénols est celui des flavonoïdes (Lorène *et al.*, 2016).

Les polyphénols sont les antioxydants les plus présents dans la nature permettent aux plantes de se défendre contre les phénomènes d'oxydation, certaines agressions extérieures et contre le pourrissement. Ils sont le groupe de plus étudié de métabolites secondaires (Menat, 2006 ; Ravan *et al.*, 2014) (Figure 05).

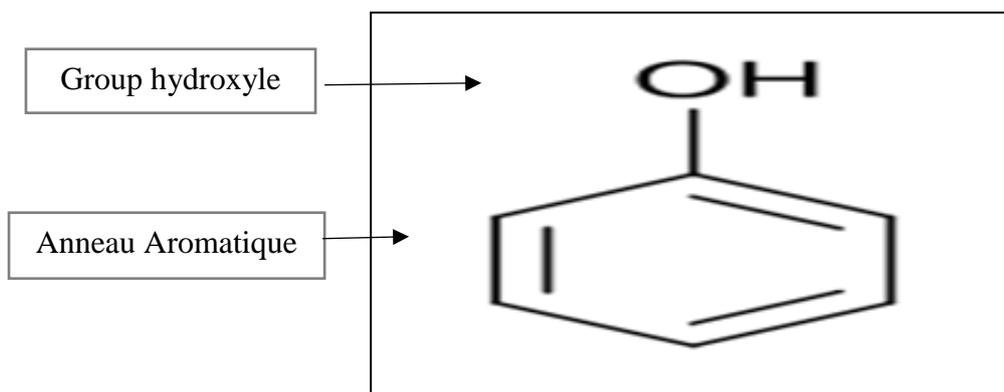


Figure 05 : Structure chimique de phénol (Manallah, 2012).

I.3.La biosynthèse des métabolites secondaires chez les microorganismes

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

Au cours de ces dernières années, de nombreux métabolites secondaires ont été découverts. Ce sont des molécules ayant des activités nouvelles dans divers domaines d'applications : pharmaceutique, cosmétique, alimentaire et agronomique (Demain et Fang, 2000).

Les principales voies de biosynthèses impliquées dans la production des métabolites secondaires sont ceux qui forment des composés aromatiques, isoprène, oligosaccharides, peptides, polycétides et anneaux de beta- lactame. De nombreux intermédiaires peuvent être utilisés pour les produire : les terpènes sont synthétisés à partir du mévalonate, les polycétides ont pour origine le malonyl CoA (malonyl Coenzyme A), les alcaloïdes et les peptides utilisent des acides aminés (Demain, 2012) (Figure 06).

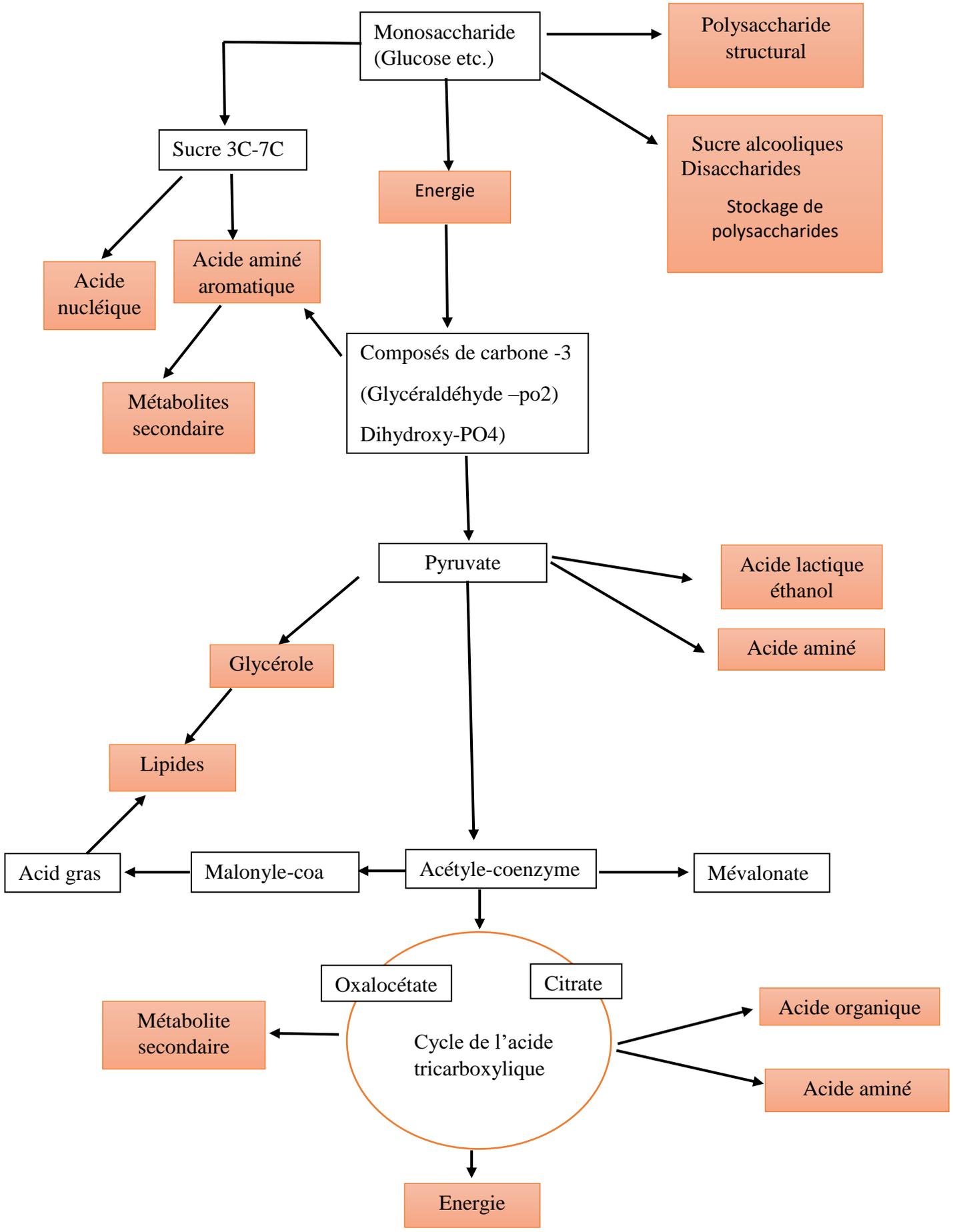


Figure 06 : Organigramme récapitulatif des principales voies de biosynthèse des métabolites secondaires fongiques (Sénéquier et Canard, 2016).

I.4. Les Activités biologiques des molécules bioactifs

Aujourd'hui, les métabolites secondaires antimicrobiens occupent une place importante grâce à son rôle, qui est l'inhibition de la croissance des bactéries, des champignons, des virus et des insectes donc, sont des agents antibactériens, antiviraux, antioxydants et anticancéreux, antifongiques (Deshmukh et al., 2015).

I.4.1. Les propriétés antibactériennes

L'histoire des antibiotiques a débuté avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 40, ils ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps (Goossens et al., 2017).

Ces molécules sont des substances chimiques et/ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Cette action peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (Mavrodi et al., 2011).

De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues pour leurs capacités de produire des antibiotiques, parmi eux *Aspergillus terreus* qui synthétise la flavipine, la terreine et la citrinine pour inhiber la croissance de plusieurs bactéries « *Trichophyton mentagrophytes* et *Sporothrix schenckii* » (Guangquan et al., 2011) (Tableau I).

Tableau I : Mycètes producteurs d'antibiotiques (Yoko, 2007 ; Berger, 2014 ; Guihong et al., 2018).

Organisme Producteur	Antibiotique
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergilliques
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagillines
<i>Aspergillus terreus</i>	Fumagillines, Acide terréique
<i>Aspergillus niger</i>	Acide alkylitaconiques (acide tensyuiques)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Tétrahydroxanthones, versixanthones

Les agents antibactériens agissent de différentes façons, sur la paroi et la synthèse protéique.

Les antibiotique agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises, telles que : la synthèse de la paroi, la réplication et la transcription de l'ADN ainsi que la synthèse protéique. Pour exercer leur action, ils doivent se lier à des cibles spécifiques le plus souvent intra cellulaires (Lewis et al., 2013) (Figure 07) .

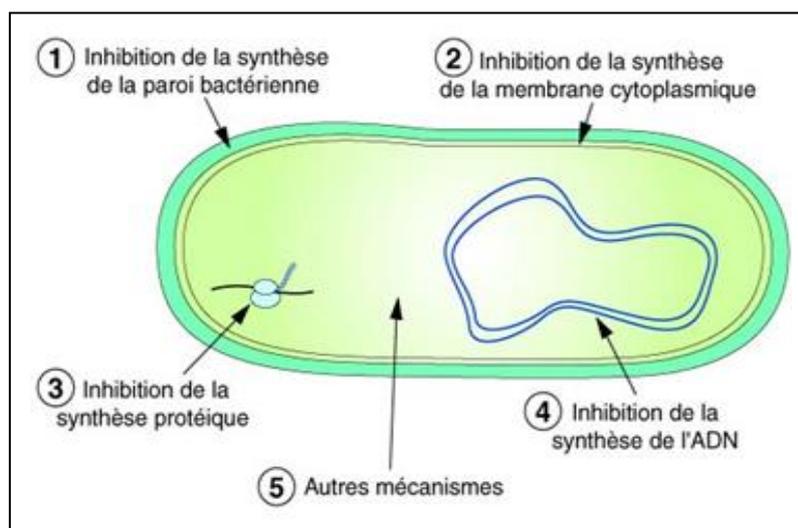


Figure 07 : Mécanismes d'action des antibactériens (Aukenthaler et Bergogne, 1995).

I.4.2. Les propriétés antivirales

Il existe un besoin mondial de nouveaux composés antiviraux pour résoudre les problèmes de résistance aux médicaments. Les champignons endophytes sont considérés comme une importante source de nouveaux métabolites antiviraux naturels destinés à être utilisés en médecine et dans l'agriculture.

Deux composés antiviraux l'alternariol et alternariol- (9) –méthyléther ont été isolés à partir de la culture du champignon endophyte *Pleospora tarda*, associé à la plante médicinale *Ephedra aphylla*. Ils inhibent le virus de l'herpès simplexe et le virus de la stomatite vésiculaire.

D'autres endophytes tels qu'*Aspergillus sp* isolé à partir de *Galium sinaicum* sont également connus pour produire des substances antivirales actives qui arrêtent la reproduction du virus d'immunodéficience simienne (Selim et al., 2018).

I.4.3. Les propriétés antioxydantes

Les composés antioxydants sont des substances qui peuvent protéger l'organisme de dommages causés par des molécules instables (radicaux libres) (Kaul et al., 2012). Les antioxydants naturels sont généralement trouvés dans les plants et les champignons endophytes (Pimentel et al., 2011). Les composés à activité anti oxydantes sont fortement actifs contre des dommages provoqués par l'espèce réactive de l'oxygène (ROS) ; l'oxygène dérivé des radicaux libres, qui sont à l'origine de différents effets pathologiques, tel que des dommages au niveau de l'ADN, la carcinogenèse et la dégénérescence cellulaire. Ainsi, ont été considérés comme des thérapies prometteuses pour la prévention et le traitement des maladies liées aux ROSs comme le cancer, les maladies cardiovasculaires, maladies inflammatoires, l'hypertension, (Pimentel et al., 2011). Elles sont également utilisées comme additifs en industrie agroalimentaire, pharmaceutique et cosmétique (Talbi et al., 2015).

Strobel et al., (2002) ont identifié deux composés qui sont la pestacine (1, 3dihydro isobenzofurane) et l'isopestacine ont été obtenus à partir de la culture de *Pestalotiopsis microspora*, un endophyte isolé à partir de *Terminalia morobensis* .qui jouent un rôle antioxydant (Kharwar et al., 2014). Des mycoendophytes, exhibent une grande activité antioxydante, due à leurs richesses en composés phénoliques et flavonoïdes (Kaul et al., 2012).

I.4.4. Les Propriétés anticancéreux

Le cancer est une maladie caractérisée par une prolifération anormale et anarchique des cellules, Qui mènent à la formation de tissus non contrôlés. Il est la principale cause de mortalité dans le monde (**Pimentel et al., 2011**). Plus de 100 composés anticancéreux ont considérées comme des métabolites secondaires (**Kharwar et al., 2014**). Parmi les métabolites secondaires, certaines molécules se révèlent capables d'inhiber la multiplication des cellules cancéreuses. Ces composés bioactifs semblent être une nouvelle alternative pour la découverte de nouveaux médicaments anti-cancer telle que le taxol (paclitaxel) qui est un composé anticancéreux puissant, qui interfère dans la multiplication des cellules cancéreuses, il est produit par un certain nombre de genres de champignons endophytes différents (**Selim et al., 2012**) ;

Cladosporium cladosporioides, *Paraconiothyrium* (**Lu et al., 2018**) *Pestalotiopsis microspora* et *Periconia sp.* (**Chandra, 2012**).

L'actinomycine D, les anthracyclines, la bléomycine ou encore la mitomycine, ces composés agissent en se fixant sur l'ADN. L'actinomycine D, par exemple, se fixe au niveau du complexe d'initiation de la transcription et empêche l'élongation par l'ARN polymérase (**Kaul et al., 2012**).

La vincristine et la vinblastine sont deux alcaloïdes naturels utilisés comme médicaments principaux dans la leucémie (**Chandra, 2012**).

I.4.5. Les propriétés antifongiques

Les groupes moléculaires avec les plus puissantes actions antibactériennes sont également des antifongiques efficaces mais ils doivent être utilisés sur de plus longues périodes. Le mot antifongique réfère un composé capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'un champignon. De nombreux antifongiques sont utilisés en médecine. La nystatine produite par *Streptomyces noursei* est par exemple utilisée pour le traitement de différentes infections par des levures notamment des *Candida*, De plus l'extrait brut d'*Aspergillus flavus*, a montré une grande activité fongicide contre *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium oxysporum* (**Jaynthy et Diviya, 2016**). Un nouveau composé (2- phényle 1H- indol -3- yl- acétate) présentait une bonne activité contre *Cladosporium cladosporioides* (**Deshmukh et al., 2018**).

Le traitement des mycoses est souvent beaucoup plus difficile que celui des infections bactériennes. Cependant, les antifongiques peuvent agir sur les différentes structures de la cellule fongique (**Vigui, 2001 ; Garnie, 2003**) (**Figure 08**).

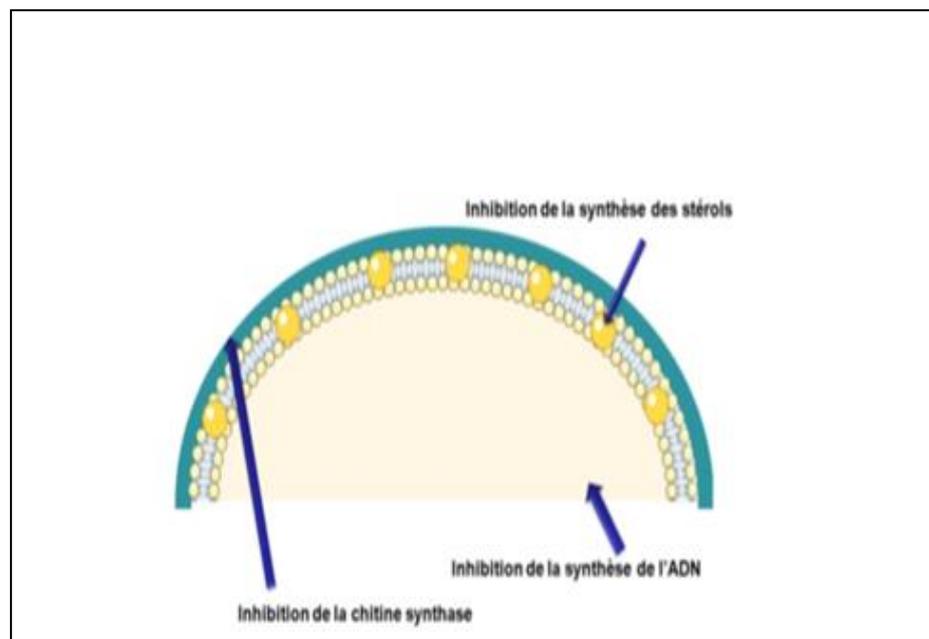


Figure 08 : Mécanisme d'action des antifongiques (Develoux et al., 2011).

➤ Les mycotoxines

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant «poison». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations d'induire un effet toxique (Reboux et al., 2006)

Les mycotoxines sont des produits peu volatiles, élaborés par divers champignons sous certaines conditions environnementales. Chaque mycotoxine n'est pas nécessairement spécifique à un champignon donné. (Bhat et al., 2010).

L'origine chimique des mycotoxines est très diverse. Il y aurait, selon les auteurs jusqu'à 400 mycotoxines répertoriés, d'après leurs structures chimiques, sont considérées comme stables et en particulier thermostables (Frémy et al., 2005 ; Bullerman et al., 2007).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs sont relativement stables et leurs toxicités peuvent persister longtemps. La gliotoxine, par exemple, peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. (Halewyn et al., 2001).

Aspergillus est un genre connu pour produire des mycotoxines, parmi les espèces qui les secrètent *Aspergillus terreus* *Aspergillus niger* *Aspergillus fumigatus* *Aspergillus Flavus* et *Aspergillus ochraceus* (Samson et al., 2014) (Tableau II)

Tableau II : Les espèces d'*Aspergillus* producteurs des mycotoxines (Guangquan et al., 2011 ; Mikusova et al., 2014 ; Mishara et al., 2017).

Espèces d' <i>Aspergillus</i>	Mycotoxines
<i>Aspergillus niger</i>	Malformin, naftoquinone, ochratoxine, pyranonigrine, alpha-amylase, beta-glucanase
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagiline, fumitoxin fumitremorgine A et C, Xylanase – cellulase, spinulosine.
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxines B1 et B2, acide aspergillique, acide Kojique.
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Acide Kojique, Ochratoxine, acide sécalonique
<i>Aspergillus versicolor</i>	Stérigmatocystine.
<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	Kétoconazole.
<i>Aspergillus terreus</i>	Citréoviridine ,citrinine, gliotoxine, fumagilline, patuline, terréine, acide terréique , terréonine , territrem , acide trypacidine, acide fumitrémorgine , acide gluconique , itaconique , lovastatine

1.5. Aspergillus terreus

Aspergillus terreus est un champignon qui peut être endophyte, cosmopolite, plus fréquent en zones chaudes capable de produire des mycotoxines, croître sur les milieux de culture (Sabouraud et malt) sur un pH optimale (5 à 6) et des températures (11-13°C, 35-40 °C, 45-48°C). Après une durée de 48 heures d'incubation sur le recto apparaissent des colonies plates duveteuses à poudreuses, de teinte beige à brun noisette ou cannelle et sur le verso : jaune à brun orange (Lass et Cornelia, 2012 ; Arabatzis et al., 2013). Sous microscope, il est caractérisé par un thalle hyalin ou coloré formé de filaments mycéliens, septé et ramifié. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des conidiophores non cloisonnés, lisses, incolores de 100 à 250 µm de long qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les phialides portant des métules insérées sur la partie supérieure de la vésicule (Tabuc, 2007).

L'espèce *Aspergillus terreus* est utilisée dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production de substances d'enzymes et de substances antifongiques (Shimada et al., 2013).

1.5.1. La provenance des molécules bioactives :

Aspergillus terreus est considéré comme un important réservoir de nouvelles molécules bioactives, il produit un grand nombre de métabolites secondaires par rapport aux autres, donc il présente un intérêt très important dans différents domaines (écologique et médical) (Frisvad et al., 2016).

De plus, *Aspergillus terreus* est utilisé dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la fermentation de divers substrats et la production d'enzymes comme xylanase ou d'acides organiques importants tels que l'acide itaconique et l'acide cis-aconitique (Sathiya et al., 2013). Il a l'aptitude de créer des molécules avec des propriétés antibactériennes telles que l'acide terréique, gliotoxine, citrinine pour inhiber la croissance des bactéries « *Trichophyton mentagrophytes* et *Sporothrix schenckii* » (Ganesh et al., 2010 ; Guangquan et al., 2011)

Aspergillus terreus est un producteur exceptionnel de nombreux agents bioactifs anticancéreux, citreoviridine et l'asperfuranone montrent une meilleure activité cytotoxique contre la lignée cellulaire cancéreuse. Les polycéides prennent une grande partie des produits naturels qui possèdent une activité biologique importante. (YING et al., 2016). L'artémisinine et ses dérivés sont maintenant largement utilisés comme antipaludique, ils ont montré

également une bonne activité anti-tumorales, la transformation microbienne de l'artémisinine se fait par *Aspergillus terreus* (Hongchang et al., 2017).

Aspergillus terreus a dominé la production biologique des médicaments "blockbuster" appelés statines. Les statines sont une classe de médicaments qui inhibent la HMG-Coa réductase et entraînent une baisse de la production de cholestérol. L'isolement des statines naturelles, de la compactine, de la mévastatine et de la lovastatine d'*A. terreus* représente l'une des grandes applications de la microbiologie industrielle (Subhan et al., 2016).

A. terreus, a été sélectionnée pour la biosynthèse des AgNP, se sont des composés sphériques utilisées en raison de leur large spectre d'activités antimicrobiennes contre les bactéries, les champignons et les virus et anti-inflammatoire. Cependant, des recherches ont été faites pour évaluer leurs effets sur *Cronobacter sakazakii*, un pathogène opportuniste qui infecte les nourrissons avec des conséquences graves, les résultats de l'étude indiquant que ces particules pourraient être un nouvel agent antibactérien (Wang et al., 2018).

Cependant, au cours de nombreuses recherches sur des métabolites secondaires d'*Aspergillus terreus*, des chercheurs ont découvert des nouveaux composés à effet antibactérien qui bloquent la résistance des bactéries à l'antibiotique, parmi ces bactéries sont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*. Ces molécules antimicrobiennes occupent une place importante dans la nature.

Guanacastepenes dont Guanacastepene A, représentent une très grande diversité de diterpénoïdes, ils sont produits par un champignon endophyte non identifié isolé de *Daphnopsis americana*, ainsi une nouvelle cytochalasine, phomopsichalasin a été isolée de l'endophyte *Phomopsis sp* et *Asperterroid*, *pycnophorin*, acide collétotrique ont démontré une activité prononcée contre les souches de *Staphylococcus aureus* (Brady et al., 2001 ; Strobel et al., 2004 ; Ganesh et al., 2010).

Il ya aussi la Flavipucine cytoskyrine A, produite par *Cytospora sp*. Isolé à partir des branches de *Conocarpus erectus* possède une bonne activité antibactérienne contre *Escherichia coli* (Deshmukh et al., 2015).

Le promysaline, les argyrines sont des métabolites secondaires avec une action antibiotique contre *Pseudomonas aeruginosa* (Biyu et al., 2018 ; Davide et al., 2019).

La N-(3-oxodo-decanoyl)-Lhomoserine lactone, impliquée dans le quorum-sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*, a été montrée comme possédant également des propriétés antimicrobiennes contre certaines bactéries Gram-négatives. (Kaufmann et al., 2005).

I.5.2. La classification d'*Aspergillus terreus*

La classification est récapitulée dans le tableau suivant :

Tableau III : La classification d'*Aspergillus terreus* Selon Hibbett et al.. (2007).

Règne	<i>Fungi</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Aspergillaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus terreus</i>

I.6. Généralité sur les bactéries et les champignons pathogènes

I.6.1. Les bactéries pathogènes

Une bactérie pathogène est une bactérie qui cause une maladie infectieuse chez l'homme, les animaux ou les plantes. Bien que la grande majorité des bactéries soient inoffensives ou bénéfiques, certaines sont pathogènes. Dans le monde microbien existe deux catégories des bactéries à Gram positif et à Gram négatif tel que, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa*, (Nichiline et al., 2000).

I.6.1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Caractère généraux

P.aeruginosa est un agent pathogène opportuniste essentiellement responsable d'infections nosocomiale. Il s'agit d'un bacille à Gram négatif, aérobic strict en forme de bâtonnet ou arrondie, dépourvue de spores et de capsules, mobile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire (Weihui et Shouguang, 2015). *P.aeruginosa* est caractérisé par leur ubiquité (eau douce, milieu humide, denrées alimentaires) (Bouskraoui et al., 2017). C'est une bactérie mésophile capable de se développer sur des milieux synthétiques simples avec des

températures allant de +4°C à +45°C et la température optimale de croissance varie de 30 à 37°C (Clave, 2011). Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent deux types principaux de pigments : de pyocyanine (bleue phénazine) et de pyoverdine (jaune vert) (Chanfir, 2016). Selon Denis (2007) trois types de colonies peuvent être observés simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

-Colonies larges ‘‘la’’ sont grande et à bord irrégulier rugueuses une partie centrale bombée (colonie en œuf sur le plat) présentant des reflets métalliques.

- Colonies plus petites lisses ‘‘S’’ bombées à bord régulier rondes petites, lisses

- Colonies muqueuses ‘‘M’’ bombées coalescentes, filantes rencontrées chez les souches produisant un slim composé d’un polymère d’alginate.

D’après DELARRAS, (2007) la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède :

Une oxydase, Une nitrate- réductase, un métabolisme oxydatif des sucres appréciables sur milieu MEVAG (Milieu pour l’étude de la voie d’attaque des glucides) et Une arginine – dihydrolase.

Classification

Il s’agit d’une bactérie que l’on répertorié conventionnellement comme mentionné dans le tableau IV.

Tableau IV : La classification de *P. aeruginosa* selon le Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology (2005).

Règne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Résistance aux antibiotiques

Résistance naturelle

Pseudomonas aeruginosa est naturellement résistant 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**).

Résistance acquise

La résistance acquise fait appel à plusieurs mécanismes ;

Hyper-expression de la bêta-lactams 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**).

1.6.1.2. *Escherichia coli*

Caractère généraux

E. coli ou colibacille est une bactérie a sporulée de forme bâtonnet, mesurant 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, immobile ou mobile avec une structure flagellaire pérित्रиче. Sa température optimale de croissance est de 37°C . Elle est non exigeante, capable de croître dans des conditions aérobies ou anaérobies sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (Trypticase-Caséine-Soja) (**Abraham, 2018**). Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positif. Sur Gélose au sang .elles peuvent être hémolytiques.

E. coli appartient à la microflore commensale de l'homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (le tractus digestif constitue son habitat primaire et l'environnement constitue son habitat secondaire (**Darcان et al., 2009**).

Chaque espèce d'*E. coli* présente des caractéristiques biochimiques spécifiques qui permettent de les différencier. Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à Gram négatif, aérobie-anaérobie facultatif, possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile (**King et al., 2008**).

Classification

La classification est récapitulée dans le tableau V

Tableau V : La classification d'*Escherichia coli* selon le Bergey Manuel of Systematic Bacteriology (2012).

Règne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobactéria</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Ordre	<i>Enterobacteriales</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

Résistance à l'ATB

E. coli était sensible à beaucoup d'antibiotiques comme exemple : céfazoline, céftriaxone, cefixitine 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 à la gentamycine, érythromycine, lyncomycine, alors que les fréquences de résistance sont faibles pour les sulfamides (45%), chloramphénicol (20%) (**Hart, 2000**).

1.6.1.3. *Staphylococcus aureus*

Caractères généraux

Les staphylocoques ont été observés pour la première fois au microscope en 1878 par Louis Pasteur et ses collaborateurs sous forme « d'amas de grains » dans des pus de furoncles et d'ostéomyélites. *Staphylococcus aureus* se présente sous forme de cocci en petits amas, en diplocoques ou en très courtes chaînettes, mesurant 0,8 à 1 µm, ce germe est Gram positif,

immobile, non sporulé et ne possédant pas de capsule , très résistante dans le milieu extérieur et caractérisé par l'ubiquité (**Jaishri et al.,2016; Danuta et Ewelina, 2019**).

S.aureus est un pathogène opportuniste de l'homme et de divers mammifères et oiseaux présent en faible quantité dans le tube digestif et parfois au niveau de la fosse nasale d'individus sains.

Il se cultive facilement sur milieux ordinaires en aérobiose, il a donc une bonne croissance sur milieux usuels à 37° C à pH = 7,2 il est thermosensible (**Ghernout, 2013**).

S. aureus est un germe aéro-anaérobie facultatif capable de produire la catalase, phosphatase mais pas l'oxydase, il est actif sur les hydrates de carbone, il métabolise plusieurs sucres tel que : l'amidon, le glucose, le fructose, le saccharose et le maltose. Ce germe à la capacité de réduire les nitrates en nitrites (**Loire et Gautiere, 2010 ; Grace et Fesch, 2018**).

Classification :

La classification est récapitulée dans le tableau suivant :

Tableau VI : La classification de *Staphylococcus aureus* selon le Bergey's Manual of Systematic Bactériology (1994).

Régne	<i>Bacteria</i>
Phylum	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

La résistance aux antibiotiques

S. aureus est une bactérie sensible naturellement envers tous les antibiotiques ainsi, présente une résistance naturelle à l'aztréonam, colistine et à l'acide nalidixique. Sa particularité est d'avoir une résistance naturelle à la ceftazidime uniquement parmi les céphalosporines. *Staphylocoques aureus* sont également résistants aux fluoroquinolones, macrolides, fosfomycine et tétracyclines grâce à la complexité de son génome et le pouvoir d'acquisition d'élément génétique mobiles sans oublié les mutations spontanées (**Grace et Fesch, 2018**).

Staphylococcus aureus résistants à la méticilline (SARM) sont principalement observés en milieu hospitalier. (Ahamogbe, 2014).

I.6.2. Les champignons pathogènes

Les champignons pathogènes sont des champignons qui provoquent des maladies chez L'homme ou d'autres organismes souvent sous-estimés comme causes des maladies et décès dans le monde entier pour le public, pour les professionnels de la santé en raison de leurs taux de mortalité souvent élevés, les infections avec les champignons envahissants sont de genres aussi divers que *Candida*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, sont responsables d'environ un million et demi de décès par ans (Brown et al., 2012).

I.6.2.1. *Candida albicans*

Caractères généraux

C. albicans est une levure microscopique unicellulaire se multipliant par bourgeonnement. Cette levure est commensale de la voie orale, vaginale et gastro intestinale et cutané. Elle est considérée comme pathogène fongique opportuniste le plus commun chez l'homme.

Il s'agit de levures de petites tailles de 2 à 5 μm , arrondies ou ovalaires non pigmentées, non capsulées (David, 2016).

En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* :

Cette levure est dimorphique qui peut exister sous : la forme unicellulaire, ovoïde appelée « blastospore » ou cellules de type levure et la forme filamenteuse ou « mycélienne vrai », pluricellulaire connue sous le nom d'hyphe se trouvent normalement dans l'organisme humain en quantité relativement limitée. La conversion d'une levure en hyphe passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif.

Une autre forme filamenteuse, nommée « pseudo- hyphe » est retrouvée. Les pseudos –hyphes ont une croissance intermédiaire entre les formes de type blastospore et hyphe

La culture sur Sabouraud additionnée au chloramphénicol avec ou sans actidione, les colonies pousse en 48 heures à 30°C ou à 37°C (Schmid et al., 2016).

Classification

La classification est récapitulée dans le tableau VII :

Tableau VII : Classification de *Candida albicans* Selon **Krick et al., (2008)**.

Régne	<i>Fungi</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Saccharomycetes</i>
Ordre	<i>Saccharomycetales</i>
Famille	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

Tests d'identification

Le test de Blastèse : Appelé aussi le teste de filamentation en sérum, il est réalisé en déposant une colonie de levure dans 1 ml de sérum humain frais. Cette suspension préparée doit être incubée à une température de 37°C pendant 3 heures. La détection des filaments (tubes germinatifs) affirme la présence de *Candida albicans* (**Daruliza et al., 2011**).

Le test de chlamydospores : Son but c'est la différenciation de *Candida albicans*. Sur la base de la formation des chlamydospores. Pour cela, une goutte de suspension de levure est ensemencée sur le milieu de Rice-Cream (gélose à l'extrait de riz) puis incubation entre 23 et 28 °C à la température ambiante pendant 18 à 48 heures (**Mtiba et al., 2017**).

Résistance de *Candida albicans* aux antifongiques

C. albicans est rarement résistant aux antifongiques et seulement 0,1% des isolats de *C. albicans* étaient résistants aux échinocandines et 0,4% au fluconazole, et l'amphotéricine B (**Pfaller et al., 2013**).

I.6.2.2. *Aspergillus brasiliensis*

Aspergillus brasiliensis a été découvert en 1729 par Pier Antonie Micheli, un prêtre, C'est un champignon produisant des conidies noires (spores) qui sont facilement dispersées dans l'environnement, d'abord connu sous le nom d'*Aspergillus niger*, il a été renommé en 2010,

les tests moléculaires indiquent que les organismes précédemment désignés comme *Aspergillus niger* appartiennent en fait à l'espèce *brasiliensis*, il est largement utilisé dans l'industrie, notamment pour la production d'enzymes. (Meijer et al., 2011).

A. brasiliensis s'est révélé thermotolérant et a montré une tolérance aux variations de température allant de la chaleur extrême au gel, ce qui indique en outre que ce champignon peut être trouvé presque partout. *A. brasiliensis* pousse mal à 15° C et sa température de croissance optimale environ 35°C (Meijer et al., 2011).

A. brasiliensis peut provoquer des infections pulmonaires. Dans de rares cas, il envahira les cavités pulmonaires existantes et créera une boule d'hyphes emmêlées appelée aspergillome (Varga et al., 2007).

Classification

La classification est récapitulée dans le tableau VIII

Tableau VIII : La classification d'*Aspergillus brasiliensis* selon Varga et al., (2011).

Régne	<i>Fungi</i>
Embranchement	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Eurotiomycetes</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Aspergillaceae</i>
Genre	<i>Aspergillus</i>
Espèce	<i>Aspergillus brasiliensis</i>

Caractère morphologique

Selon Varga et al., (2007),

- la tête aspergillaire est globulaire d'abord, puis rayonnant ensuite et se développant en plusieurs colonnes conidiales,

- conidiophore/stipe : parois épaisses, lisses, brun pâle,
- la métule couvre toute la surface de la vésicule,
- stérigmates/phialides bisérié, forme globulaire,
- conidies subglobuleux, échinulé.

Résistance à l'antifongique

Les aspergilli noirs sont très sensibles à la terbinafine et peu sensibles au kétoconazole, l'itraconazole et à l'amphotéricine B (Szigeti *et al.*, 2012).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Matériel et méthode

Le présent travail est basé sur l'effet antimicrobien de quatre souches fongiques d'*Aspergillus terreus* à l'encontre des souches pathogènes pour l'homme ; trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* et deux champignons *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*. Les manipulations ont été réalisées au niveau du laboratoire de phytopathologie de département de Biotechnologie, faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'université de Blida 1 et au niveau du laboratoire de microbiologie de SAIDAL de Dar El baida Alger.

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

II.1.1.1. Souches d'*Aspergillus terreus* :

Les quatre souches fongiques d'*Aspergillus terreus* utilisées sont des souches endophytes pures proviennent de la collection du laboratoire de phytopathologie isolées de la partie racinaire du palmier dattier, et d'une plante endémique *Zygophyllum album* de la région d'Adrar d'Algérie. (**Tableau IX**) (**Figure09**).

Tableau IX : Origine et provenance des souches d'*Aspergillus terreus*

Les souches	Le code des souches	Compartiment végétale	Région	Provenance
<i>Aspergillus terreus</i>	AA1101	Partie racinaire de <i>Zygophyllum Album</i>	Adrar (Algérie)	Collection du laboratoire de phytopathologie Université de Blida 1
	T2257	La partie racinaire du		
	B 1283	palmier dattier		
	T1172			

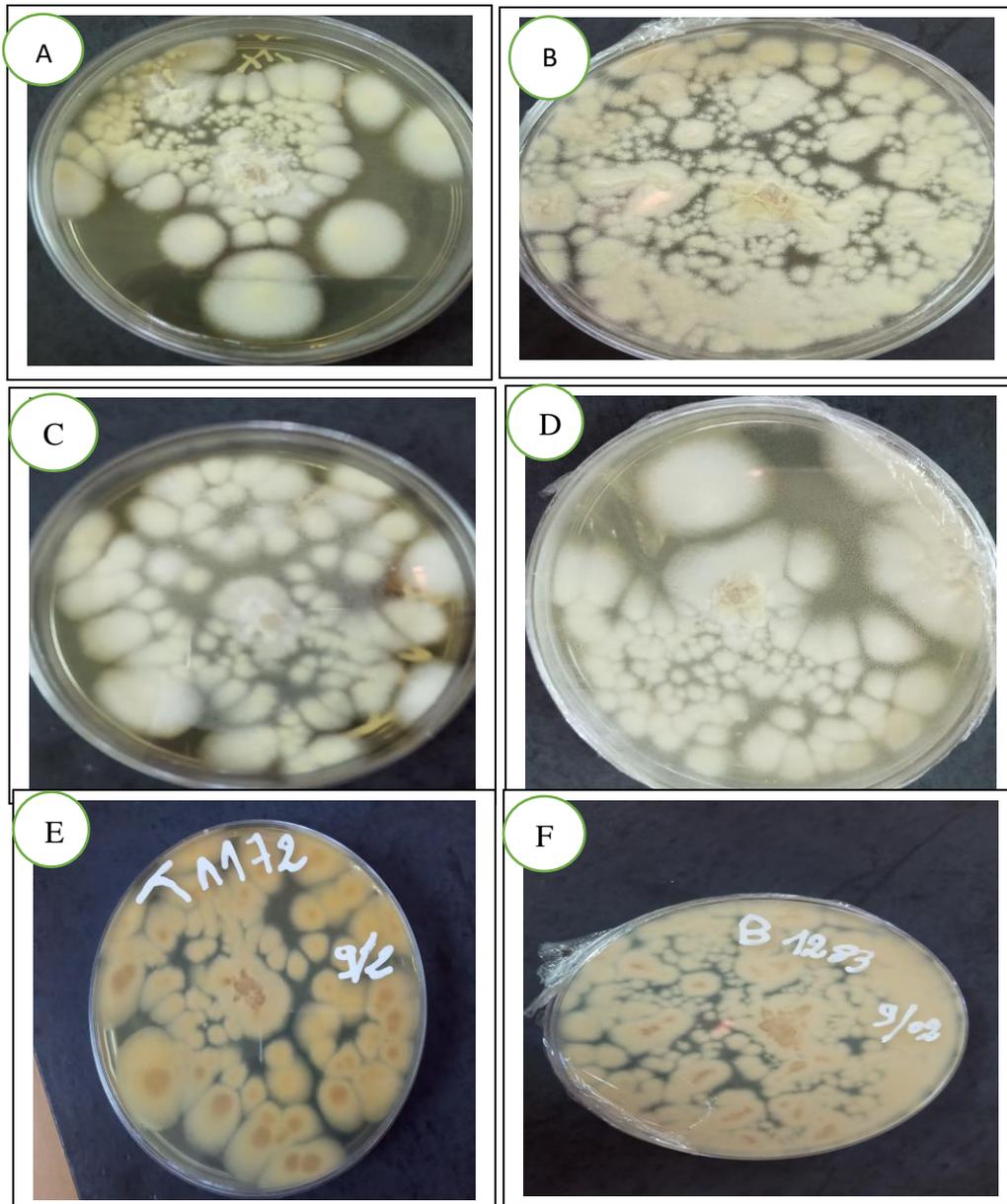


Figure 09 : Les souches d'*Aspergillus terreus* étudiés A (AA1101) ; B (B 1283) ; C (T2257) ; D (T1172) ; E et F montre le verso des boites : *Aspergillus terreus*.

II.1.1.2. Les souches bactériennes et fongiques testées

Les souches utilisées sont des souches de référence de l'American type culture collection (ATCC), gracieusement fournies par SAIDAL.

Deux bactéries à Gram – (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) et une bactérie à Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 23235).

Deux souches de champignon sont testées : *Candida albicans* ATCC 10231 et *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404.

II.1.2. Matériel non biologique

Non avons utilisé comme matériel non biologique, les produits chimiques, la verrerie et l'appareillage (Annexe01), ainsi que les milieux de culture (Annexe02),

II.2. Méthodes :

II.2.1. Régénération des souches d'*Aspergillus terreus*

La régénération des souches a été effectuée sur le milieu gélosée PDA (Potato Dextrose Agar) (**Johnston et booth, 1983**) (Annexe 2), à pH neutre, par le repiquage des disques mycéliens à partir d'une culture pure. L'incubation a été réalisée à 28°C pendant sept jours.

II.2.3. Fermentation et récupération du filtrat de culture d'*Aspergillus terreus*

Selon MICHEL (2001) ; La production des métabolites secondaires fongique bruts (MSFB) est effectuée par la fermentation fongique en milieu liquide. Les champignons ont été cultivés sur le milieu PDA à 28°C pendant 7 jours. Des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (Annexe2), dans lesquels sont déposés cinq disques de culture de 7 jours, avec quatre répétitions pour chaque souche. Les flacons sont fermés et recouverts avec du papier aluminium et incubés sous une agitation continue pendant 15 jours (**figure 10, 11, 12 et 13**).

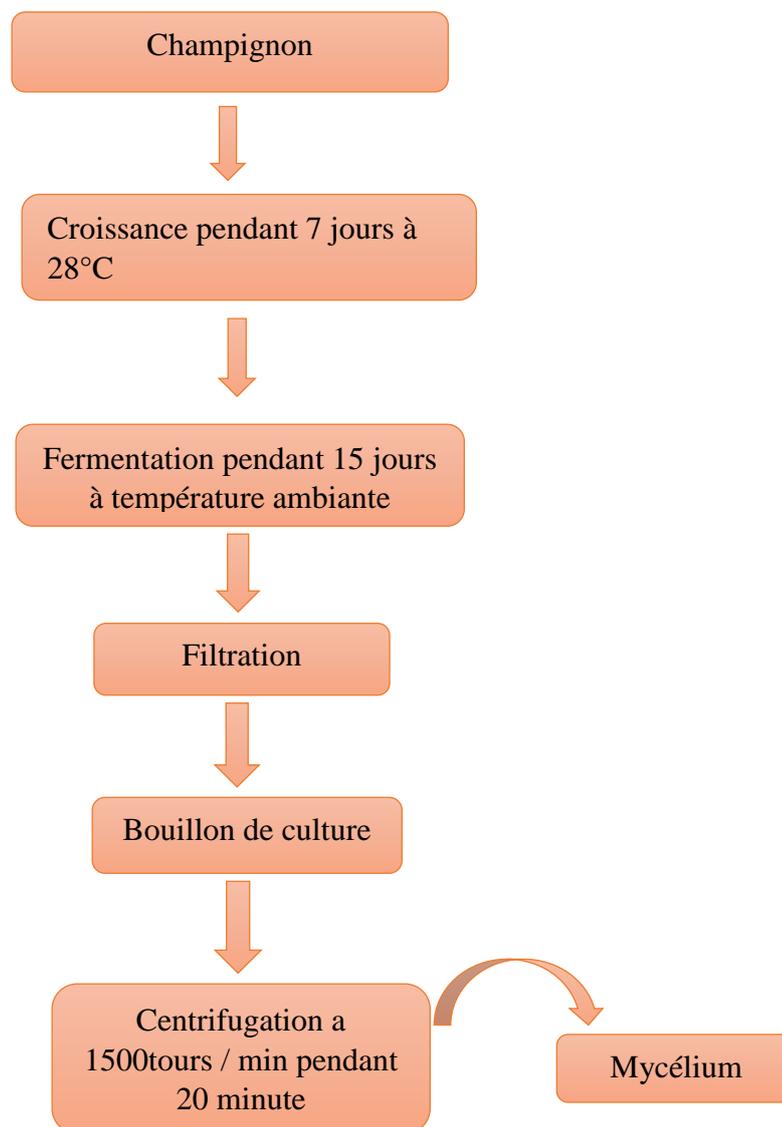


Figure 10 : Schéma récapitulatif des étapes de récupération de filtrat de culture d'*Aspergillus terreus*.

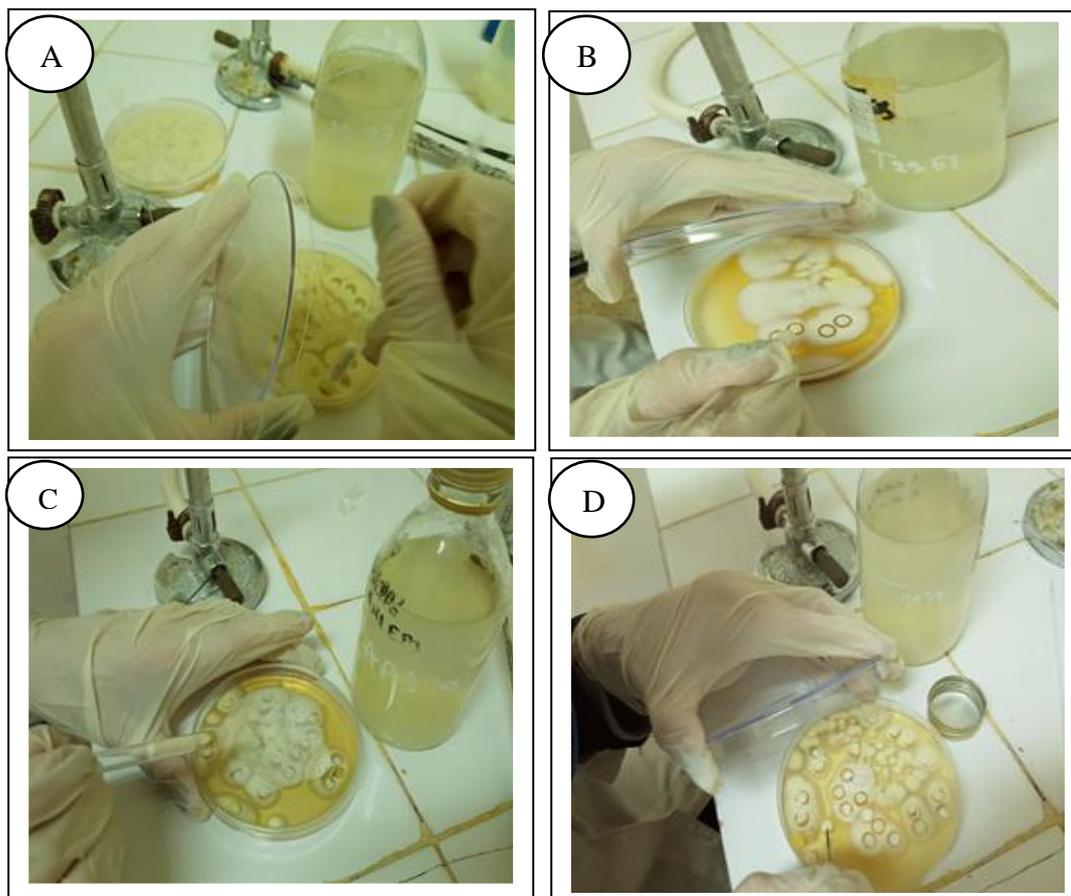


Figure 11 : Préparation des disques d'*Aspergillus terreus*. A, B, C, D : (B 1283, T2257, AA1101, T1172).



Figure 12 : Dépôts des disques mycéliens d'*Aspergillus terreus* (B1283, AA1101, T1172, T2257) dans le milieu PDB.



Figure 13 : Flacons contentent les disques mycéliens placés sous agitation continue.

Après cette période, selon **Mohanta et al., (2008)** et **Barik et al., (2010)**, le contenu de chaque flacon est filtré en deux étapes, la première à travers une mèche à gaze stérile et la deuxième par le papier filtre stérile.

Selon **Madki et al., (2010)** le filtrat ainsi obtenu est centrifugé à 1500 tours/min pendant 20 min, afin de récupérer le surnagent (**Figure 14, 15**).

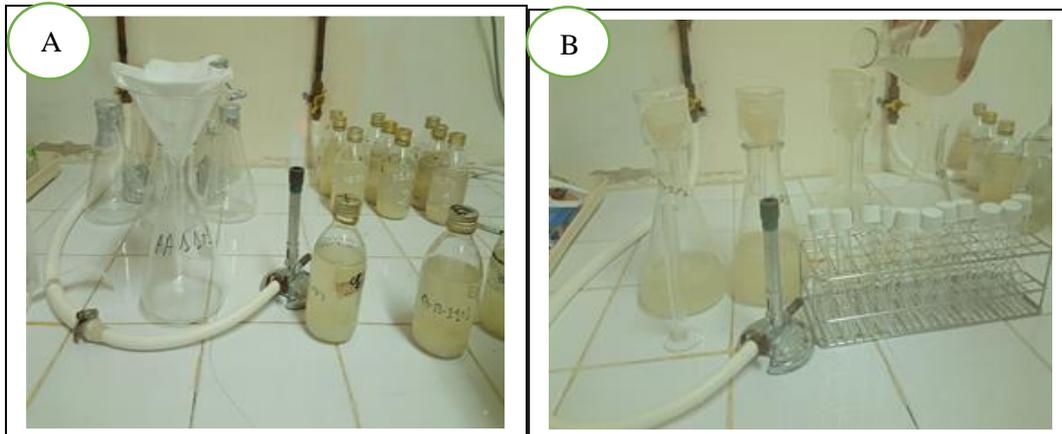


Figure14 : Filtration du bouillon de culture. **A** : par mèche à gaz stérile **B** : par papier Filtre stérile.



Figure 15 : Centrifugation du filtrat de culture à 1500 tours /min pendant 20 minutes.

II.3. Régénération des souches bactériennes et fongiques testées

La régénération des souches bactériennes et fongiques a été réalisée par repiquage de disques mycéliens sur des milieux solides Sabouraud pour les champignons et incubées à 30°C pendant cinq jours alors que les milieux TSA et Chapman sont utilisés pour les bactéries (Annexe 2) L'ensemencement de ces dernières réalisé par la méthode des stries serrées et incubées à une température de 37°C pendant 24 heures.

II.3.1. Observation morphologique des souches fongiques et bactériennes testées

Les souches fongiques d'*Aspergillus terreus*, *Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*, ainsi que les souches bactériennes *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* et *Staphylococcus aureus* ont été observé d'une manière macroscopique d'une part et sous microscope d'autre part pour confirmer leurs puretés et leurs affiliations à leur espèces.

II.3.1.1. Observation macroscopique

L'observation macroscopique d'*Aspergillus terreus* a été effectuée sur une culture préalablement ensemencées sur le milieu PDA par technique de spot et incubées pendant une semaine, à 28°C.

L'observation a été réalisée à l'aide d'une loupe binoculaire. Elle permet d'observer le mycélium, les fructifications, la taille des spores par contre concernant les cultures de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* et des souches bactérienne (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S.aureus*) ont été observé directement sur les boîtes **d'après Guiraud, (1998)**. Les principaux caractères culturaux étudiés pour les bactéries ; sont la couleur des colonies, la texture de la surface, l'odeur, le diamètre et la forme des colonies.

II.3.1.2.Etude microscopique

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et si possible une coloration de la préparation au bleu de méthylène. Généralement, l'observation d'*Aspergillus terreus* est faite au grossissement X32, alors que l'observation de *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis* est fait X 100 pour mettre en évidence la plupart des éléments importants (**Cahagnier et Richard, 1998**).

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

Les bactéries testées ont subi la coloration de Gram pour faciliter l'observation microscopique.

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel pour l'identification d'une bactérie isolée et pour la vérification de sa pureté (**SINGLETO, 2005**).

Cet examen permet d'observer la forme des bactéries (cocci, bacille, coccobacille) ainsi déterminer le type de la paroi bactérienne à Gram positif ou Gram négatif après cette coloration les bactéries Gram négatif sont rose et les Gram positif sont violettes (**Baldent, 1997**).

Les étapes de la coloration sont les suivantes ; (**Figure 16**)

- Préparer un frottis d'une culture bactérienne pure
- Recouvrir le frottis avec du violet de Gentiane ; laisser agir 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Verser du Lugol et le laisser agir pendant 1 minute ; rincer à l'eau distillée ;
- Décolorer à l'alcool, entre 15 et 30 seconde ; rincer à l'eau distillée ;
- Recolorer avec de la fuschine pendant 30 à 1 min ; rincer à l'eau distillée
- Sécher entre deux feuilles du papier filtre puis au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen.
- Observer au microscope à l'objectif $\times 100$ a immersion.

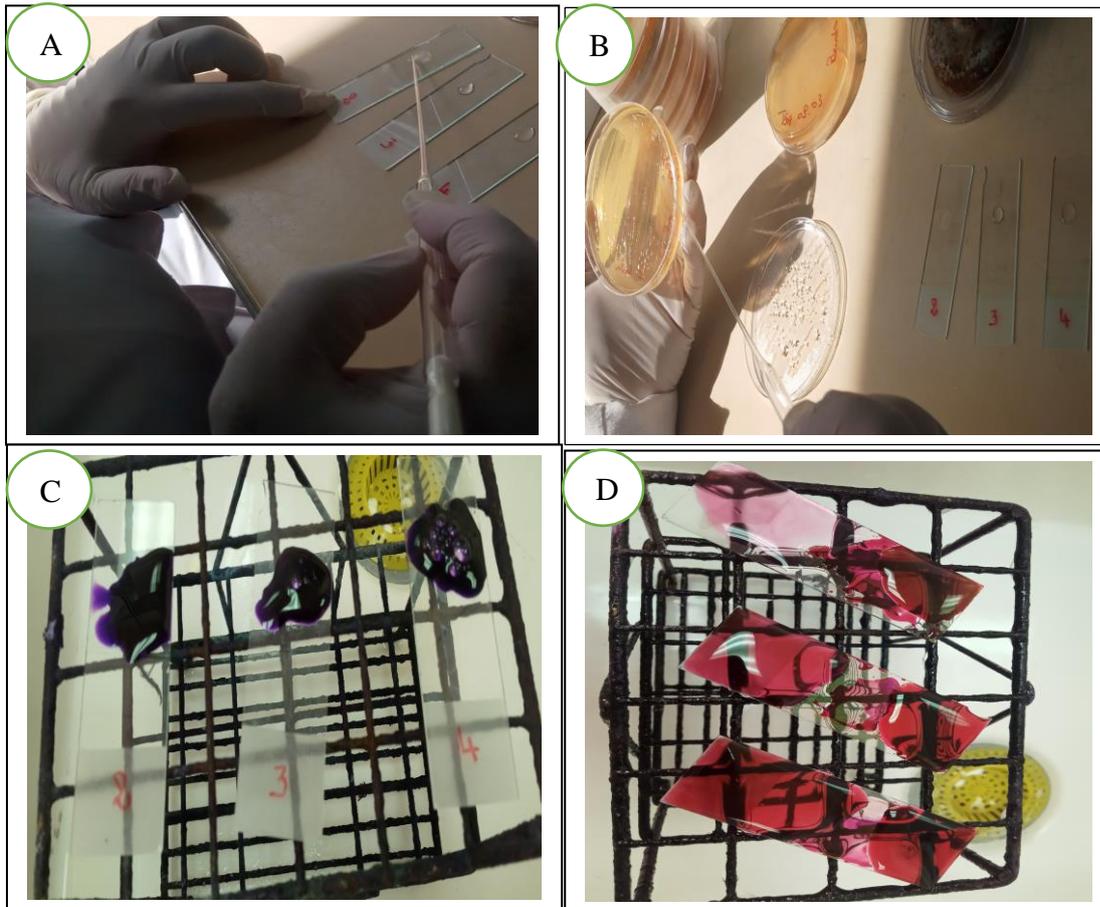


Figure 16 : La coloration de Gram.

II.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Le but de cette manipulation est la recherche du pouvoir antibactérien des extraits ou filtrats obtenus, de notre champignon *Aspergillus terreus* vis-à-vis de trois bactéries par la méthode indirecte. Il s'agit de deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853) et une bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* (ATCC 23235).

II.4.1. Technique des disques :

L'étude est réalisée par la méthode des diffusions sur gélose, elle est appelée la méthode des disques (antibiogramme).

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets sur le développement des espèces bactériennes. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne testée a servi à ensemercer uniformément toute la surface de la boîte contenant les milieux spécifiques TSA pour (*E.coli* et *P.aeruginosa*) et Chapman pour (*S.aureus*) l'épaisseur du milieu de culture est de 4 mm, après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman imbibés avec 10 µl du filtrat de culture de *Aspergillus terreus*, sont séchés et déposés sur la surface des boîtes (**Figure 17, 18**) (**Rahal et al., 2005**). 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, deux répétitions ont été faites pour chaque interaction (**Hazline et al., 2009**). Les témoins positifs dans le cas des cultures bactériennes étaient représentés par des disques imbibés avec la pénicilline ont été déposés et incubés à 37°C pendant 24 heures.

Lecture des antibiogrammes

Après incubation, la lecture se fait en mesurant avec précision les diamètres des zones d'inhibition qui sont représentées par une auréole claire formée autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse, puis de comparer aux valeurs critiques, la mesure de ces diamètres permet de classer la bactérie en l'un des 3 catégories selon les niveaux d'activités. (**Ponce et al., 2003**) :

- Souche Résistante (R) ($D < 1$ mm).
- Souches intermédiaire (I) ($1 \text{ mm} \leq D \leq 1.9$ mm).
- Souche Sensible (S) ($2 \text{ mm} \leq D \leq 5$ mm).

Le diamètre d'inhibition varie en fonction de la densité de l'inoculum et de l'épaisseur du Milieu de culture. Il est donc nécessaire de standardiser ces conditions pour pouvoir comparer les résultats. (**Hulin et al., 1998**).

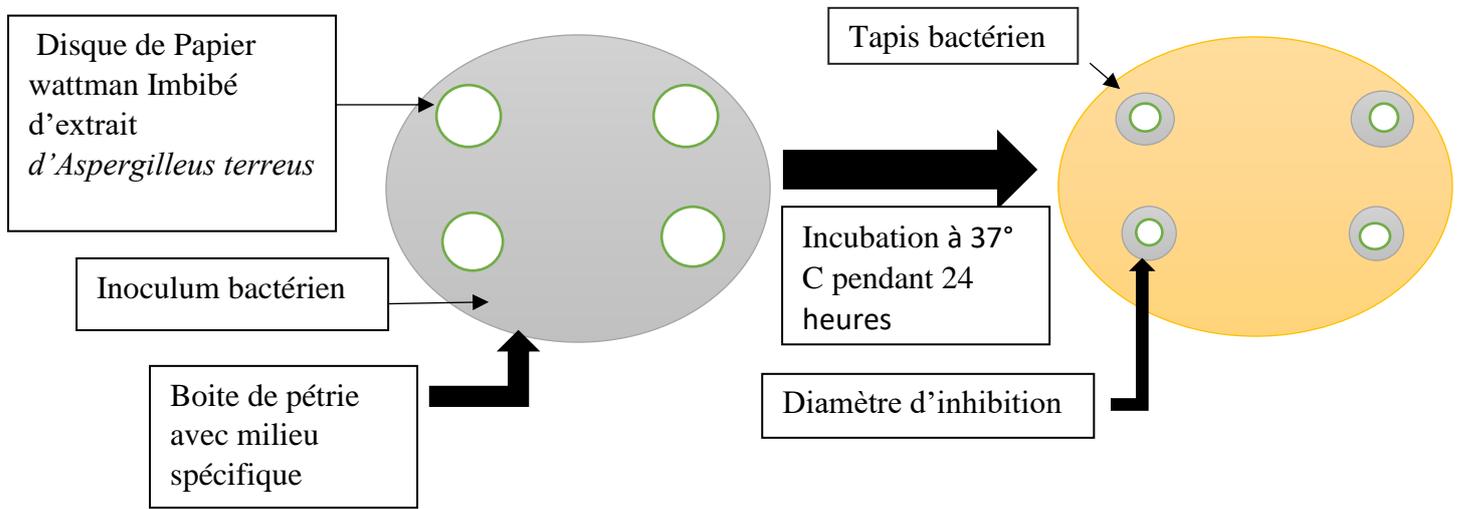


Figure 17 : Illustration de la technique de diffusion par disque.



Figure 18 : Trempage d'écouvillon dans la suspension bactérienne et emplacement des disques.

II.4.2.Mise en évidence de l'activité antifongique

L'activité antagoniste d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis de deux champignons pathogènes *Candida albicans* (ATCC 10231) et *Aspergillus brasiliensis* (ATCC16404) en utilisant la méthode des disques de gélose décrite par **Patel et Brown (1969)**. Cette technique consiste à ensemercer dans la même boîte de Pétrie contenant un milieu Sabouraud deux disques de 6 mm de diamètres l'un prélevé à partir des souches pathogènes et l'autre imbibé du filtrat de culture d'*Aspergillus terreus* les deux disques ont été ensemençées à 4,5 cm de distance l'un en face de l'autre.

Des témoins négatifs de champignons ont été réalisés en déposant un disque de chaque champignon pathogène (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*) centre des boîtes contenant le milieu Sabouraud.

Des témoins positifs contenant un disque de champignon pathogène et un disque contenant l'antifongique (10g /ml fluconazole)

Les boîtes sont par la suite incubées à 30°C pendant 7 jours, La lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre de croissance des pathogènes testés en direction de filtrat testé et qui sera comparée avec le témoin positifs. Les diamètres de croissance ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse puis de comparer aux valeurs critiques de **Pappas et al.,(2009)** :

- Souche Résistante (R) ($D < 5\text{mm}$).
- Souches intermédiaire (I) ($5\text{ mm} \leq D \leq 7\text{ mm}$).
- Souche Sensible (S) ($8\text{ mm} \leq D \leq 10\text{ mm}$).

Chapitre III : Résultats et discussions

III.1.Résultat et interprétation :

III.1.1.Caractérisation morphologique des souches fongiques et bactériennes étudiées

Les observations macroscopiques et microscopiques

L'observation macroscopique des cultures fongiques et bactériennes a été effectuée après 24 heures d'incubation pour les bactéries et 7 jours pour les champignons. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température d'incubation. L'observation microscopique a pour but de connaître le type du thalle, l'aspect de la tête conidienne, l'arrangement des conidies et leurs formes.

III.1.1.1.*Pseudomonas aeruginosa*

L'observation macroscopique de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu TSA montre des colonies transparentes à beige, plates, de grandes tailles de 0,5 à 0,8 µm de diamètres avec un aspect bombé et au contour irrégulier

L'examen microscopique de *P.aeruginosa* montre une morphologie bacillaire, fins droits, a Gram négatif de couleur rose. Elles apparaissent isolé ou diplobasilles (**Figure 19**).

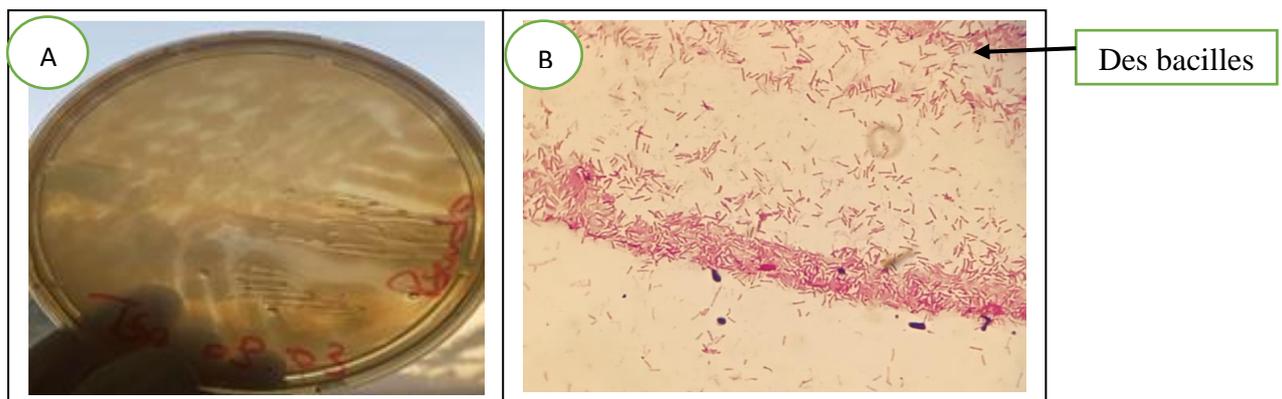


Figure 19 : (A) Observation macroscopique (B) observation microscopique (G×100) de *Pseudomonas aeruginosa*

III.1.1.2. *Staphylococcus aureus*

L'observation macroscopique des souches de *Staphylococcus aureus* sur le milieu TSA montre des colonies lisses arrondies, légèrement bombées, luisantes de couleur jaune orangé.

L'observation microscopique de *Staphylococcus aureus* montre des colonies de forme sphériques, cocci à Gram positif, elles sont regroupées en diplocoques ou en petits amas (grappe de raisin). Sont immobiles, asporulés habituellement sans capsule. Cela est lié avec les résultats obtenus par (Patrick et al ., 1988) (Figure 20).

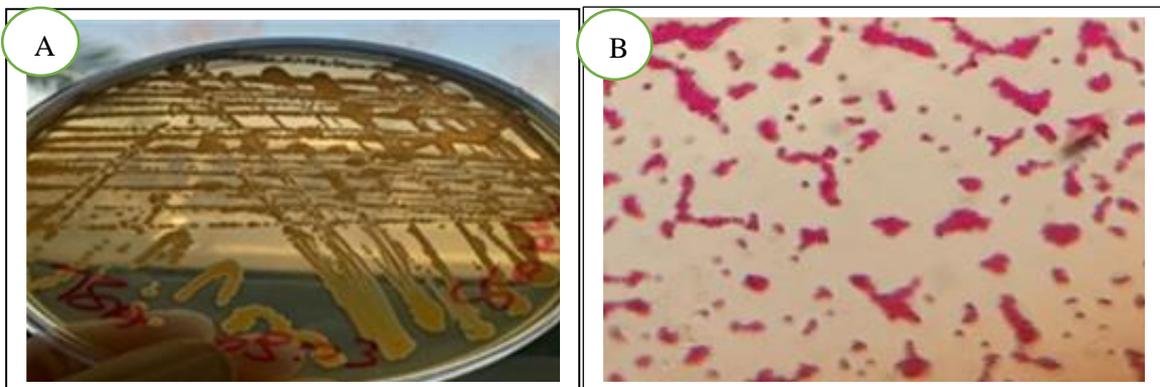


Figure 20 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique ($G \times 100$) de *Staphylococcus aureus*.

III.1.1.3. *Escherichia coli*

L'observation macroscopique d'*E. Coli* sur le milieu TSA donnant des colonies lisses, blanchâtre à crémeux.

L'observation microscopique d'*E. coli* après la coloration de Gram montre des cellules de forme coccobacille, non sporulée à une taille assez courte. De couleur rose appartiennent au groupe Gram- (**Figure 21**).

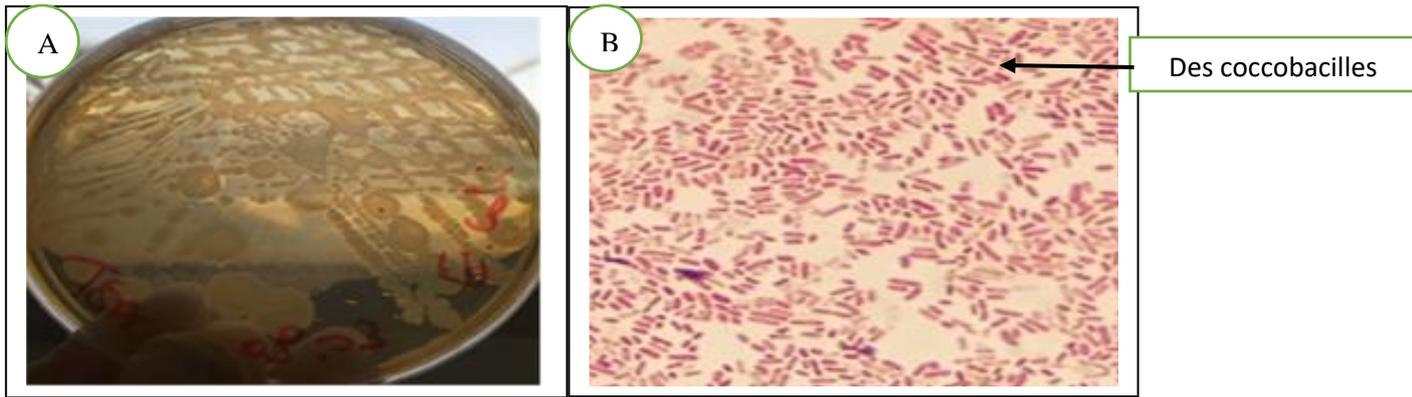


Figure 21 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique ($G \times 100$) d' *E. coli*.

III.1.1.4. *Aspergillus terreus*

L'observation macroscopique d' *A. terreus* sous la loupe, a montré que le mycélium est blanc, aspect poudreux et les spores sont nombreux de forme allongée passe de jaune vers brun cannelle. Sur le milieu PDA. Le revers des colonies est de couleur jaune.

L'observation microscopique d' *Aspergillus terreus* a révélé que le mycélium est septée, le conidiophore dressé très long et hyalines, lisse, les phialides sont portées par des métules insérée sur les vésicules ; la tête conidienne est bisériée en colonnes, les conidies sont lisses et globuleuses. (**Figure 22**).

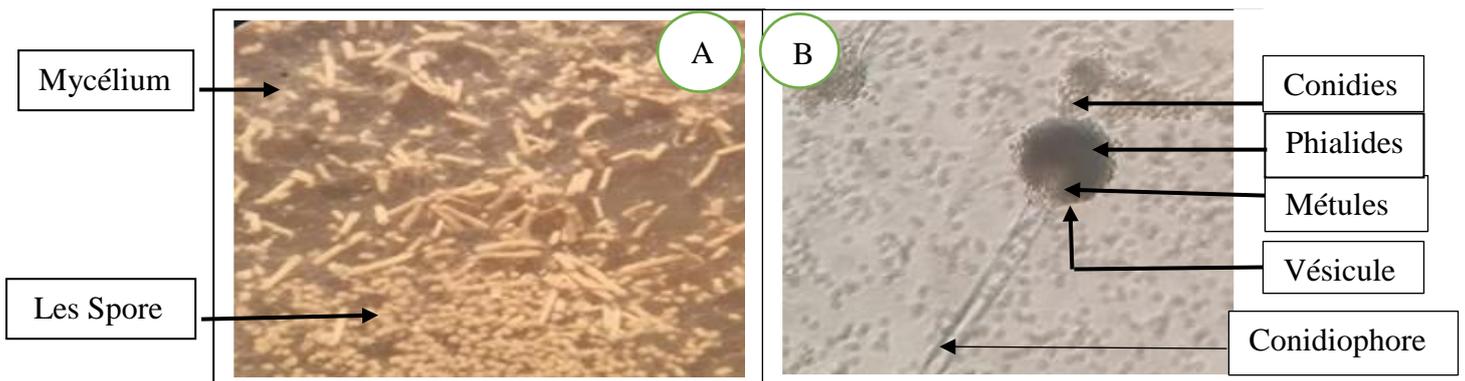


Figure 22 : Observation d' *Aspergillus terreus* (A) macroscopique sous la loupe binoculaire et (B) microscopique ($G \times 32$).

III.1.1.5. *Aspergillus brasiliensis*

Après 7 jours d'incubation, la souche *Aspergillus brasiliensis* à montrer un bon développement sur le milieu Sabouraud. La colonie se présente sous la forme ronde surélevée, duveteuses à laineuse de texture cotonneuse et de relief plan, la couleur est initialement blanches à jaunâtres puis brun foncé qui deviennent noirâtre .Le verso de la boîte incolore à jaune pâle.

Après la coloration au bleu de méthylène l'observation microscopique d'*Aspergillus brasiliensis* sur le milieu Sabouraud montre la présence des spores, l'absence des conidiophores des phialides et des vésicules (**Figure23**).

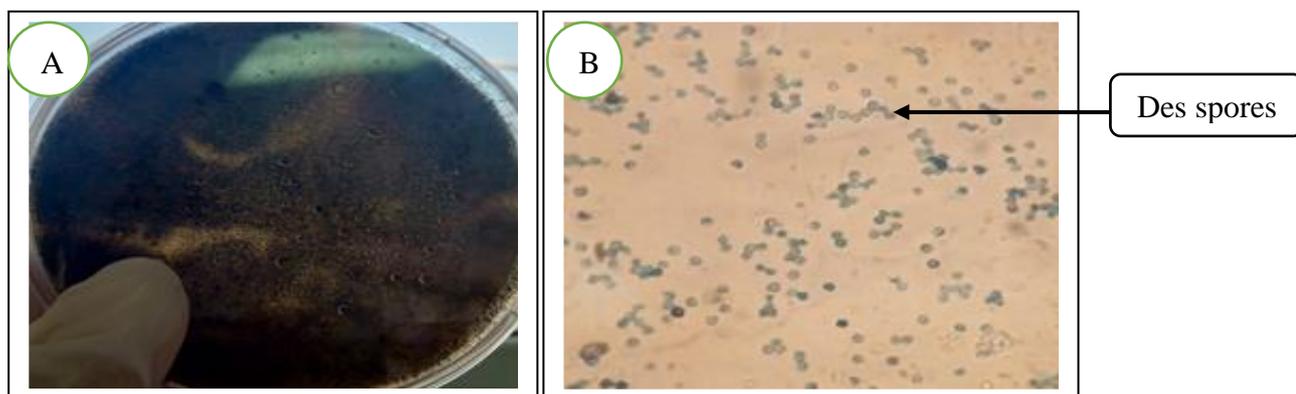


Figure 23 : (A) Observation macroscopique (B) Observation microscopique ($G \times 100$) d'*Aspergillus brasiliensis*.

III.1.1.6. *Candida albicans*

Les résultats de l'observation macroscopique de la souche *Candida albicans* sur le milieu Sabouraud montre une forme ovalaires non capsulées, a bourgeonnement multilatérale et non filaments, de forme de blastospores.

L'observation microscopique de *Candida albicans* apparaît après la réalisation d'un frottis coloré au bleu de méthylène sous forme d'une levure non capsulée ronde à ovale.

(**Figure 24**)

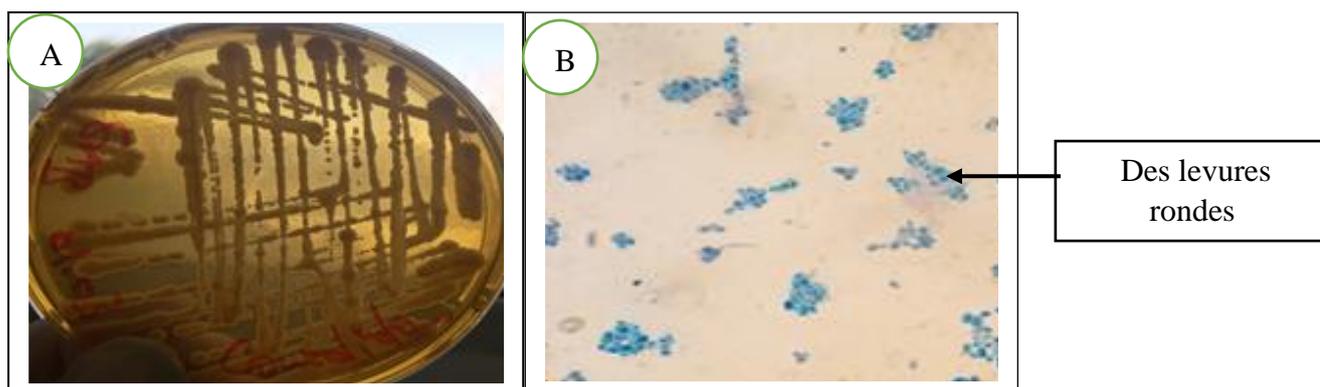


Figure 24 : (A) L'observation macroscopique (B) : Observation microscopique (G×100) de *Candida albicans*

III.1.2. Activité antibactérienne

Les filtrats de culture des quatre souches d'*Aspergillus terreus* préalablement préparés ont été utilisés pour tester leurs effets antibactériens contre quelques souches bactériennes par la technique de disque

L'activité antibactérienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant les filtrats de culture d'*Aspergillus terreus* à tester vis-à-vis des trois bactéries étudiées, après 24 heures d'incubation à une température de 37°C.

Les résultats de cette confrontation indirecte des filtrats de culture d'*Aspergillus terreus* ont montré la sensibilité des bactéries testées aux substances qui peut être des antibiotiques synthétisé par ce champignon.

Une variabilité d'action a été observé entre les filtrats de culture des différentes souches d'*Aspergillus terreus* et les bactéries étudiées.

La zone d'inhibition la plus élevée 3,28 mm a été constaté en présence du filtrat de culture de la souche B1283 d'*Aspergillus terreus* et la zone d'inhibition la plus faible 0,74 mm a été constatée en présence de filtrat de culture de la souche AA1101.

à l'encontre d'*E. coli*. Des valeurs intermédiaires de 1,09mm et de 0,90 mm ont été enregistré respectivement en présence des filtrats de culture des souches T1172 et T2257 vis-à-vis d'*E. coli*.

Pour la souche *P. aeruginosa*, la zone d'inhibition la plus élevée 2,74mm a été enregistré en présence de filtrat de culture de la souche B1283, suivi par 2,54 mm de filtrat de

culture de la souche T2257, alors que les valeurs les plus faibles 1,7 mm et 1,29 mm ont été remarqué en présence du filtrat de culture des souches AA1101 et T1172 respectivement.

En présence de *S.aureus*, la valeur moyennes la plus élevé 1,86 mm a été observé en présence du filtrat de culture de la souche AA1101, suivi par des zones d'inhibition de l'ordre de 1,721mm et 1,211 exercées respectivement par les souches T1172 et B1283.

Alors que le filtrat de culture de la souche T2257 a montré la valeur la plus faible 0,92mm.

Le témoin positif (disque avec la pénicilline), la valeur moyenne la plus élevé 5,79 mm a été constaté en présence de *S.aureus*, suivi par des zones d'inhibition de l'ordre de 2,16 mm et 0,51 mm avec *P. aeruginosa* et *E. coli* respectivement.

En comparaison avec les valeurs critiques de Ponce et al ., (2003), *E coli* est considérée comme sensible en présence du filtrat de culture de la souche B1283, résistants vis-à-vis des souches T2257 et AA1101 et intermédiaire à l'encontre de la souche T1172 d'*Aspergillus terreus* .

P. aeruginosa est considéré comme sensible en présence des filtrats de culture des souches T2257 et B1283 et intermédiaire à l'encontre des souches AA1101 et T1172 d'*Aspergillus terreus*.

S.aureus est considéré comme résistant en présence du filtrat de culture de la souche T2257 et intermédiaire à l'encontre des souches AA1101, B1283 et T1172 (**Tableau X et Figures 25 et 26**).

Tableau X : La moyenne des zones d'inhibition (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d'*Aspergillus terreus*.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	Les valeurs critique de (Ponce et al ., 2003).
AA1101	0,748 (R)	1,7 (I)	1,863 (I)	(D<1mm).Souche Résistante (R). (1mm≤D≤1.9 mm).Souche intermédiaire(I). (2 mm≤ D ≤ 5 mm). Souche Sensible (S).
T2257	0,902 (R)	2,541(S)	0,927(R)	
B1283	3,282 (S)	2,743(S)	1,211(I)	
T1172	1,0935 (I)	1,298(I)	1,721(I)	
Témoin positif	0 ,516 (R)	2,16 (S)	5,795(S)	

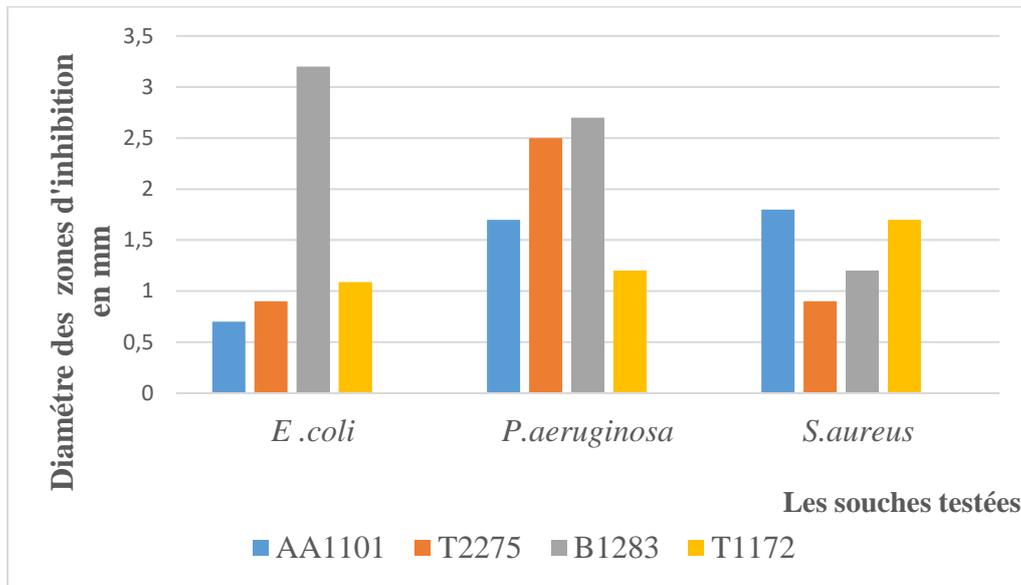
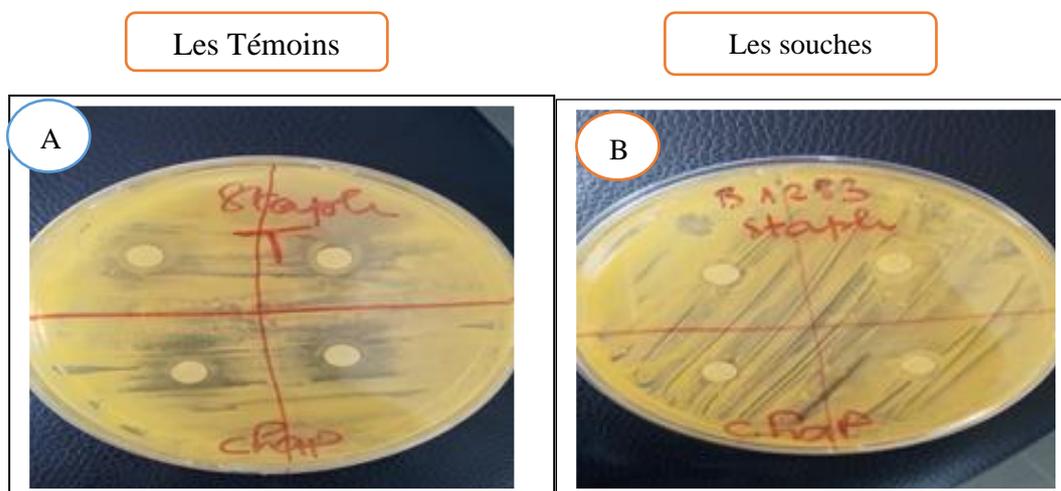


Figure 25 : Zone d'inhibition exercée par les souches d'*Aspergillus terreus* (AA1101, T2275, B1283, T 1172) à l'encontre des souches bactériennes testées.



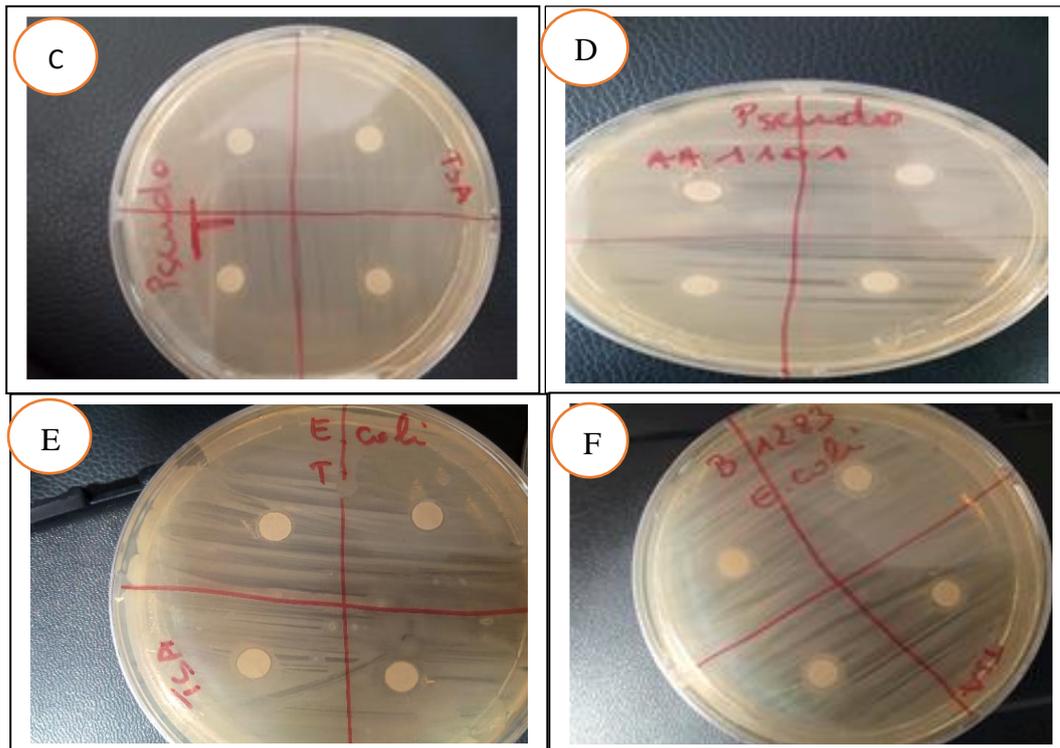


Figure 26 : Zone d'inhibition exercée par les souches d'*Aspergillus terreus* à l'encontre des souches bactériennes testées par la technique des disques : (A ; B) *Staphylococcus aureus* (C ; D) *Pseudomonas aeruginosa* (E ; F) *Escherichia Coli*.

III.1.3. Activité antifongique

Après Cinq jours d'incubation les souches d'*Aspergillus terreus* (B1283, AA1101, T2257, T1172) ont montré une faible activité inhibitrice vis-à-vis des souches pathogènes testées et ce par l'apparition d'une faible zone d'inhibition autour du disque.

Nous constatons qu'il y a une variabilité de diamètre des zones d'inhibition, cette variation dépend de filtrat de culture utilisées et aussi des souches fongiques étudiées

Nous avons remarqué que vis-à-vis *Aspergillus brasiliensis*, la zone d'inhibition la plus élevé 0,45 mm a été constaté en présence de filtrat de culture de la souche (T1172) et la valeur la plus faible qui est de 0,15 mm enregistré en présence de deux filtrats de culture des deux souches AA1101 et T2257. Une valeur intermédiaire de 0,35 mm est constatée à l'encontre du filtrat de la souche B1283. D'après ces résultats et en comparaison avec les valeurs critiques de Pappas et *al.*, (2009), la souche de l'espèce *Aspergillus brasiliensis* est considérée comme résistante à l'encontre de tout les filtrats de culture des souches d'*Aspergillus terreus* testées.

En ce qui concerne *Candida albicans*, la zone d'inhibition la plus grande 0,2 mm a été enregistrée en présence de filtrat de culture de la souche B1283 alors que le filtrat de culture de la souche AA1101 n'a aucun effet sur cette levure.

En ce qui concerne les filtrats de culture des autres souches T1172 et T2257, la zone d'inhibition été de 0,1 mm vis-à-vis de *Candida albicans*. Donc d'après ces résultats et selon les valeurs critiques de Pappas et *al.*, (2009), cette levure est considérée comme résistante à l'égard de tous les filtrats de cultures étudiés.

Les résultats de ce test ont montrés que le témoin positif (disque avec fluconazol) enregistre un diamètre de la zone d'inhibition de l'ordre de 8 mm en présence de *Candida albicans* et de 10 mm à l'encontre d'*Aspergillus brasiliensis*. Par comparaison avec les valeurs critiques de Pappas et *al.*, (2009) les deux souches testées sont sensibles à l'encontre de fluconazol (**Tableau XI et Figures 27 et 28**).

Tableau XI : La moyenne des zones d'inhibition (mm) exercées par les souches d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis des souches fongiques testées.

	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	Les valeurs critique de (Pappas et al ., 2009)
AA1101	0 (R)	0,15 (R)	(D < 5mm). Souche Résistante (R)
T2257	0,1 (R)	0,15 (R)	(5 mm ≤ D ≤ 7 mm). Souche intermédiaire (I)
B1283	0,2 (R)	0,35 (R)	(8 mm ≤ D ≤ 10 mm).Souche Sensible (S).
T1172	0,1 (R)	0,45 (R)	
Témoins positif	8 (S)	10 (S)	

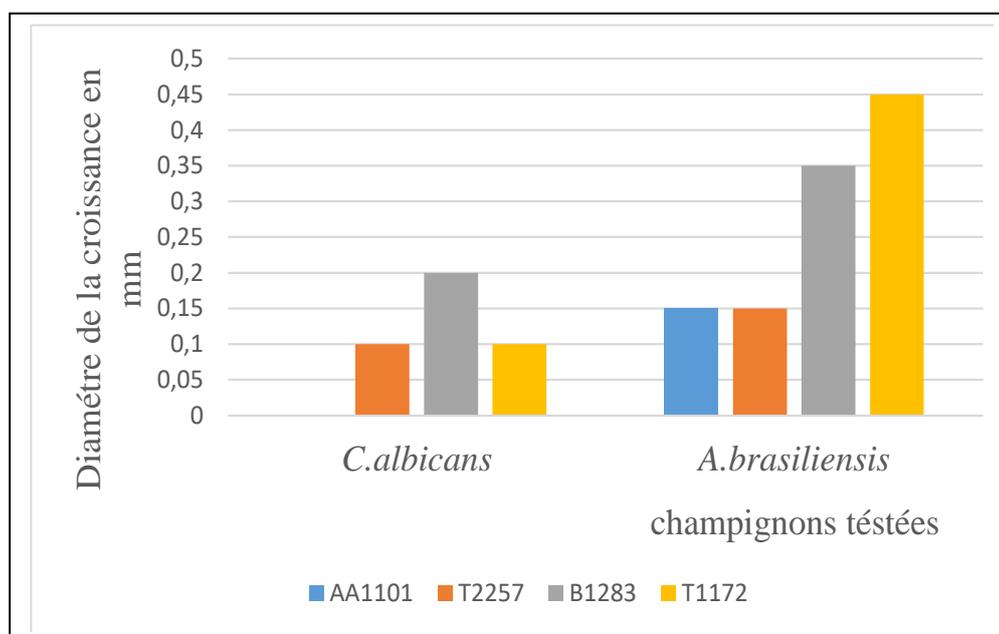


Figure 27 : Variation des zones d'inhibition exercées par les souches d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis de *C. albicans* et *A. brasiliensis*.

Les souches testées

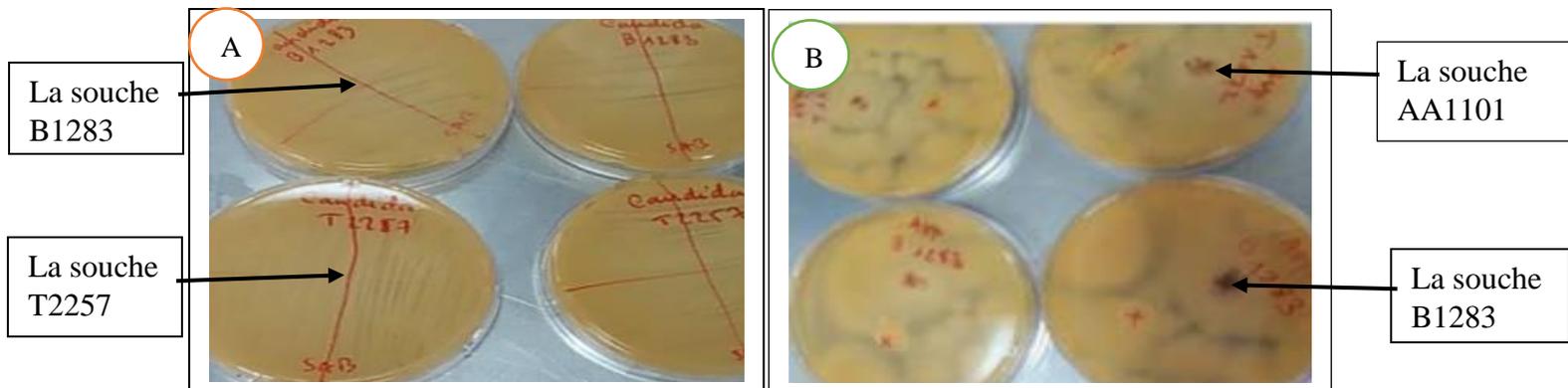


Figure 28 : Zones d'inhibitions exercées par les filtrats de cultures des souches d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis des souches fongiques. (A) : *Candida albicans* (B) : *Aspergillus brasiliensis*.

III.2.Discussion

L'effet antimicrobien des quatre souches fongiques d'*Aspergillus terreus* (AA1101, B1283, T2257, T1172) à l'encontre de trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*) ainsi contre deux souches de champignons pathogènes (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*) a été mis en évidence à travers l'utilisation du filtrat de culture de ce champignon.

Les résultats obtenus dans ce test de confrontation indirecte, ont révélé la capacité d'*Aspergillus terreus* a inhibé ou ralenti la croissance des bactéries et des champignons pathogènes testés. En effet, selon **Botton et al., (1990); Barrios et Mejia (2008)**, les champignons peuvent produire des quantités impressionnantes des métabolites secondaires et leurs produits peuvent avoir une grande importance .

Ces métabolites secondaires sont généralement produits par fermentation par un nombre limité d'organismes, principalement par les champignons, à la fin de leurs cycle de croissance, souvent pendant la phase stationnaire, et sont connues par leur effet antibactérien, (**Barrios et Mejia, 2008 ; Botton et al., 1990**). Les métabolites secondaires d'*Aspergillus terreus* constituent une source naturelle pour plusieurs substances à différentes activités thérapeutique. (**Guangyuan et al., 2011**).

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

Les substances antimicrobiennes sont définies comme étant des substances utilisées pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les agents antibactériens et antifongiques. (**Ben Abdallah et al., 2013**).

L'activité antimicrobienne d'*Aspergillus terreus* consiste à rechercher l'effet antibactérien de ces métabolites secondaires brut sur le développement des souches testées d'*E. coli*, de *Staphylococcus aureus*, de *Pseudomonas aeruginosa*. Les souches utilisées dans ce travail ont été testés pour étudier la différence dans la sensibilité entre ces espèces. Cette différence est due aux composants des métabolites secondaires bruts des *Aspergillus terreus*, Pour cela, la sensibilité des microbes aux métabolites secondaires fongiques bruts varie selon l'espèce microbienne. *E. coli* a montrés une grande sensibilité aux MSFB,

Alors que, *P.aeruginosa* a montré moins de sensibilité qu'*E.coli* et une sensibilité presque limité pour le *S.aureus*.

Nos résultats montrent que l'effet inhibiteur le plus élevé est noté pour *E. coli* donc cette inhibition est apparue autour des disques, la distance de cette inhibition a été exercé par les molécules à activité antimicrobienne produit par les souches d'*Aspergillus terreus* et ayant diffusé dans le milieu de culture (**Baker et Cook, 1974**). En effet ces résultats pourraient être causés par des antibiotiques qui provoquant l'inhibition de la croissance des pathogènes testés. Ainsi cette variabilité dans l'inhibition observée entre les souches testées s'expliquerait par la quantité d'antibiotique produit.

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 tel que les éléments minéraux, les sources de carbone, le pH, la température ainsi que d'autres paramètres (**Thomashow, 1996 ; Bender et al., 1999**).

Les espèces d'*Aspergillus*, produisent des antibiotiques potentiels mais aussi plusieurs métabolites avec une activité antibiotique, y compris les terpènes et les polypeptides et les polycétides. Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien, ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement (**Abu –Seidah, 2003**).

Ces résultats se concordent avec les résultats de **Barakat et Gohar 2012** qui ont montrés qu'*A. terreus* ayant une activité antibactérienne considérable par rapport à *E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* donc l'activité antibactérienne contre les bactéries testées à coloration de Gram négatif apparaît plus importante que celle contre les bactéries à coloration de Gram positif.

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 antimicrobien 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.

Notre champignon comme la plus part des champignons endophytes, produisent des métabolites secondaires à effet antimicrobien qui peu inhiber le développement de certaines bactéries avec des effets variables (**Kaul et al., 2012 ; Arivudainambi et al., 2014**).

Les résultats de l'effet antifongique d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis des souches fongiques (*Candida albicans*, *Aspergillus brasiliensis*) montrent une faible inhibition de la croissance mycélienne des colonies de ces souches fongiques.

D'après les résultats obtenus, on constate que malgré l'absence d'un contact direct entre les champignons testés et les souches d'*Aspergillus terreus* (B1283, AA1101, T2257, T1172) 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 filtrats à produire des substances qui sont capables de limiter et même de stopper la croissance des champignons.

D'après nos résultats le test d'activité antifongique des souches testées ont révélé que la souche la plus sensible est *Aspergillus brasiliensis*, donc l'inhibition de la croissance mycélienne pourrait être causée par des métabolites secondaires produits par les souches d'*Aspergillus terreus*.

Selon Ronghua et al., (2009), chez les champignons la chitine est un constituant essentiel de la paroi qui entoure et protège les cellules fongiques. La paroi cellulaire est donc essentielle pour la croissance fongique et pour la résistance du champignon. En outre *Aspergillus terreus* a la capacité de synthétiser la chitinase, qui est une enzyme importante de la lyse des parois pourrait également être la cause de l'inhibition de la croissance mycélienne de *Candida albicans* (**Charpentier et Percheron, 1983 ; Iverson et al., 1984 ; Tsujibo et al., 1993**).

Plusieurs études ont démontré que des champignons endophytes telle que *Aspergillus terreus*, 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 tel que dextrose considéré comme source de carbone, de la peptone comme source d'azote et de l'extrait de malt et de pomme de terre riches en amidon et en vitamine, ces composés nutritifs sont nécessaires à la production des molécules bioactives (**Anwar et Iqbal, 2017**).

Les travaux de Mohamed Mahmoud (2017) ont montré que les souches d'*Aspergillus terreus* ont la capacité d'inhiber la croissance mycélienne des pathogènes testés (*Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, *Fusarium oxysporum .sp. albedinis* et *Gaeumannomyces graminis var. tritici*). Cette inhibition de la croissance mycélienne est due principalement à la compétition entre les endophytes et les pathogènes. (**Chaudhary et Prajapati 2004 ;et Mian et al., 2010**).

Vijaykumar et ses collaborateurs, (2013) suggéraient également que certains milieux de croissance pouvaient entraîner la production d'une concentration élevée de composés bioactifs. Nos résultats sont en accord avec les résultats des chercheurs cités ci-dessus ayant démontré que le milieu de croissance était un facteur important pour la production des composés bioactifs fongiques.

Aspergillus terreus peut produire plusieurs composés biologiquement pertinents tels que la sulochrine et la butyrolactone. Il produit également d'autres composés bioactifs bénéfiques l'asperfuranone et la cyclosporine A (médicament a des propriétés anti – inflammatoire, antifongique, antiparasitaire) (**Sallam et al ., 2003 ; Samson et al., 2011 ; Guo et wang , 2014 ; Yin et al., 2016**).

Aspergillus terreus a la capacité de synthétiser les nanoparticules d'argent « AgNP's », se 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**).

Plusieurs travaux montrés que les champignons endophytes ont provoqué un effet antibactérien plus ou moins important, en fonction de la souche bactérienne.

L'intérêt grandissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne, par conséquent, une attention particulière a été accordée pour évaluer des activités antimicrobiennes .Donc on conclut que les souches d'*Aspergillus terreus* (B1283, T2257, AA1101, T1172) constituent un large réservoir de nouvelle molécules qui peuvent être exploité dans le future.

Conclusion

IX .Conclusion

Au terme de ce travail nous avons constaté que 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 métabolites secondaires d'origine naturelle représentent la source de la majorité des composés bioactifs utilisés par l'homme à intérêts thérapeutiques afin d'obtenir de nouveaux médicaments qui seraient efficaces.

Ce travail s'articule autour de deux axes. Le premier vise à la caractérisation morphologique par l'observation macroscopique et microscopique des souches testées ainsi la fermentation et la récupération du filtrat d'*Aspergillus terreus*. Le deuxième est basé sur l'effet antimicrobien de ce filtrat des quatre souches fongique d'*Aspergillus terreus* à l'encontre de trois souches de bactéries *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que deux souches de champignons (*Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*).

Nos résultats de l'observation macroscopique et microscopique des souches testées ont confirmé la pureté et l'appartenance des souches aux espèces étudiées.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne d'*Aspergillus terreus* est réalisée par la technique des disques. Les résultats de cette confrontation indirecte montrent que le filtrat de la souche *Aspergillus terreus* (B1283) a donné une meilleure zone d'inhibition de 3,28 mm de diamètre et le filtrat (AA1101) a donné une faible zone d'inhibition de 0,74 mm de diamètre avec *E. coli*, selon les valeurs critiques données par Ponce et *al.*, (2003), ces souches sont considérées comme résistantes, intermédiaires ou sensible. *E.coli* était sensible vis-à-vis de la souche B1283, *Pseudomonas aeruginosa* était sensible à l'encontre de B1283 et T2257, alors que *Staphylococcus aureus* était sensible à l'encontre de B1283 et T2257, alors que *Staphylococcus aureus* était sensible seulement en présence de témoin positif utilisé (pénicilline). Cependant l'activité antifongique montre une moyenne d'inhibition la plus élevée est enregistré par la souche d'*Aspergillus terreus* (T1172) vis-à-vis d'*Aspergillus brasiliensis* (0,45 mm) et le filtrat (AA1101) n'a eu aucun effet sur *Candida albicans* alors les souches d'*Aspergillus brasiliensis* et *Candida albicans* sont considérées comme résistantes à l'égard de tous les filtrats de cultures étudiés.

CONCLUSION.

D'après la littérature le champignon *Aspergillus terreus*, résisteraient à l'invasion et inhiberaient un grand nombre de microorganismes nocifs pour l'homme, et les plantes et ce par la production de métabolites secondaires tel que les antibiotiques et les antifongiques.

En conclus que l'activité antibactérienne contre les bactéries testées à coloration de Gram négatif apparait plus importante que celle contre les bactéries à coloration de Gram positif,

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

- Extraction. ultra – purification et indentification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises « HPLC, CPG etc. »
- Etude de l'activité antimicrobienne par l'utilisation d'autres méthodes de confrontation (méthode des puits).
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- L'optimisation de la biosynthèse des MSFB à des fins médicales

Références bibliographiques

A

- Abraham, D. (2018)**. Identification des souches d' *Escherichia coli* dans les selles en rapport avec la malnutrition a DIORO .Thèse de doctorat en Pharmacie .BAMAKO : université des sciences, des techniques et des technologiques de Bamako. 5P.
- Abu Seidah, A. (2003)**. Secondary metabolites as comarkers in the taxonomy of Aspergilli. Acta.Microbiologica.Polonica. 52 : 15-23.
- 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.
- Arivudainambi, U.S. E., Anantha Koteswararao Kanugula., Kotamraju S., Karunakaran C and AajendranA. (2014)**. Antibacterial effect of an extract of the endophytic fungus *Alternaria alternata* and its cytotoxic activity on MCF-7 and MDA MB-231 tumour cell lines. Biological Lett, 51(1) : 7–17. DOI : 10.1515/biolet-2015-0002.
- Arabtzis, M, Velegraki, A. (2013)**. Sexul reproduction in the opportunistic human pathogen *Aspergillus terreus* Mycologia. 105 (1) : 71-9.

B

- **Barik, B. P., Tayung, K., Jagadev, P. N and Dutta, B K. (2010)**. Phylogenetic placement of an endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus Calamus* rhizomes with antimicrobial activity. European Journal of Biological Sciences ; 2: 8-16
- Badiaga, M. (2011)**. Étude ethnobotanique, phytochimique et activités biologiques de *Nauclea Latifolia* Smith une plante médicinale africaine récoltée au Mali, thèse de doctorat, université de Bamako.
- Badill, G., De Bièvre C et Guého, E. (1987)**. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes. Atlas clinique et biologique. Tome IVARIA éd., Paris, 131 p
- Concerns. Comprehensive Reviews.definition of mycotoxine. 9, 57-81.
- Baldent, C. (1997)**. Coloration usuelle en Bactériologie. Revue de Développement et santé.
- Barrio, J, Mejía A. (2008)**. Production of antibiotics and other Commercially valuable secondary metabolites. Pp. 302-336. In : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds), Current

developments in solid-state Fermentation. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.

-Barrios, Gonzalez, j, Mejia, A. (2008). Production of antibiotics and other Commercially valuable secondary métabolites .p 302-336. In : Pendey A., Soccol C.R and C. Larroche (Eds). Current developments in solid – state fermentation Asiatech Publishers, INC. SPRINGER, NEW Delhi

- Banerjee, D, Stableforhe, D. (2000).The treatment of respiratory *pseudomonas* infection in cystic fibrosis 60(5), 1053- 1064.

- Bender, C.L., Rangaswamy Vand Loper, J. (1999). Polyketide production by plant – associated *Pseudomonas* .Annu Rev. Phytopathologie.

- Ben Abdellah, R., Frikha, D., Maalej, S et SassiS. (2013). Evaluation in vitro de l’activité antibactérienne et antifongique de quatre espèces algales marines. International journal of biological macromolécules, 75, 283-289.

-Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse, Trugillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). Vol 5 : The Actinobacteria. 2ème édition, spring, new York. 1750 p

-Bergey’s manual (2005).

- Bhat, R., Rai R.V., Karim A.A. (2010). Definition of Mycotoxine à : Present Status and Future Concerns. Comprehensive Reviews.definition of mycotoxine. 9, 57-81.

-Bisoli, E., Garcez, W S ., Hamerski, L., Tieppo, C and Garcer, F .R . (2008) Bioactive pentacyclic triterpenes formes the stems of Combretume laxum. Molecules, 13 (11), 2717-2728

-Biyu, LV ., Weiping, Yin ., Jiayu, Gao ., Huaqing ,Liu ., Kun Liu ., Jie Bai et Qiangqiang Yang. (2018) .*martensii* Karsch and Targeted Bactericidal Action Mechanisms 26 ; 24(1) : 72-

-Bourgaude, f. (2013). Les questions et travaux de recherche nécessaires au développement de la filière ; Exemple de l’apport des sciences cognitives a la production / valorisation des métabolites secondaires d’intérêt, unité Mixte de recherche de 1121 université de lorraine INRA, Nancy- Colmar, fondateur de la société plant Advanced Technologies, Nancy.

-Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en sciences Spécialité Chimie. Université Mohamed Khider – Biskra. Page 29_51.

-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.

-Brady, S. F, Clardy J. (2000). A new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products* 63: 1447-1448.

-Bruneton, J. (2009). Pharmacologie. Phytochimie, plantes médicinales, 4eme ed, ed : EM Inter /Lavoisier Tec and Doc, Paris, 1270P.

C

-Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssinet, C., Fremy J.M., Hennebert G.L., Lesage Messen L., Multo jL., Richaard, Molard, D et Roquebert M.F. (1998). Moisissures des aliments peu hydrates Lavoisier Tec and Doc. France 104.

-Chandra, Sh. (2012). Endophytic fungi: novel sources of anticancer lead molecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 47–59.

- Chaker, H. (2012). « Régulation de l'adaptation de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* à son hôte : implication des métabolites du tryptophane ». Thèse de doctorat : Grenoble : Université de Grenoble : Science agricole.

-Chandra, Sh. (2012). Endophytic fungi : novel sources of anticancer lead molecules. *Appl Microbiol Biotechnol* 95, 47–59 ech.92p

. Chanfir, A. (2016). *Pseudomonas aeruginosa* en milieu de réanimation à l' Hôpital militaire Avicenne Marrakech .Thèse de doctorat en Médecine. Université Cadi Ayyad. Marrak

-Clave, d. (2011). Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour la contrôle de qualité en biologie clinique.

D

- Danuta, nowicka, Ewelina, Grywalska. (2019). *Staphylococcus Aureus* and Host Immunity in Recurrent Furunculosis ; 235(4) :295-305.

- **David, Kadosh. (2016).**Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity By post-transcriptional mechanisms.P 1,2.
- Darcan, C., Ozkanca, R., Idil, O et Flint, KP. (2009).** Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. Pol J Microbiol. ; 58(4) :307-17.
- Darulisa, K., Yang, lam., Priscilla, JT., sundorasan, E., Ong, MT. (2011).** *Candida albicans* Activity teste de balstes Mycological 15(10) :1163-71.
- David, CB, Siebert ., Roman, Sommer ., Domen, Pogorevc ., Michael Hoffmann ., Silke C wenel ., Rolf M uller ., Alexander, Titz. (2019).** Chemical Synthesis of tripeptide thioesters for the biotechnological incorporation into the myxobacterial secondary metabolite argyria via mutasynthesis 15 : 2922-2929.
- Davies, J, Verkera. (2013).** Specialized microbial metabolites : fonctions and origins. J Antibiot (Tokyo). 66(7) :361-4.
- Denis, F., Ploy, M., Martin, C., Bingen, E., Quentin R. (2007).** Bactériologie médicale. Paris Masson, 594 P.
- Deshmukh, S. K., Gupta M.K ., Prakash V ., Saxena S. (2018).** .Endophytic fungi : A Source Of Potential Antifungal Compounds. Journal of fungi 4, 1-42.
- Develoux, M., Enache, A ., Angoulvant, A. (2001)** .le diagnostic biologique des mycétomes. Revue Francophone des laboratoires N° 430.
- DELARRAS, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire .Lavoisier, paris p476
- **Deshmukh, S. K., Shilpa, A., Verekar and Sarita, V. (2015).** Endophytic fungi : a réservoir of antibacterials Front Microbiol. 5 : 715. PMID : PMC4288058. doi : 10.3389/fmicb.2014.00715.
- **Digat, B. (1992).** Contrôle biologique et stimulation de la germination par la bactérisation. Phytoma. Défense des végétaux. 441, 34-38.

 \mathcal{F}

- FjaerviK, E, Zotchev, SB. (2005). Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67(4) :436-43.
- Fraisse, t., lachaud, A., Sotto, j-p., Laving, G., Cariou J., Boiteux L., Escaravage p et Coloby F. (2011). Recommandation du comité d'infectiologie de l'Afu. Diagnostic, traitement et suivi des candiduries.21.5 .314, 321.
- Frisvad, k., Naduman and Band Gajaraj. (2016). *Aspergillus terreus*, international journal of molecular sciences 466-476 ISSN 1422-0067-Goossens H, ferech M, Vander Stichele R, (2017) outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance : a cross –national database study lancet 365 :579 – 78.

 \mathcal{G}

- Ganesh., Kumar., Mongoll, P., Joseph, J et Nageswar y. (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates from *Aspergillus terreus*.
- Gordon, DM, Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates : host and geographic effects. *Microbiology.* ; 149(12) :3575-86.
- Grace, Delia, Alexandra, fetsh. (2018). *Staphylococcus aureus* A Foodborne Pathogen : Epidemiology, Detection, characterization, prevention, and Control : An Overview. In *Staphylococcus aureus*. Elsevier. p 3-10.
- Guessoum, D. (2015). Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urtica dioica* L. et évaluation de leur Pouvoir antibactérien. Mémoire de master, université de Constantine 1.p :40.
- Guiraud,JP.(1998). Microbiologie alimentaires, (edn) dunod .Paris Ganesh kumar, Mongolla P, Joseph, J .Nageswar y. (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates from *Aspergillus terreus*.

 \mathcal{H}

- Hart, T., Shears, p. (2000).Atlas de poche de microbiologie, 1^{er} édition, Médecine – Sciences Flammarion, Paris, P71.

-Hongchang, Yu., Baowu, Zhu et Yulian, Zhan. (2017). Microbial Transformation of Artemisinin by *Aspergillus terreus*. 4(1) : 33.

-Hyde, K.D, Soyong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma .fungal Diversity, ,33 : 163-173.

K

- Kaufmann, GF., Sartorio R., Rogers, C., Meijler, M., Moss, JA., Clapham, B., Brogan AP, Dickerson TJ and Janda KD. (2005). Revisiting quorum sensing : Discovery of additional chemical and biological functions for 3-oxo-N-acylhomoserine lactones. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(2) :309-14.

- Kaul, S., Gupta S., Ahmed, M., Dhar, M.K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants : à treasure hunts for bioactive metabolites Phytochem Rev doi: 10.1007/s11101012-9260-6

-Kharwar, R. N., Mishra, A., Vijay, K. Sharma, Gond S. K., Verma, S. K., Kumar, A., Kumar, J., Singh, D. K. and Goutam, J. (2014). Diversity and Biopotential of Endophytic Fungal Flora Isolated from Eight Medicinal Plants of Uttar Pradesh, India, Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security, doi 10.1007/978-81-322-1801-2_3, pp.23-39.

- King, L. A., Loukiadis, P., Mariani .,Kurdjian, S., Haeghebaert, F. X., Weill, C., Balie, S., Ganet, M., Gouali, V., Vaillant, N., Pihier, H., Callon, R., Novo, O., Gaillot, D., Thevenot-Sergentet, E. Bingen, P. -Chaud and H. de Valk. (2014). Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli*.

- Kirk, P.M., Cannon, P.F., Minter, D.W and Stalpers, J.A. (2008). Dictionnaire of the Fungi. (10th edn). CABI.

- Kirst, HA. (2010). The spinosyn family of insecticides : realizing the potentiel of natural products research. J Antibiot (Tokyo). 63(3) :101-11. Kaul S., Gupta S., Ahmed M., Dhar M.K. (2012). Endophytic fungi from medicinal plants : a treasure hunts for bioactive metabolites Phytochem Rev doi : 10.1007/s11101012-9260-6.

L

-Lass F, Corelia. (2012). *Aspergillus terreus* : How Inoculum Size and Host Characteristion of *Aspergillus terreus*, the journal of mycologie 1192-1194.

-**LE LOIR, Y, GAUTIER, M. (2010).** Monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus* Tec et Doc, Lavoisier, paris.

- **lorène, G., Emilie, D., Annelise, L et Eric, L. (2016).** Comparaison de différentes méthodes d'extraction d'acides dicaféoylquinique à partir d'une plante halophile Comptes Rendus Chimie 19. 1133- 1141.

-**Lu, Y., Haobin, Z., Xixi, Z., Xiaoguang, X., Yichao ,D., Chunmei ,Junling ,S., Dongyan S., Qingsheng H., Hui ,Y et Mingliang, J. (2018).** Production of bioproducts by endophytic fungi : chemical ecology,biotechnological applications, bottlenecks, and solutions. Applied Microbiology and Biotechnology 102, 6279–6298.

M

-**Macheix, J., Fleuriet, J et JayAllemand, C. (2005).** Les composés phénoliques des végétaux : un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. PPUR Presses polytechniques.

-**Manallah, A. (2012).** Acitivité antioxydente et anticoagulante des polyphénols de la pulpe d'olive *Olea europaea* L. Pour obtenir le Diplôme de magister, option Biochimie Appliquée Université Ferhat Abbas sétif 87P.

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

-**Meyer, S., Reeb, C et Bosdeveix, R. (2008).** Botanique : biologie et physiologie végétales. 2 Edition Maloine. Paris. Pp 14, 15.

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

-**Mena, E. (2006).** Les polyphénols de thé, du vin et du cacao, Phytothérapie, Numéro 1 :540-545.

- **Mohanta, J., Tayung ,K and Mohapatra ,U. (2008).** Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. The Internet Journal of Microbiology; 5(2).

-**Mohan, j., praveen, k et sexena, H. (2009).** protocol for in vitro culturs and secondary métabolite analysis of aromatic and médicinal plant. Thèse de doctorat, universté de Guloh Canada.

- **Mohmamed Mahmoud, f. (2017).** Activités biologiques de champignons endopyhytes isolés du palmier dattier (phoenix dactylifera L.). Thèse de doctorat, en Sciences Agronomiques, Spécialité Phytopathologie, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach, P188-189.

-**Mtibaa, L., Fakhfakh, N., Kallel, A., Belhadj, Salah N and Killel K.(2017).** Chlamidosporulation test *Candida albicans* in Mycological Diagnosis of Yeasts 149(12):3575-86.

N

-**Navarro, V et G. Delgado. (1999).** Two Antimicrobial Alcaloïde frome Bocconi A rbore. Journal Of E thnopharmacology Vol .66 (2), Pp. 223-226.

O

- **Oliveira, Silva M. R., Sena, Xisto K and Buarque Gusumao, N. (2009).** Secondary metabolites produced by endophytic fungus *Paecilomyces variotii* Bainier with antimicrobial activity against *Enterococcus faecalis*. In : Mendez-Vilas A. (eds). Current Research Topics in Applied Microbiology : Proceedings of the II international Conference on Environmental, Indutrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007),; pp. 519-520.

-**Ouelbani, R., Bensari, S., Mouas, T., Douadi, K. (2016).** Ethnobotanical investigation on plants used in folk medicine in the régions of Constantine and Mila (north- East of Algeria). Journal of Ethnopharmacologie.

P

-**Pappas, P., Kaufmann, C., Andes, D and other authors. (2009).** Antifungal activity from the extracts of fungal isolates from *Aspergillus* against *Candida* and Clinical practice for the management of Candidiasis : 2009 update by the infectious Diseases Society of American. Clin Infect Dis 48, 503-535.

-**Patrick, B., Jean, L et Michel, S.(1988).** Bactériologie : Les bactéries des infections humaines. 1er Ed Médecine –Sciences Flammarion. Paris.p :100-108274.

-**Pedro, M aqueveque, Carlos, L Cespedes, Isao Kubo, David, S., Seigler and Olov Sterner** . (2017). New bioactive molécule Product bay fungus (1) : 5-18.

-**Ponce, A., Fritz, R., Del Valle, C et Roura S. (2003).**Antimicrobial activity of secondary metabolite product by *Aspergillus* in relation to pathogenic microorganisms. Society of Science fungus and Technology (Elsevier).36: 679-684.

R

- **Ramakrishna, A, Ravishankar, GA.(2011).** Influence of abiotic stress singnal on secondary metabolit in plants and microorganisme. Plant signal Behav 6 : 1720-1731. Doi : 10.4161 / psb .6.11.17613.

- **Rahal, K. (2005).** Standardisation de L’antibiogramme en Médecine Humaine à l’Echelle Nationale Selon les recommandations de l’OMS, 4ème édition, éd Ministère de la Santé, de la Population.

- **Ravan, Evert, Eichhorn. (2014).** Biologie végétale.2émme édition .p-27, 28,30

S

-**Samson, R., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert K. A., Peterson S. W., Varga, J et Frisvad, J. C. (2011).** Phylogeny and nomenclature of the genu *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. Studies in Mycology, 70: 159183.

- **Schmid, J., Magee, PT., Holland, BR., Zhang, N., Cannon, RD et Magee BB.3. (2016)** .Last hope for the doomed , Thoughts on the importanceof a parasexual cycle for the yeast *Candida albicans*. Curr Genet62 :81–85. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0516-8>.

- **Schwarzer, D ., Finking, R and Marahiel M., (2003).** Nonribosomal peptides : from genes to products. Nat Prod Rep, 20(3) : 275 – 287.

-**Selim, K., Elkhateeb, W., Tawila, A., El-Beih A., Tahany, A., El-Diwany, A et Eman F.A. (2018).** Antiviral and Antioxidant Potential of Fungal Endophytes of Egyptian Medicinal Pla-

-**Shen B, (2003).** Polyketide biosynthesis beyound type I, II, III polyketide synthase paradigms «curr .Opin.Chem . Biol. 7, 285-295.

- **Shimada, A., kusano, M et Takeuchi, S. (2013).** Fungal Infection *Aspergillus terreus*. Leading International Fungal Eduction. nts. Fermentation.4, 1-11.

- Sieber, S, Marahiel, M. (2005).** moleculare mechanisemes underlying nonribosomal peptide synthesis : Approaches to new antibiotic. Chem Rev, 105(2) : 715 -728.
- Singh, SB, Barrett, JF. (2006).**Empirical antibacterial drug discovery – foundation in natural products. Biochem. Pharmacol. 71 : 1006 -1015.
- **Slama, A., Ben Salem, M., Ben Naceur, M et Zid E. D. (2005).** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Science et changements planétaires/Sécheresse, 16(3), 225-229.
- **Slama, A., Ben Salem, M., Ben Naceur, M et Zid E. D. (2005).** Les céréales en Tunisie : production, effet de la sécheresse et mécanismes de résistance. Science et changements planétaires/Sécheresse, 16(3), 225-229.
- Soulimani, R, Soulaleh, N. (2014).** Métabolites secondaires et composés organiques volatils rôles et intérêts phytothérapie 14(1), 44- 57.

T

-
- **Talbi1, H., Boumaza, A., El-mostafa, K., Talbi J et Hilali1, A. (2015).** Evaluation de l'activité antioxydante et la composition physico-chimique des extraits méthanolique et aqueux de la *Nigella sativa* L. (Evaluation of antioxidant activity and physico-chemical composition of methanolic and aqueous extracts of *Nigella sativa* L). Mater. Environ.Sci 6, 1111-1117.
- Tenguria,R K., Khan F N and Quereshi S. (2011).** Endophytes- mines of pharmacological therapeutics, World Journal of Science and Technology, 1(5) : 127149ISSN : 2231 – 2587.
- Thomashow, L. (1996).** Biological control of plant root pathogens. Curr Opin . Biotechnol .N° 7, 343- 347.
- 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.
- Toubal, souheyla. (2017).** Caractérisation de la relation chémotypes de l'ortie- bactérie vectorisées associées et évaluation de leur activité sur culex sp, thèse de doctorat en biologie sous la direction de Mr ARAB, boumerdas université M'Hamed bougara ,19p.

-Tsujiho, I ., I. Orikoshi., H. Tanno, K., Fujimoto, I .,L Miyamoto., C Imada. , Y OKam, I and Inamod. (1993). Cloning Sequence and expression of a chitinase gene from a marine bacterium , *Alteromonas* Sp . Strain O- 7 Bacterial ., 175 ; 176 -181.

V

-Vijayakumari, S., Sasidharannair, N K., Nambisan, B., Mohandas C. (2013). Optimisation of media and temperature for enhanced antimicrobial production by bacteria associated with *Rhabditis* sp. *Journal Microbiology* 5, 136-141.

-Vincent, M. (2011). Catherine. "Les animaux d'élevage malades des antibiotiques." *Le Monde.fr*, November 17, sec. Planète.

W

-Wang, H., Millour, M., Kaegi R. (2018). Silver nanoparticles : A novel antibacterial agent for control of *Cronobacter sakazakii*, *Journal of Dairy Science*.

-Walger, p., internist. (2016). Rational use of antibiotics 57(6) :55-68.

Y

- Ying, Yin., Menghao, Cai., Xiangshan, Zho., Zhiyong Li et Yuanxing ,Zhang. (2016). Polyketides in *Aspergillus terreus* : Biosynthesis Pathway Discovery and Application. *Microbiol Biotechnol* de Valk., Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli*.

-Yoko, Hasegawa ., Takashi Fukuda., Keiichi Hagimori., Hiroshi Tomoda et Satoshi Omura. (2007). Tetracycline, new antibiotics produced by *Aspergillus niger* FKI 2342.

-Yusuf, Y. (2006). *Trends Food Sci. Tech*, Vol 17, pp 64-71.

Z

-Zhang, H., Song Y. C., Tan R. X. *Biology and chemistry of endophytes*. (2006). *Natural Product Reports* ; 23: 753-754 .

Annexes

Annexe 01 : Matériel de laboratoire utilisé :

Appareils :

Nom de l'appareil	Photo (originale)	Nom de l'appareil	Photo (originale)
Etuve		Agitateur	
Balance		Autoclave	
Pied à coulisse		Hotte	

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

-Petit matériel consommables :

- Aiguilles
- Bavette
- Bec Bunsen
- Boite pétrie en plastique
- Boite Pétri en verre
- Ciseaux
- Coton
- Entonnoirs en verre
- Eprouvettes graduées 500ml 100ml
- Flacons 250ml et 500ml
- Gants
- Gaze
- Mèche à gaz
- Papier aluminium
- Papier filtre
- Para-film

-Pipettes pasteur

-Portoir

-Tubes à essai en plastique 20ml

Annexe 02 : Composition des milieux de culture

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) JOHNSON et BOOTH (1983)

- Pomme de terre 200g
- D-GLUCOSE 10g
- Agar 20g
- Eau distillé complété a1000ml
- pH=6.5

Autoclavage 20minutes 120°C

Milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (JONSTHON et Booth, 1983)

- Pomme de terre 200g
- Glucose 20g
- Eau distillé Complété a1000 ml
- Autoclavage 20minut a 120°C

Milieu TSA (gélose trypto – caséine soja)

- Tryptone : 15 g
- Peptone papaique de soja 5g

•Chlorure de sodium 5g

•Agar –Agar 15g

•ph =7.3

Milieu de Chapman

•Peptone 11.0 g/l

• Extrait de viande 1,0 g/l

• Chlorure de sodium 75 g/l

• Mannitol 10,0 g/l

• Rouge de phénol 0,025 g/l

• Agar 15,0

• pH 7,4

Milieu Sabouraud (Sabouraud, 1910)

Peptone 10 g

Glucose massé 20 g

Agar-agar. 15 g

Eau distillée... 1 000 ml

Vitamines et facteurs de croissance

pH = 6,0

Colorants :

Violet de Gentiane colorant utilisé pour la coloration de Gram, sa composition chimique par 100ml d'eau distillée est la suivante :(Guiraud, 1998)

Violet de Gentiane 1g

Ethanol à 90% 10 ml

Phénol	2g
--------	----

Lugol : (Guiraud, 1998)

Iode	1g
------	----

Iodure de potassium	2g
---------------------	----

Eau distillée	300 ml
---------------	--------

Fuschine : (Guiraud, 1998)

Fuschine basique	1g
------------------	----

Alcool éthylique à 90°	10 ml
------------------------	-------

Phénol	5g
--------	----

Eau distillée	100 ml
---------------	--------

Annex 03 : Les méthodes utilisées en laboratoires :

Coloration simple

Une coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes (**Canler 2005**). Sur le frottis fixé et refroidi :

- Faire couler la solution de bleu de méthylène jusque' à ce que toute la lame soit recouverte.
- Laisser agir 1 minute.
- Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à L'eau du robinet jusqu' à élimination des colorants en excès.
- Sécher à l'air ou devant le bec bunsen, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin, sans frotter.
- Examiner au microscope, objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion.
- Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.

Annexe 04 : Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique.

Tableau XII : Les zones d'inhibitions du premier essai (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d'*Aspergillus terreus*.

Les codes d' <i>Aspergillus terreus</i>	La zone d'inhibition (mm)											
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
AA1101	0.5	0.2	0.3	0.9	1.7	2.2	2	0.9	1.9	1.6	1.3	2.1
T2257	3.1	1.1	0	0	0.5	0.5	0.4	0.7	4.8	1.3	0.3	1
B 1283	11.9	6.4	0.4	0.1	0	0.8	1.5	2.3	3.5	2.9	2.6	0
T 1172	1.6	0.8	0.2	0	1.2	1	0.7	0	1.6	3.5	1.9	1.2
Témoin	1	0.5	0.02	0	8	7	5	3	2	2.3	2.2	2

Tableau XIII : Les zones d'inhibitions du deuxième essai (mm) des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d'*Aspergillus terreus*.

Les codes d' <i>Aspergillus terreus</i>	La zone d'inhibition (mm)											
	<i>E coli</i>				<i>S. aureus</i>				<i>P, aeruginosa</i>			
AA 1101	1.2	1.7	0.6	0.3	3.1	1.1	1.7	1.9	2.6	0.9	1.7	1.8
T 2257	2.6	0.1	0.1	0	0.6	2.5	0.9	1	2.1	3.7	3.7	3.7
B1283	2.6	2.9	2.2	0.3	1.2	0.8	1.9	0.8	5.3	4.9	2.8	1.2
T1172	2.8	1.7	0.8	0.5	2.2	2.1	4.2	1.9	0.4	1.5	0	0

Tableau XIV : La moyenne des zones d'inhibitions du premier essai (mm) exercée par les souches d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis les souches bactériennes testées.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S.aureus</i>
AA1101	1.767	0.522	1.727
T2257	1.722	1.077	0.582
B1283	2.077	4.497	1.205

T1172	2.1	0.705	0.782
Témoin	2.16	0.516	5.795

Tableau XV : La moyenne des zones d'inhibitions (mm) du deuxième essai des souches bactériennes vis-à-vis des filtrats de culture des souches d'*Aspergillus terreus*.

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
AA1101	1.632	0.975	2
T2257	3.36	0.727	1.272
B1283	3.41	2.067	1.217
T1172	0.497	1.482	2.65

Tableau XVI : Les zones d'inhibitions (mm) des deux essais exercées par les souches d'*Aspergillus terreus* vis-à-vis *Candida albicans* et *Aspergillus brasiliensis*.

	<i>Candida albicans</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i>	
B1283	0.3	0.4	0.3	0.4
AA1101	0.2	0.3	0.2	0.1
T2257	0.2	0.1	0.2	0.1
T1172	0.1	0.1	0.4	0.5

