

REUPLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université SAAD DAHLAB -Blida -1



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

Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV

Filière Sciences Biologiques

Option : Microbiologie

Thème

**Recherche de l'activité antimicrobienne de quelques souches
d'*Aspergillus terreus***

Présenté par :

- Boudjema Asma
- Ferrah Noussaiba
- Khemissi Saida

Date de la soutenance :

12/09/2021

Devant le jury :

- | | | |
|----------------------|-----------------|---------------------|
| ▪ Alaoui | MAB/USDB | Président |
| ▪ Ait Saadi | MCB/USDB | Examinatrice |
| ▪ Mohamed Mahmoud F. | MCB/USDB | Promotrice |

Promotion 2020/2021

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à remercier Allah, le clément et le miséricordieux de nous avoir donné la force et la patience de mener à bien ce modeste travail.

*Nous tenons à exprimer notre grande gratitude à notre promotrice **Madame MOHAMED MAHMOUD.F** pour son encadrement, pour nous avoir proposé ce sujet, sa disponibilité et son aide précieuse, malgré ses charges académiques et professionnelles.*

*Nous remercions également Monsieur **BOUCHRITE** l'époux de madame Mohamed Mahmoud qui nous aidez de trouver de labo de recherche pour déterminez nos travail dieu à son âme.*

*Je remercie très vivement **Mme SELMA**, l'ingénieure de laboratoire de phytopathologie pour leurs aides et leurs gentilleses.*

*Ma gratitude à **Ms Alaoui** de m'avoir fait honneur en présidant le jury.*

*Mes sincères remerciements à **Mme Saadi** qui m'ont fait plaisir en faisant partie de membre de jury.*

*Un immense merci à chef de laboratoire centrale de Koléa la wilaya de Tipaza lors de notre passage exceptionnellement monsieur **Zaibak Tawfik** chef de l'unité service bactériologique qui nos partage des informations essentiels sans oublier **Abidi Mohamed** qui nous aidez.*

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

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma très chère et douce mère, mon très cher père pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance, pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Je vous aime, qu'Allah vous protège.

A mes chères sœurs Hafida et Fasmina

Pour leur soutien permanent et leurs encouragements continus, Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mes chères amies Nabila, Noussaïba et Saïda

A ma toute famille sans exclu

Asma

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma très chère et douce mère, mon très cher père pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance, pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Je vous aime, qu'Allah vous protège.

A mes chères frères M'hamed walid,, Phrif et Nabil

Pour leur soutien permanent et leurs encouragements continus, Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mes chères amies, Asma, Saida, Fasmine et Amira

A ma toute famille sans exclu

Noussaiba

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

A ma très chère et douce mère, mon très cher père et ma grand-mère pour l'éducation qu'ils m'ont prodigué, avec tous les moyens et au prix de tous les sacrifices qu'ils ont consenti à mon égard, pour le sens du devoir qu'ils m'ont enseigné depuis mon enfance, pour leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études. Je vous aime, qu'Allah vous protège.

A mes chères sœurs Sara et Zaki

Pour leur soutien permanent et leurs encouragements continus, Pour vous exprimer toute mon affection et ma tendresse.

A mes chères amies, Noussaiba, Asma, Amira et Fousra

A ma toute famille sans exclu

Saida

Liste des abréviations

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

MH : Milieu de culture Müller Hinton

HK : Milieu de culture Hécktoene

GN : Gélose Nutritive

SARM : Staphylococcus aureus Résistant à la méticilline.

AgNPs : Nanoparticule d'argent

AgNO₃ : Nitrate d'argent

UV : Ultra-Violet

DLS : Dynamic Light Scattering

MSFB : Métabolite secondaire Fongique Brut

ATB : Antibiotique

M2 : Milieu aux extraits de malt et de levure.

M2S5 : Milieu salé aux extraits de malt et de levure.

Listes des figures

N°	Intitulé	Page
01	Mécanisme d'action des agents antibactériens.	06
02	Aspect microscopique et macroscopique d' <i>Aspergillus terreus</i> . (A) : Tête aspergillaire. (B) : <i>A. terreus</i> sur milieu M2, (C) : <i>A. terreus</i> sur milieu M2S5.	08
03	Structure chimique de quelque métabolite secondaire synthétisé par <i>Aspergillus terreus</i> . (A) : lovastatine, (B) : terrétonine.	10
04	Aspect d'AgNPs synthétisés par la réduction de solution d'AgNO ₃ avec le filtrat cellulaire brut d' <i>Aspergillus terreus</i> .	10
05	Aspect microscopique de trois bactéries tests. (A) : <i>Escherichia. coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i>	15
06	Aspect microscopique de <i>Candida albicans</i> . (A) : <i>Candida bourgeon</i> , (B) : <i>Candida mycélium</i> .	17
07	Les souches <i>Aspergillus terreus</i> . (A) : B1283 ; (B) : T1172 ; (C) : T2257.	19
08	Les étapes de régénération et purifications des trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> . (A) : la souche testée, (B) : prélèvement d'un fragment du mycélium, (C) : dépôt de fragment à la surface du milieu PDA.	20
09	Les étapes de préparation des extraits fongiques nécessaires pour la synthèse des substances antimicrobiennes. (A) : les disques mycéliens ; (B) : Dépôt des disques mycéliens dans le milieu PDB ; (C) : Flacons déposés dans l'agitateur horizontale.	22
10	Les étapes de filtration. (A) : Filtration par mèches à gaz, (B) : Deuxième filtration par papier Wattman, (C) : tubes contenant filtrats de culture, (D) Centrifugation des tubes.	23

11	Séparation de mélange (Extrait +solvant) par décantation (la phase organique est transparente et la phase inorganique est jaune).	23
12	Récupération l'extrait brut. (A) : Concentration de la phase organique par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur du type BÜCHI). (B) : Extrait brut de chloroforme. (C) : Extrait brut de l'acétate d'éthyle.	24
13	Les étapes de la détection de la présence des nanoparticules dans les trois filtrats de cultures d' <i>Aspergillus terreus</i> . (A) : Fermentation, (B) : Filtration des bouillons de cultures par des microfiltres de 0,22 µm de diamètre, (C) : Dépôt des filtrats de cultures dans des tubes stériles, (D) : Détection de la présence des nanoparticules par DLS, (E) : absorbance des AgNPs par spectrophotométrie UV-visible.	25
14	Les trois techniques utilisées. (A) : technique des disques, (B) : technique des cylindres d'agar et (C) : technique des puits.	27
15	Aspect microscopique des trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> , au grossissement X32. (A) : T2257, (B) : B1283, et (C) : T1172.	28
16	Les souches testées. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	29
17	Diamètres des zones d'inhibition exercées par les trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> contre les souches microbiennes testées (technique des cylindres d'agar).	30
18	Activités antimicrobiennes de la souche T2257 déterminées par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : T2257/ <i>Escherichia coli</i> , (C) : T2257/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (D) : T2257/ <i>Staphylococcus aureus</i> , (E) : T2257/ <i>Candida albicans</i> .	31
19	Activités antimicrobiennes de la souche T1172 déterminée par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : T1172 / <i>Escherichia coli</i> ,	31

	(C) : T1172 / <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (D) : T1172 / <i>Staphylococcus aureus</i> , (E) : T1172 / <i>Candida albicans</i> .	
20	Activités antimicrobiennes de la souche B1283 déterminée par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : B1283/ <i>Escherichia coli</i> , (C) : B1283/ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (D) : B1283/ <i>Staphylococcus aureus</i> , (E) : B1283/ <i>Candida albicans</i> .	32
21	Révélation de la présence des nanoparticules d'argents. (A) : Témoin négatif, AgNO ₃ seulement. (B) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche T1172, (C) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche T2257, (D) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche B1283.	34
22	Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits bruts d'acétate d'éthyle des trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> contre les souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.	36
23	Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits bruts de chloroforme des trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> contre les souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.	36
24	Activités antimicrobiennes de la souche T2257 déterminée par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	37
25	Activités antimicrobiennes de souche B1283 détectées par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	37
26	Activités antimicrobiennes de souche la T1172 détectées par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) :	38

	<i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	
27	Diamètres des zones d'inhibition exercées par les trois antibiotiques contre les souches microbiennes testées.	38
28	Activités antimicrobiennes exercées par les trois antibiotiques par test d'antibiogramme. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	39
29	Activités antimicrobiennes exercées par la souche T1172. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	39
30	Activités antimicrobiennes montrées en présence de la souche B1283. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	40
31	Activités antimicrobiennes détectées en présence la souche T2257 par la technique des disques. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	40
32	Diamètres des zones d'inhibition exercées par les AgNPs des trois souches en présence des souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.	41
33	Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche T1172 détectées par la technique des disques. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> .	41
34	Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche T2257 détectées par la technique des disques. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> .	41

35	Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche B1283 déterminées par la technique des disques. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> .	42
36	Activités antimicrobiennes de la souche T1172 déterminées par la technique des puits. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	42
37	Activités antimicrobiennes de la souche T2257 exercées par la technique des puits. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	43
38	Activités antimicrobiennes de la souche B1283 enregistrées par la technique des puits. (A) : <i>Escherichia coli</i> , (B) : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , (C) : <i>Staphylococcus aureus</i> , (D) : <i>Candida albicans</i> .	43

Liste des tableaux

N°	Intitulé	page
01	Quelques champignons endophytes producteurs d'antibiotiques.	06
02	Origine des champignons utilisés	18
03	Comparaison poids des extraits bruts des souches d' <i>Aspergillus terreus</i> .	33
04	La taille des nanoparticules présente dans les filtrats de culture des trois souches d' <i>Aspergillus terreus</i> .	34
05	La taille des nanoparticules d'argent (AgNPs) et leur absorbance.	35

Résumé

La multi-résistance microbienne pose de grands problèmes de santé publique. Pour pallier à ce problème les scientifiques sont toujours à la recherche de nouveaux produits antimicrobiens. Sur cette problématique de recherche cette étude est basée sur l'activité antimicrobienne de trois souches d'*Aspergillus terreus* (T2257, T1172, B1283) à l'encontre de trois bactéries pathogènes : deux à coloration de Gram - (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une à coloration de Gram + (*Staphylococcus aureus*) ainsi qu'une levure (*Candida albicans*). En effet l'évaluation de cette activité a été effectuée après une fermentation sur milieu PDB et une extraction par l'acétate d'éthyle et le chloroforme, selon trois techniques différentes ; la technique des cylindres d'agar (confrontation directe), la technique des disques et la technique des puits. L'évaluation de l'activité antimicrobienne des souches d'*Aspergillus terreus* à l'encontre des pathogènes étudiées, montre une variation de sensibilité selon l'extrait et le filtrat de culture et la souche pathogène testée. Cette activité a été exercée soit par un effet d'antibiose ou par compétition vis-à-vis de l'espace ou les nutriments. Les résultats de cette confrontation montrent que l'extrait brut de la souche T2257 et le filtrat brut de la souche T1172 ont donné la meilleure zone d'inhibition (22 mm de diamètre) et la souche T2257 a donné une faible zone d'inhibition (3 mm de diamètre) avec *Staphylococcus aureus*. En comparaison les zones d'inhibitions obtenues par les trois souches d'*Aspergillus terreus* avec les résultats de l'antibiogramme, des zones d'inhibitions faibles en présence *E. coli*, une zone d'inhibition forte en présence *P. aeruginosa* et des zones d'inhibitions très fortes en présence *S. aureus*. Les résultats de la technique des disques montrent que les extraits d'acétate d'éthyle avaient plus d'effet que le Chloroforme. *Aspergillus terreus* a la capacité de synthèse les nanoparticules et plus spécialement les nanoparticules d'argent « AgNPs », qui ont montré une activité antimicrobienne plus efficace contre *Pseudomonas aeruginosa* avec zone d'inhibition (22 mm de diamètre).

Les souches d'*Aspergillus terreus* peuvent représenter une source de nouvelles molécules bioactives pour résoudre le problème de la multi-résistance aux antibiotiques.

Mots clés : *Aspergillus terreus*, activité antimicrobienne, substances antimicrobiennes, AgNPs.

Abstract

Microbial multi-resistance poses major public health problems. To overcome this problem, scientists are therefore looking for new antimicrobial products for this purpose, this work is based on the study of the antimicrobial activity of three strains of *Aspergillus terreus* (T2257, T1172, B1283) against three bacteria: two with Gram stain (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and Gram + stain (*Staphylococcus aureus*) as well as yeast (*Candida albicans*). Indeed, the evaluation of this activity was carried out after fermentation on PDB medium and extraction with ethyl acetate and chloroform, according to three different techniques ; the technique of agar cylinders (direct confrontation), the technique of discs and the technique of wells. The evaluation of the antimicrobial activity of the strains of *Aspergillus terreus* compared to the evaluations studied, shows a variation in sensitivity depending on the extract and the filtrate of the culture and of the strain tested. The results of this confrontation indicate that the crude extract of strain T2257 and the crude filtrate of strain T1172 gave a better zone of inhibition of 22 mm in diameter and strain T2257 gave a weak zone of inhibition of 3 mm in diameter with *Staphylococcus aureus*. The effect of organic extracts of fungal strains was tested by the disc technique. In comparison, the zones of inhibition obtained by the three strains of *Aspergillus terreus* with the results of the antibiogram, zones of weak inhibitions in the presence of *E. coli*, a zone of strong inhibition in the presence of *P. aeruginosa* and zones very strong inhibitions in the presence of *S. aureus*. The results of this test revealed that ethyl acetate extracts had more effect than chloroform. *Aspergillus terreus* has the capacity to synthesize nanoparticles and more particularly AgNPs» silver nanoparticles, which seek antimicrobial activities and can effectively inhibit multi-resistant bacteria, more particularly *Pseudomonas aeruginosa* (22 mm in diameter).

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

Key words: antimicrobial activity, antimicrobial products, *Aspergillus terreus*, AgNPs

الملخص

تسبب المقاومة الجرثومية المتعددة مشاكل صحية عمومية كبرى. للتغلب على هذه المشكلة، يبحث العلماء دائمًا عن منتجات جديدة مضادة للميكروبات. في هذه المشكلة البحثية، تستند هذه الدراسة إلى النشاط المضاد للميكروبات

لثلاث سلالات من الرثائيات الأرضية (T2257, T1172, B1283) ضد ثلاث بكتيريا مرضية: انتان بيا صبيغة غرام - *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* واحدة سلطنة بقرام + وكذلك

(*Staphylococcus aureus*)
(*Candida albicans*)

تم تقييم هذا النشاط بعد التخمير على وسط PDB والاستخلاص باستخدام أسيتات الإيثيل والكلوروفورم وفقًا لثلاث تقنيات مختلفة: تقنية اسطوانات الإجار (المواجبة العياشرة) وتقنية الأقراص وتقنية الأبار. أظهر تقييم النشاط المضاد للميكروبات لسلالات الرثائيات الأرضية ضد مسببات الأمراض المدروسة تباينًا في الحساسية اعتمادًا على المستخلص ومرشح الثقافة والخلطة المرضية التي تم اختبارها. تم ممارسة هذا النشاط إما عن طريق تأثير مضاد حيوي أو عن طريق التنافس على الفضاء. أظهرت نتائج هذه T1172 والرشح الخام للسلالة T2257 المقارنة أن المستخلص الخام للسلطة أعطت أفضل منطقة تثبيط

T2257 عطلت منطقة تثبيط ضعيفة (قطرها 3 مم) مع قطرها 22 مم

بالمقارنة، فإن مناطق التثبيط التي حصلت عليها السلالات الثلاث من *Aspergillus terreus*

أعطت نتائج المضاد الحيوي، ومناطق التثبيط الضعيفة في وجود *Escherichia coli*

منطقة تثبيط قوي في وجود *Pseudomonas aeruginosa* ومناطق قوية جدًا في وجود المكورات العنقودية (*Staphylococcus aureus*)

. أظهرت نتائج تقنية القرص أن مستخلصات أسيتات الإيثيل كان لها تأثير النهية أكبر من الكلوروفورم

Aspergillus terreus لديه القدرة على تصنيع الجسيمات النانوية وخاصة

الجسيمات النانوية الفضية AgNPs والتي أظهرت نشاطًا مضادًا للميكروبات أكثر

فعالية ضد *Pseudomonas aeruginosa*

منطقة تثبيط (قطرها 22 مم).

قد تعمل سلالات *Aspergillus terreus*

مصدرًا للجزيئات النشطة بيولوجيًا الجديدة لحل مشكلة المقاومة المتعددة للمضادات الحيوية

الكلمات المفتاحية: الرثائيات الأرضية، النشاط المضاد للميكروبات، المواد المضادة للميكروبات AgNPs

Table des matières

Résumé

Summary

المخلص

Remerciement

Dédicaces

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Table des matières

Introduction.....1

Chapitre I : Partie bibliographique

I.1. Activité antimicrobienne.....3

I.1.1. Activité antivirale.....3

I.1.2. Activité anticancéreuse.....3

I.1.3. Activité antioxydante4

I.1.4. Activité antifongique.....4

I.1.5. Activité antibactérienne5

I.2. Généralités sur *Aspergillus*.....7

I. 2.1. *Aspergillus terreus*.....7

I.2.1.1. Classification.....8

I.2.1.2. Caractères généraux8

I.2.2. La production de substances antimicrobiennes par *Aspergillus terreus*.....9

I.3. Généralité sur les germes pathogènes.....11

I.3.1. Les bactéries pathogènes.....	11
I.3.1.1. <i>Escherichia coli</i>	11
I.3.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
I.3.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
I.3.2. Les champignons pathogènes	15
I.3.2.1. <i>Candida albicans</i>	15

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II.1. Matériel.....	17
II.1.1. Matériel biologique.....	17
II.1.2. Matériel non biologiques.....	17
II.2. Méthodes	18
II.2.1. Régénération et purification des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	18
II.2.2. Caractérisation morphologique des souches fongiques étudiées.....	19
II.2.3. Etude morphologique des souches microbiennes.....	20
II.2.3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	20
II. 2.4.2. Technique des cylindres d'agar.....	21
II. 2.4.3. Technique des disques et des puits.....	21
II. 2.4.3.1. Fermentation et extraction de substances antimicrobiennes.....	21

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation morphologiques des souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	27
III.2. Etude morphologique des souches microbiennes.....	27
III.3. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	28
III.4. Discussion.....	43

Conclusion

Références bibliographique

Annexes

Introduction

Introduction

La résistance microbienne a évolué et représente actuellement un grand problème dans le domaine de la santé publique à l'échelon mondial. Il n'y a que quelques agents antimicrobiens pouvant être utilisés contre certains pathogènes et ce nombre continue à diminuer. Effectivement, ce sont les microorganismes multirésistants aux drogues qui sont difficiles à traiter. Par exemple, les pathogènes multirésistants, tels que *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* démontrent une résistance contre la majorité des antibiotiques (Mitscher et coll., 1999).

Le fait que le nombre des microorganismes multirésistants augmente, il y a une grande inquiétude que plusieurs antibiotiques deviendront inefficaces. Alors, la découverte et le développement de nouveaux agents antimicrobiens sont grandement recherchés. De ce fait, plusieurs scientifiques commencent à la recherche de nouveaux agents antimicrobiennes et de porter une attention particulière aux végétaux et aux champignons (Hopley et Schalkwyk, 2006).

Les champignons contiennent des produits naturels, lesquels sont reconnus pour démontrer des activités antimicrobiennes. Parmi les différents groupes de champignons les plus importants, les champignons endophytes qui peuvent représenter un réservoir sous-exploré de nouvelles ressources biologiques destinées à être exploitées dans les secteurs pharmaceutique, industriel et agricole (Zheng et al., 2016).

Dans ces domaines, selon les statistiques, parmi un totale de 33500 métabolites microbiens bioactifs décrits, environ 12,5% (4200) sont des métabolites de bactéries unicellulaires et de cyanobactéries, 41% (13700) sont des produits de fermentations d'actinomycètes et environ 47% (15600) sont d'origine fongiques (Bills et Gloer, 2016). Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. En outre, les espèces du genre *Aspergillus* ont une grande importance économique, écologique et médicale, et la production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces de ce genre a été détectée (Abu-Seidah, 2003). Certains espèces de ce genre produisent des métabolites et plus spécialement *Aspergillus terreus* qui est un producteur exceptionnel de ces métabolites bioactif ayant une action antivirale, antioxydante, anticancéreuse, antifongique tels que l'acide trypacidine et antibactérien tels que la flavipine, et la terriene (Guangquan et

al., 2011 ; Pedro, 2017). Il peut synthétiser également des nanoparticules est plus spécialement AgNPs qui sont utilisé dans le domaine médical.

Dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à l'étude de l'activité antimicrobienne de trois souches fongiques du l'espèce d'*Aspergillus terreus* par l'utilisation de trois techniques, une confrontation directe (méthode des disques d'agar) méthodes des disques et des puits contre quelques souches microbiennes multi-résistantes.

CHAPITRE I

Partie Bibliographique

I. Partie bibliographique

I.1. Activité antimicrobienne :

L'utilisation généralisée d'antibiotiques à partir des années 1940 notamment la pénicilline découverte en 1928 et la streptomycine découverte en 1943 a transformé la médecine en fournissant des remèdes efficace contre les maladies les plus fréquentes de l'Europe (Lewis, 2012).

Les agents antimicrobiens occupent une place importante grâce à leurs rôles, comme inhibiteurs de croissance des bactéries, des champignons, des virus et des insectes donc sont classés comme des agents antibactériens, antiviraux, antioxydants, anticancéreux et antifongiques (Deshmukh et *al.*, 2015).

Il existe de nombreuses sources naturelles de substances antimicrobiennes, qui peuvent être d'origine végétale tels que la plante médicinale *Pistacia lentiscus L.* efficace dans la lutte contre *Helicobacter pylori*, animale tels que le Céfopérazone isolée de bovin et efficace contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, ou microbiennes tels que les champignons, une nouvelle cytochalasine, phomopsichalsin a été isolée de l'endophyte *Phomopsis. sp* a montré une activité contre *Bacillus subtilis*, *Salmonella gallinarum* et *Staphylococcus aureus* (Strobel et *al.*, 2004 ; Naouar et *al.*, 2016 ; Jean, 2021).

I.1.1. Activité antivirale

La recherche de nouvelles molécules antivirales naturelles est nécessaire à cause de l'évolution ainsi que l'apparition de nouvelles souches de virus redoutables causant des effets terribles sur les vies humaines (Sharma et *al.*, 2019). Les endophytes pourraient être une des sources les plus prometteuses. Cependant, le manque de système de criblage antivirale limite la production de ces composés et par ce fait, le nombre des molécules antivirales attribués aux endophytes est limité (Fadiji et Babalola, 2020). Parmi les nouvelles molécules produites par *Pestalotiopsis vaccinii* un champignon endophyte isolé à partir de *Kandelia candel (L.) Druce*, le vaccinol J a montré une activité plus élevée contre l'entérovirus (Wang et *al.*, 2017).

I.1.2. Activité anticancéreuse

Le cancer est une maladie caractérisé par une prolifération anormale et anarchique des cellules, qui mènent à la formation de tissus non contrôlés et la principale cause de mortalité dans le monde (Pimentel et *al.*, 2011).

Selon Teixeira et *al.*, (2019) en 2018, 18 millions de cas de cancer et 10 millions de décès ont été recensés dans le monde. Afin de palier à ce problème de santé, la recherche de nouvelles molécules anticancéreuses est devenue très importante. Les champignons endophytes ont reçu de l'importance dans ce domaine et plusieurs molécules anticancéreuses ont été isolées telles que terrien produit par le champignon endophyte *Aspergillus terreus* isolé à partir de *Achyranthus aspera* et qui possède une activité antiproliférative contre la lignée cellulaire du cancer du poumon humain. Fan et *al.*, (2020) ont permis l'isolement et l'identification de deux nouveau dérivés de l'acide décalinoyls pirotétramique, les pyrénosétines A et B produits par *Pyrenochaetopsis* sp. un champignon endophyte de *Fucus vesiculosus*.

I.1.3. Activité antioxydante

Les radicaux libres dérivés de l'oxygène à l'origine de plusieurs maladies telles que le diabète, le cancer et la maladie d'Alzheimer (Fadiji et Babaloba, 2020). Les composés antioxydants sont des substances qui peuvent protéger l'organisme de dommages de ces radicaux. Les antioxydants naturels sont généralement trouvés chez les plantes et chez les champignons endophytes (Pimentel et *al.*, 2011). Une nouvelle dépsidone, la mollicellin O produit par *Chaetomium* sp champignon endophyte isolée à partir d'*Eucalyptus exserta* a montré une activité de piégeage des radicaux libres (Ouyang et *al.*, 2018).

I.1.4. Activité antifongique :

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* et par exemple utilisé pour le traitement de différente infection 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 et Garine, 2003).

I.1.5. Activité antibactérienne :

Selon Liu *et al.* (2019), environ 700000 personnes sont tuées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques, et ce problème ne fera qu'augmenter si la recherche de nouvelles molécules ne s'accélère pas.

Les molécules antibactériennes sont des substances chimiques et/ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers principalement des bactéries. Cette action peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique, mais elle peut aussi 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).

Parmi un total de 10700 antibiotiques quelques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre *Monillales* constituent les réservoirs les plus importants. De nombreuses espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connue pour leur 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 01**).

Les antibiotiques agissent sur les bactéries en inhibant des fonctions physiologiques précises telles que la synthèse de 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 01**).

Tableau 01 : Quelques champignons endophytes producteurs d'antibiotiques.

Champignons endophytes	Substances antibactériennes	Références
<i>Daphnopsis americana</i>	Guanacastepene A	(Brady et al., 2001)
<i>Aspergillus terreus</i>	Acide terréique	(Berger, 2014)
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergilliques	(Gourguand, 1996)
<i>Aspergillus clavatus</i>	Brefeldin A	(Khiralla et al., 2017)
<i>Beauveria bassiana</i>	Beauvericine	(Keswani et al., 2015)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline	(Marinelli et Marcone, 2011)

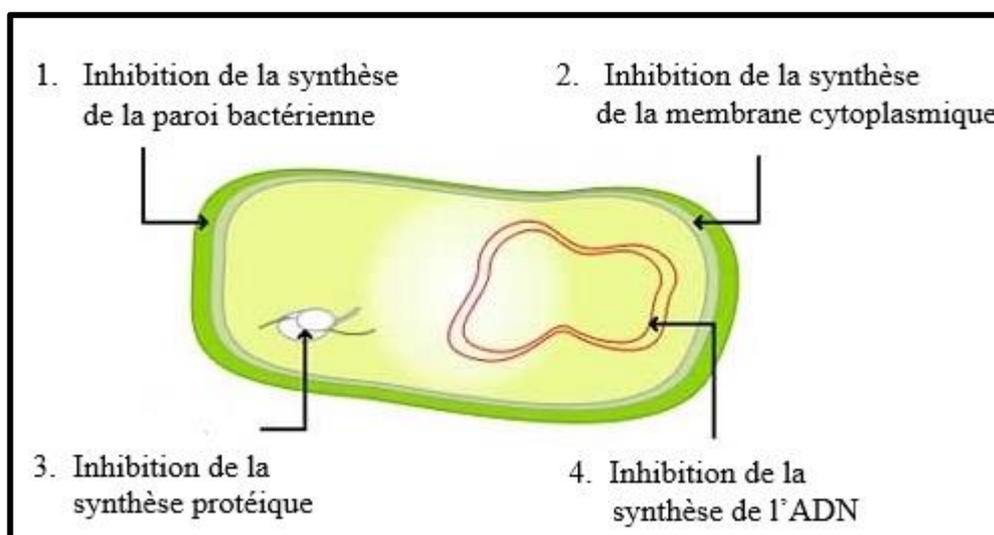


Figure 01 : Mécanismes d'actions des agents antibactériens (Aukenthaler et Bergogne, 1995).

I.2. Généralités sur *Aspergillus* :

Le genre *Aspergillus* a été reconnu comme un microorganisme en 1729 par Micheli. Il se trouve dans le monde entier et se compose de plus de 300 espèces (Balajee et *al.*, 2006). Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur.

Ce sont des champignons ubiquistes se trouve dans les milieux ruraux (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques en décomposition), ainsi qu'en milieu urbain (Bioforma, 2002).

Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines dont *Aspergillus fumigatus* est l'espèce la plus pathogène et d'autres espèces sont moins fréquemment observées, et sont connues pour la capacité de produire certaines molécules bioactives dont possèdent des propriétés thérapeutiques utilisables contre de très nombreuses maladies, ceux-ci incluent : *Aspergillus niger* et *A. terreus* (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002).

I. 2.1. *Aspergillus terreus* :

Aspergillus terreus, également connu sous le nom d'*Aspergillus terrestris* (Nadumane et *al.*, 2016), est un champignon filamenteux omniprésent se retrouve principalement dans le sol et particulièrement dans les sols secs et chauds et aussi dans les plantes (comme endophyte) (Clémence, 2012).

I.2.1.1. Classification :

Le champignon est classé selon leur morphologie, leur diversité des types de cycle de reproduction et aussi en incluant la formation des spores sexuées différentes (Scriban, 1993 ; Madigan et Martinko, 2007). Selon Hibbett et *al.* (2007) ; Bennett (2010), *Aspergillus terreus* est un champignon qui appartient au domaine *Eucaryota*, à l'embranchement des *Ascomycota*, qui présente une reproduction sexuée avec formation des ascus contenant des ascospores, classe des *Eurotiomycètes*, et l'ordre des *Eurotiales*.

I.2.1.2. Caractères généraux :

Aspergillus terreus est une espèce thermopréférante et osmopréférante. Elle possède une bonne croissance sur les trois milieux de culture (Sabouraud, Malt et M2) à 25°C et 35°C, avec un optimum sur le milieu M2S5 à 35°C, (mais il pousse aussi à 37° C) avec un pH optimale (5 à 6). Après 3 à 5 voir 7 jours d'incubation sur le recto apparaisse des colonies à aspect veloutées

parfois floconneuses, brun sale, couleur terreuse, et sur le revers des colonies jaune à brun sale, exsudat ambré parfois abondant. Possède un mycélium poudreux blanc, qui prend une couleur cannelle alors de la sporulation, et un revers organe fonce, marron (Bioforma, 2002).

Par rapport à l'aspect microscopique, il est caractérisé par un thalle hyalin ou coloré formé de filaments mycéliens, septé et ramifié. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des conidiophores lisses, bisériés, incolores, de 0,1 à 0,25 mm (Tabuc, 2007). A son extrémité, une vésicule globuleuse portée uniquement sur hôte et une rangée de métules de 5 à 7 mm de longueur qui supporte une rangée de phialides de 5,5 à 7,5 μm de longueur, donnant naissance aux conidies elliptiques de 1,8 à 2,4 μm . L'ensemble vésicule, phialides et conidies, formant la tête conidienne bisériée, mesure entre 0,15 et 0,5 mm de diamètre (Clémence., 2012) (**Figure 02**).

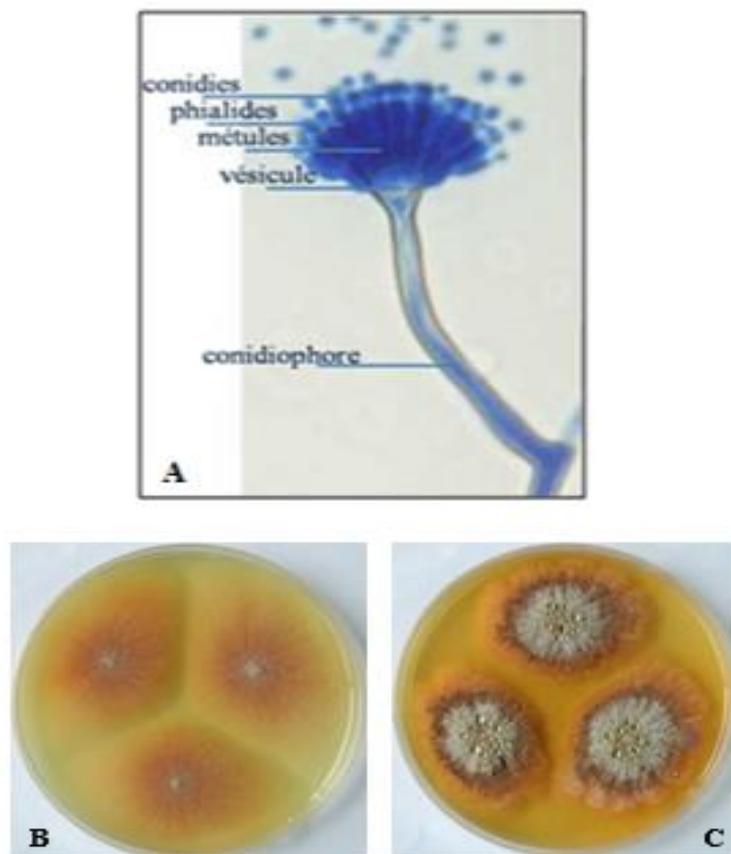


Figure 02 : Aspect microscopique et macroscopique d'*Aspergillus terreus*. **(A)** : Tête aspergillaire, **(B)** : *A. terreus* sur milieu M2, **(C)** : *A. terreus* sur milieu M2S5 (Cahagnier, 1997).

I.2.2. La production de substances antimicrobiennes par *Aspergillus terreus* :

De nombreuses substances antimicrobiennes ont été découvertes ayant des activités nouvelles pharmaceutiques et médicales, antibactériennes, antifongiques et antivirales (**Figure 03**).

A. terreus est capable de produire des puissants lipases et cellulases comme xylanase et aussi sécrète des enzymes tels que l'acide itaconique et l'acide cis-aconitique ce qui rend ce champignon attractif pour la biotechnologie blanche (Sathiya et al., 2013).

De plus, une gamme de métabolites a été extraits des cultures d'*Aspergillus terreus* parmi lesquels les territrems, aussi la Citréoveridine, l'asperfuranone et les Butyrolactones à activité antimicrobiennes, antiprolifératives et antioxydantes (Samson et al., 2011).

A. terreus produit un groupe de statine de polycétides tels que mévastatine, compactine, et notamment lovastatine, qui ont une importance thérapeutique sont utilisés pour traiter les troubles lipidiques et notamment l'hypercholestérolémie et les maladies cardiovasculaires (Nadumane, 2016).

Au cours de la dernière décennie, les AgNps ont fait l'objet d'une attention particulière en raison de la réduction de l'efficacité des antibiotiques et de leur développement contre les microbes hautement résistants et sont d'un grand intérêt en raison de leur très petite taille dans la gamme de 1 à 10 nm fixée à la surface de la membrane de la cellule *E. coli* et perturber son fonctionnement (Guangquan, 2012).

A. terreus possède la capacité de produire des nanoparticules d'argent (AgNps), qui sont des composés sphériques d'une taille de 1 à 20 nm et stabilisées dans la solution, et présente une puissante activité antifongique contre les espèces de *Candida*, qui étaient les champignons pathogènes les plus importants. De plus, les AgNps ont montré une bonne activité d'inhibition vis-à-vis de deux types de champignons filamenteux, qui étaient naturellement résistants à l'agent antifongique commun Fluconazole. Étant donné que les AgNps biosynthétisés ont montré une activité antifongique considérable, ils pourraient être largement utilisés dans des applications cliniques ainsi pourraient être considérés comme d'excellents agents antibactériens à large spectre tels que *Pseudomonas aeruginosa* (Guangquan, 2012) (**Figure 04**).

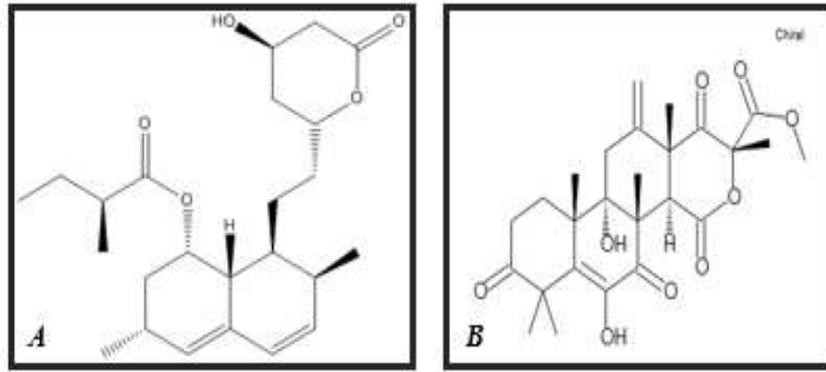


Figure 03 : Structure chimique de quelque métabolite secondaire synthétisé par *Aspergillus terreus*. (A): lovastatine, (B): terrétonine (Chun-Jun Guo, 2014).

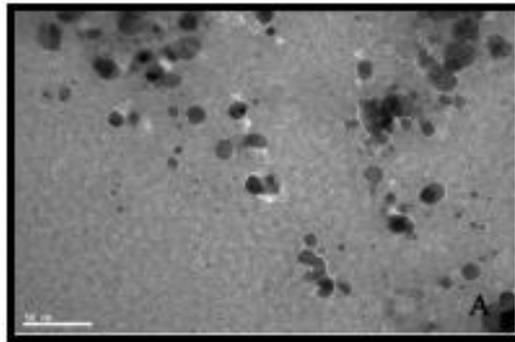


Figure 04 : Aspect d'AgNPs synthétisés par la réduction de solution d'AgNO₃ avec le filtrat cellulaire brut d'*Aspergillus terreus* (Guangquan, 2012).

I.3. Généralité sur les germes pathogènes

I.3.1. Les bactéries pathogènes

Une bactérie pathogène est une bactérie qui cause une maladie infectieuse chez les êtres humains, les animaux ou les plantes. Bien que la grande majorité des bactéries soient inoffensives ou bénéfiques, certains sont pathogènes. Elles sont l'une des causes de la mortalité infantile élevée dans les pays en développement. Il existe deux catégories de bactéries à Gram positif et à Gram négatif tels que, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aeruginosa*, (Nichiline et al., 2000) (**Figure 05**).

I.3.1.1. *Escherichia coli* :

Escherichia coli est une bactérie que l'on trouve couramment dans le tube digestif de l'être humain et des organismes à sang chaud. La plupart des souches sont inoffensives. Certaines en revanche peuvent provoquer une intoxication alimentaire grave (Farmer et al., 2017).

-Caractères généraux

Il s'agit d'un bacille Gram négatif, en forme bâtonnet, de 2 à 3 µm de diamètre, non sporulé, qui peut se déplacer au moyen de flagelles péri triches ou être non mobile. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Cette bactérie n'est pas exigeante, capable de croître dans des conditions aérobies ou anaérobies sur les milieux ordinaires tels que le milieu TSA (Trypticase-Caséine-Soja) (Abraham, 2018). Après 18-24 heures, les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, rouge ou incolore. Elle pousse sur des milieux sélectifs pour les entérobactéries types Mac Conkey, Drigalski. Sur les milieux lactosés, les colonies sont généralement lactose positive, possédant une nitrate réductase et une catalase ; et dépourvue d'oxydase et non halophile (King et al., 2008) (**Figure 05**).

-Classification:

La classification d' *E. coli* selon Bergey Manual of Systematic of Bacteriology (2012).
Domaine : Bacteria, Phylum : *Proteobacteria*, Classe : *Gamma Proteobacteria*, Ordre : Enterobacterales, Famille : *Enterobacteriaceae*, Genre : *Escherichia*.

-Pouvoir pathogène :

E. coli produit deux types d'entérotoxines : des entérotoxines thermolabiles (LT) (oligomériques) et des entérotoxines thermostables (ST) (monomériques qui sont responsables de plusieurs maladies liées à cette bactérie tels que les infections entéro-coliques, infections urinaires, toxi-infections alimentaires, des infections intra-abdominales (cholécystites, péritonites), et des septicémies (Guide, 2017).

-Résistance aux antibiotiques :

Escherichia coli est sensible de façon naturelle aux B-lactamines malgré la présence de céphalosporinase chromosomique mais la résistance acquise de ce dernier est surtout par sécrétion de pénicillinase, céphalosporinase augmentée les B-lactames à spectre étendu. Elle résiste beaucoup plus à la gentamycine, érythromycine, lincosamides ainsi qu'elle est résistante aux aminosides, les quinolones, les macrolides, les lincosamides (Hart, 2000 ; Guide, 2017).

I.3.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est un microorganisme ubiquiste se retrouve dans le sol, les eaux douces et salées, les milieux humides, et les hôpitaux (Weihni et Shouguang, 2015). Elle provoque des infections aiguës ou chroniques, parfois graves et mortelles. Elle sévit particulièrement en milieu hospitalier et expose les patients présentant un faible système immunitaire. La résistance croissante de certaines souches de cette bactérie aux antibiotiques fait de ces infections un véritable problème de santé publique (Enoch, 2004).

- Caractères généraux

P. aeruginosa est un bacille fin sous forme de bâtonnet de 1 à 5 µm de longueur et 0,5 à 1 µm de largeur Gram négatif, non sporulé, strictement aérobie (Chaker, 2012). 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 développant une odeur caractéristique en fleur de seringia (Clave, 2011).

Selon Denis (2007) trois types de colonies peuvent être observées simultanément ou de manière isolée sur milieux solides :

- Colonies larges 'la' sont grande et à bord irrégulier rugueuses une partie centrale bombée 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.

Elle possède un métabolisme respiratoire strict et possède l'oxydase positive (+) cette bactérie ne fermentent pas le glucose.

Ce type de bactéries synthétise deux types principaux de pigments : Pyocyanine (bleu phénazine) et Pyoverdine (jaune vert) (Percival, 2004) (**Figure 05**).

-Classification

La classification de *P. aeruginosa* selon Palleroni, (2008). Domaine: Bacteria, Phylum: *Proteobacteria*, Classe: *Gamma Proteobacteria*, Ordre: *Pseudomonadales*, Famille: *Pseudomonadaceae*, Genre: *Pseudomonas*.

- Pouvoir pathogène

C'est un pathogène nosocomial majeur, provoque de nombreuses infections chroniques qui induisent à plusieurs troubles chez les immunocompétents les individus tels que : la pneumonie, le choc septique, les infections des voies urinaires, infections gastro-intestinales, infections de la peau et des tissus mous dans les fibroses, neutropénique, nourrissons prématurés, brûlés et patients immunodéprimés (Francois, 2010).

Les infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont observées à divers stades y compris l'attachement et la colonisation, l'invasion locale et disséminée infection systémique. La plupart des infections à *Pseudomonas aeruginosa* sont invasifs, toxicogènes et multirésistantes (MDR), qui conduisent aux infections hospitalières générales chez les patients immunodéprimés et souvent se superposent à des troubles aigus ou chroniques (Gellatly et al., 2013).

-Résistance aux antibiotiques

P. aeruginosa est une bactérie multirésistante à cause de la résistance naturelle à plusieurs classes d'antibiotiques tels que l'aminopénicilline, les céphalosporines de 1^{ère} et 2^{ème} génération, ciprofloxacine, canamycine, chloramphénicol, céfotaxime, triméthoprime (Banerjee et al., 2000 ; Poole, 2004). Une résistance acquise est observée par divers mécanismes tels que les fluoroquinolones les B-lactamines (Bouskraoui et al. 2017).

I.3.1.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, parfois appelé Staphylocoque doré est l'espèce la plus pathogène du genre *Staphylococcus*. C'est une bactérie ubiquitaire présent à l'état commensale sur la peau, les muqueuses..., mais peut aussi se trouver dans l'environnement naturel (sol, eau douce, air ...) (Noël Joffin, 2006).

-Caractères

Staphylococcus aureus est une coque à coloration de Gram positive en amas, mesure de 0.5 à 1 µm de diamètre, a sporulé, immobile, ne possède pas de capsule. Les cellules sont regroupées en amas (grappe de raisin) en tétrade ou en diplocoques. Elle est peu exigeante et peuvent être isolée en bouillon ou sur des milieux solides simples tels que les géloses ordinaires ou gélose au sang (Guide, 2017).

S. aureus est un germe aéro-anaérobie facultatif capable de produire la catalase, la 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 a la capacité de réduire les nitrates en nitrites (Loire et Gautiere, 2010 ; Grace et Fesch, 2018). Certaines souches de cette espèce produisent des entérotoxines staphylococciques (Guide, 2017).

-Classification

La classification de *S. aureus* selon Chua et *al.* (2010). Domaine: Bacteria, Phylum: *Firmicutes*, Classe: *Bacilli*, Ordre: *Bacillales*, Famille: *Staphylococcaceae*, Genre: *Staphylococcus*.

-Pouvoir pathogène

S. aureus est un pathogène opportuniste qui peut causer divers maladies chez l'homme tels que les infections suppuratives superficielles ou profondes qui touche la peau, le tractus respiratoire, le tractus urinaires, les valves cardiaques etc. Les toxi-infections résultant de la consommation d'aliments contaminés par des toxines provoque des diarrhées, vomissement voir l'infection grave comme la pneumonie (Guide, 2017).

-Résistance aux antibiotiques

De nombreuses souches de *Staphylococcus aureus* deviennent de plus en plus résistantes à de nombreuses classes d'antibiotiques. Les souches résistantes à la méthicilline (SARM) sont de fréquentes causes d'infections nosocomiales (Ahamogbe, 2014). Une augmentation de la résistance à la vancomycine est signalée dans de nombreux hôpitaux, ainsi à l'acide nalidixique et développé une résistance acquise aux fluoroquinolones et les aminosides, les macrolides (Eisenstein et *al.*, 2008 ; Guide, 2017). La figure suivant montre l'aspect microscopique des trois bactéries pathogènes.

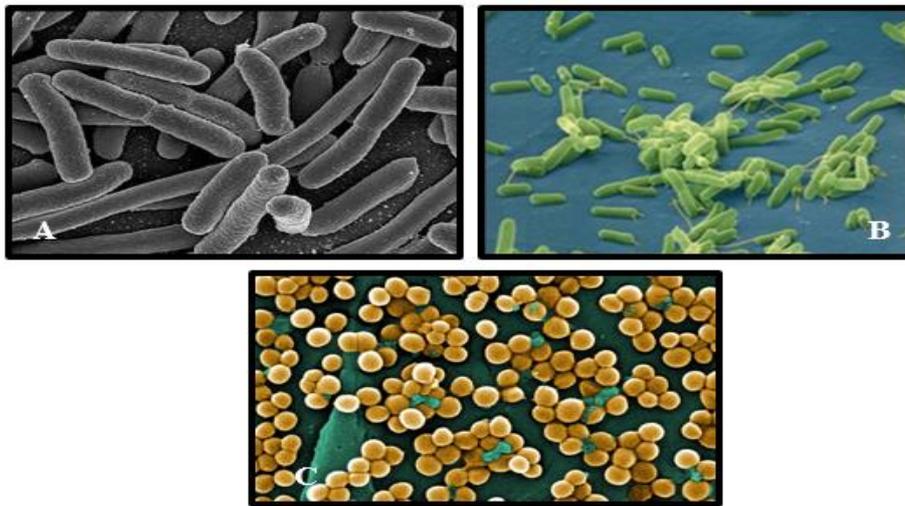


Figure 05 : Aspect microscopique de trois bactéries tests. (A) : *Escherichia. coli* (Chandana, 2015), (B) : *Pseudomonas aeruginosa* (Luca, 2013), (C) : *Staphylococcus aureus* (Janice, 2019).

I.3.2. 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 de 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 (Brown et al., 2012). Parmi les différentes espèces de champignons, *Candida albicans* est impliquée dans plus de la moitié des candidoses et est toujours considérée comme agent pathogène majeur (Carlo, 2018).

I.3.2.1. *Candida albicans* :

Candida albicans est un microorganisme commensal qui fait partie des flores microbiennes endogènes gastro-intestinale, oropharyngée et génitale féminine. Mais, peut aussi être isolée de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante, atmosphère, eau...) (Rayan, 2004).

-Caractères généraux

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie, diploïde. Cette levure peut mesurer de 2 à 5 µm, et caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. Se reproduit de façon asexuée par bourgeonnement (David, 2016).

Candida albicans peut basculer entre deux morphologies : la forme blastospore (levure bourgeonnante) et filamenteuse (hyphes et pseudohyphes) (Fu et al., 2002).

Les colonies apparaissent de 48 à 72 heures après la mise en culture à 37 °C sur un milieu d'isolement des champignons, par exemple sur une gélose Sabouraud (Rayan, 2004).

- Classification

La classification de *Candida albicans* selon Krick et al. (2008). Domaine: *Eucaryota*, Phylum: *Ascomycota*, Sous phylum: *Saccharomycotina* Classe: *Saccharomycetes*, Ordre: *Saccharomycetales*, Genre: *Candida*.

-Pouvoir pathogène

Elle peut basculer de l'état commensal vers l'état parasitaire dans des conditions favorables. La manifestation clinique la plus fréquente de l'infection à *C. albicans* est la candidose buccale, candidose vaginale, candidose œsophagienne, candidose mucocutanée chronique. *Candida albicans* peut aussi entraîner des infections des ongles (paronychiée et

onychomycose à *Candida*), des atteintes superficielles des muqueuses, des infections cutanées consécutives à une macération de la peau et des infections oculaires (Rayan, 2004).

-Résistance aux antifongiques :

La résistance de *C. albicans* au fluconazole a été associée à l'usage répété de ce médicament, notamment chez les patients immunodéprimés à qui il est administré à titre de prophylaxie chronique. Une résistance aux échinocandines a aussi été décrite ainsi à l'Amphotéricin B par mutation (Pfaller et *al.*, 2013).

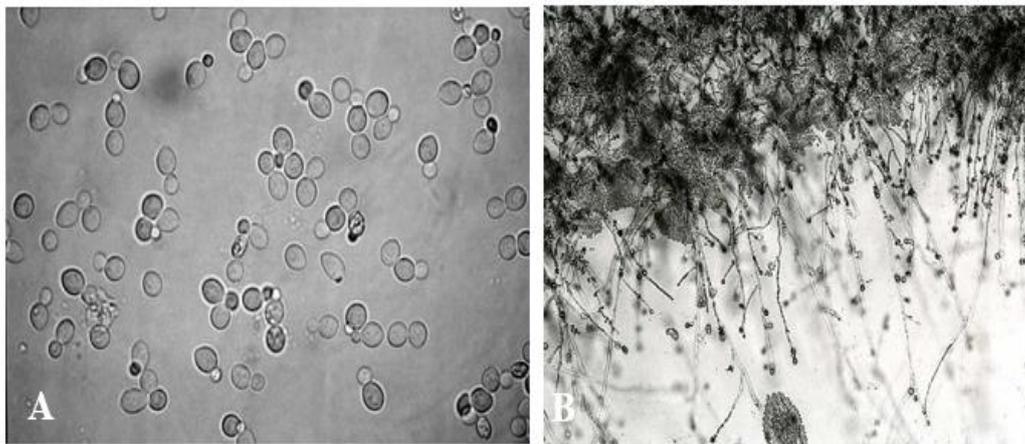


Figure 06 : Aspect microscopique de *Candida albicans*. **(A) :** *Candida* bourgeon, **(B) :** *Candida* mycélium (Alexandrine et Alain, 2020).

CHAPITRE II

Matériels et Méthodes

II. Matériel et Méthodes :

Notre travail a été porté sur la recherche de l'activité antimicrobienne de trois souches fongiques d'*Aspergillus terreus* confrontées à quatre microorganismes multirésistants dont trois bactéries : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, et une levure *Candida albicans*. Les manipulations ont été réalisées au niveau du laboratoire de phytopathologie et du laboratoire de génie chimique (Université Blida 1), et du laboratoire central de l'hôpital de Koléa (Wilaya de Tipaza).

II.1. Matériel :

II.1.1. Matériel biologique :

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

Les trois souches fongiques étudiées appartiennent à la collection du laboratoire de phytopathologie (Département de Biotechnologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie), isolées par Mohamed Mahmoud (Mohamed Mahmoud et *al.*, 2017) (**Tableau 02**) (**Figure 07**).

Tableau 02 : Origine des champignons utilisés

Souches fongiques	Nom Scientifique	Plante d'origine	Région	Source
T1172	<i>Aspergillus terreus</i>	La partie racinaire du Palmier dattier	Palmeraies d'Adrar (Algérie)	Collection du laboratoire de Phytopathologie université Blida 1
T2257				
B1283				

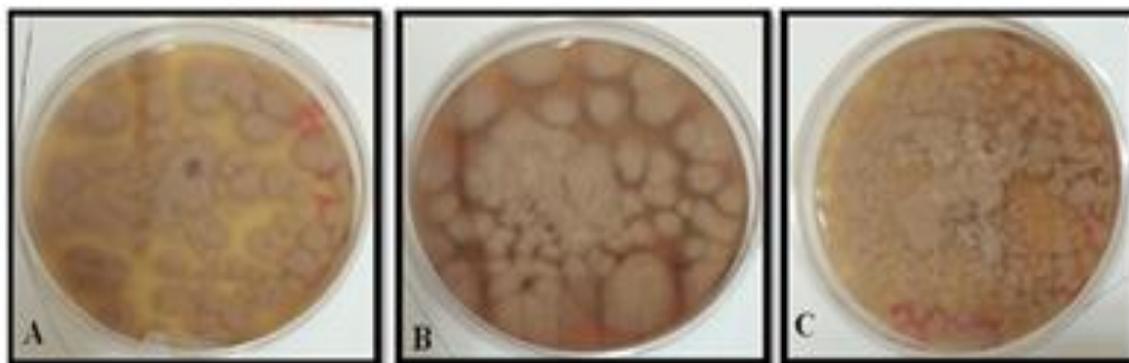


Figure 07 : Les souches d'*Aspergillus terreus*. (A) : B1283 ; (B) : T1172 ; (C) : T2257.

II.1.1.2 .Les souches bactériennes et fongiques testées :

Les souches utilisées sont des souches de la collection du laboratoire centrale de l'hôpital de Koléa (Wilaya de Tipaza). Elles sont constituées de deux bactéries à Gram – (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), et une bactérie à Gram + (*Staphylococcus aureus*). Ainsi qu'une levure *Candida albicans*.

II.1.2. Matériel non biologiques

Le matériel non biologique utilisé, milieux de culture (PDA, PDB), les produits chimiques sont représentés dans les annexes (**Annexe 01**).

II.2. Méthodes :

II.2.1. Régénération et purification des souches d'*Aspergillus terreus* :

La régénération et la purification des souches fongiques ont été réalisées sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar) (Jonsthor et Booth, 1983), par repiquage successifs des disques mycéliens à partir des cultures conservées de chaque souche d'*Aspergillus terreus* et les boîtes sont incubées par la suite à une température de 28° C pendant 7 jours (**Figure 08**).

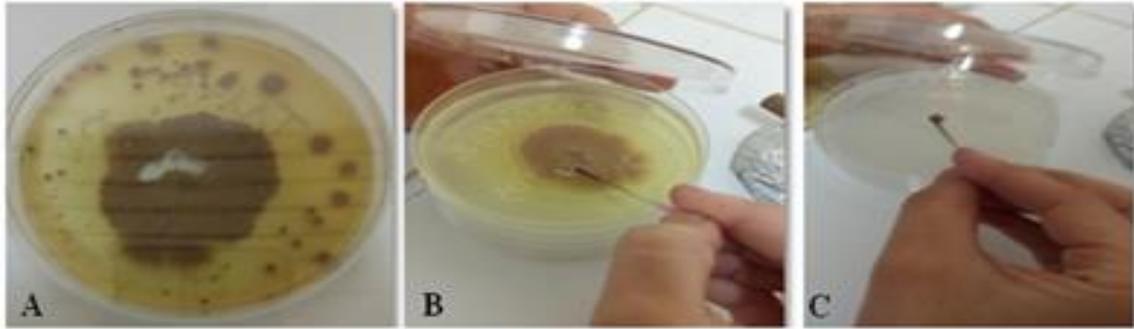


Figure 08 : Les étapes de régénération et purifications des trois souches d'*Aspergillus terreus*. (A) : la souche testée, (B) : prélèvement d'un fragment du mycélium, (C) : dépôt de fragment à la surface du milieu PDA.

II.2.2. Caractérisation morphologique des souches fongiques étudiées :

L'identification d'une souche fongique est basée sur l'observation macroscopique (la couleur et l'aspect des colonies, ainsi que la présence des pigments diffusibles dans le milieu) et l'observation microscopique du mycélium, des spores, et des fructifications. Dans cette dernière étape, un petit fragment d'une colonie est prélevé à l'aide d'une aiguille et déposé et écrasé sur une lame en présence d'une goutte d'eau distillée stérile et recouverte par la suite d'une lamelle. L'observation microscopique est effectuée au microscope optique au grossissement X32.

II.2.3. Etude morphologique des souches microbiennes

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

II.2.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de trois souches fongiques est déterminée en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition. Pour évaluer cette activité, trois techniques ont été choisies : technique des cylindres d'agar (contacte directe entre le champignon et le microorganisme), deux techniques des disques et technique des puits (l'extrait brut et le filtrat brut (nanoparticules)).

II.2.4.1. Préparations de l'inoculum :

L'inoculum doit être réalisé à partir des colonies jeunes âgées de 18 à 24 heures, en phase de croissance exponentielle. Préparation d'une suspension (bactérie ou levure) de 0,5 Mac Ferland équivalente à 10^6 UFC/ml, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile prendre une colonie et

la dissocier dans 2 ml d'eau distillée, puis ensemencer la suspension sur le milieu Mueller Hinton par écouvillonnage.

II. 2.4.2. Technique des cylindres d'agar :

Selon Mohamed Mahmoud et *al.* (2017), les cylindres d'agar de 6mm ont été perforés à l'aide d'un emporte pièces à partir des boites contenant les cultures d'*Aspergillus terreus* puis disposés à la surface de milieu MH et incubés à 37°C. Après deux jours d'incubation, les boites ont été ensemencées par écouvillonnage par les souches testées (bactérie ou levure) selon la technique du NCCLS (National Comitée for Clinical Laboratory Standard). Les zones d'inhibition autour des blocs de champignons indiquant l'activité antimicrobienne ont été mesurées et enregistrées à l'aide d'un pied à coulisse.

II. 2.4.3. Technique des disques et des puits :

Ces deux techniques consistent à déterminer l'effet des substances antimicrobiennes synthétisées par les souches fongiques (T1172, T2257, B1283) diffusées dans un milieu de fermentation liquide.

II. 2.4.3.1. Fermentation et extraction de substances antimicrobiennes :

-Fermentation et extraction d'extraits bruts

Des flacons de 250 ml contenant 100 ml de milieu PDB (Potato Dextrose Broth), ont été inoculés par 15 disques de culture fongique de 7 jours à raison de 5 répétitions pour chaque souche d'*Aspergillus terreus*. Les flacons sont recouverts par papier aluminium puis incubés à la température ambiante en agitation continue pendant 10 à 15 jours selon (Xiaoling et *al.*, 2010) (**Figure 09**).

-Filtration et centrifugation du filtrat de culture :

Après 15 jours d'incubation le contenu des 5 flacons de chaque souche est filtrée selon deux étapes : l'utilisation d'une mèche à gaz (compresse) pour éliminer les disques (spores) ensuite continuer la filtration de liquide par du papier filtre stérile (papier Wattmen), pour séparer le mycélium du bouillon de culture ; puis déposer les filtrats de culture dans des tubes stériles pour les centrifuger à 1500 tour pendant 20 min afin de récupérer le surnageant (Madki et *al.*, 2010) (**Figure 10**).

-Extraction par deux solvants organiques :

Les substances antimicrobiennes ont été extraites par l'utilisation de deux solvants organiques (acétate d'éthyle et le chloroforme). Le filtrat a été divisé en deux, pour chaque filtrat un volume égale du solvant acétate d'éthyle ou chloroforme a été ajouté, ensuite le tout a été agité pendant 30 minutes pour avoir la séparation des substances antimicrobiennes. Dans des ampoules à décanter, le mélange a été transvasé pour séparer les deux phases : la phase organique et la phase inorganique pendant un temps de 24 heures (**Figure 11**).

-Evaporation et récupération de l'extrait brut :

Les phases organiques récupérés sont évaporés sous pressions à l'aide d'un évaporateur rotative (Rotavapeur du type BUCHI) à 45°C pour obtenir les extraits bruts qui sont séchés et conservés à 4°C dans des boites de Pétri en vers stériles recouvertent par du papier aluminium pour éviter leurs dénaturations (Oliveira et *al.*, 2009) (**Figure 12**).

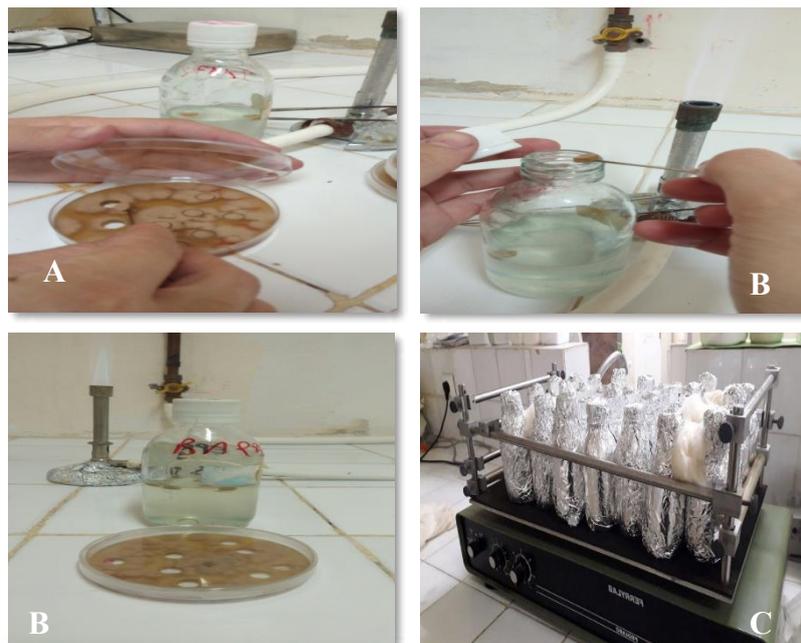


Figure 09 : Les étapes de préparation des extraits fongiques nécessaires pour la synthèse des substances antimicrobiennes. **(A) :** les disques mycéliens ; **(B) :** Dépôt des disques mycéliens dans le milieu PDB ; **(C) :** Flacons déposés dans l'agitateur horizontale.



Figure 10 : Les étapes de filtration. **(A) :** Filtration par mèches à gaz, **(B) :** Deuxième filtration par papier Wattman, **(C) :** tubes contenant filtrats de culture, **(D) :** Centrifugation des tubes.

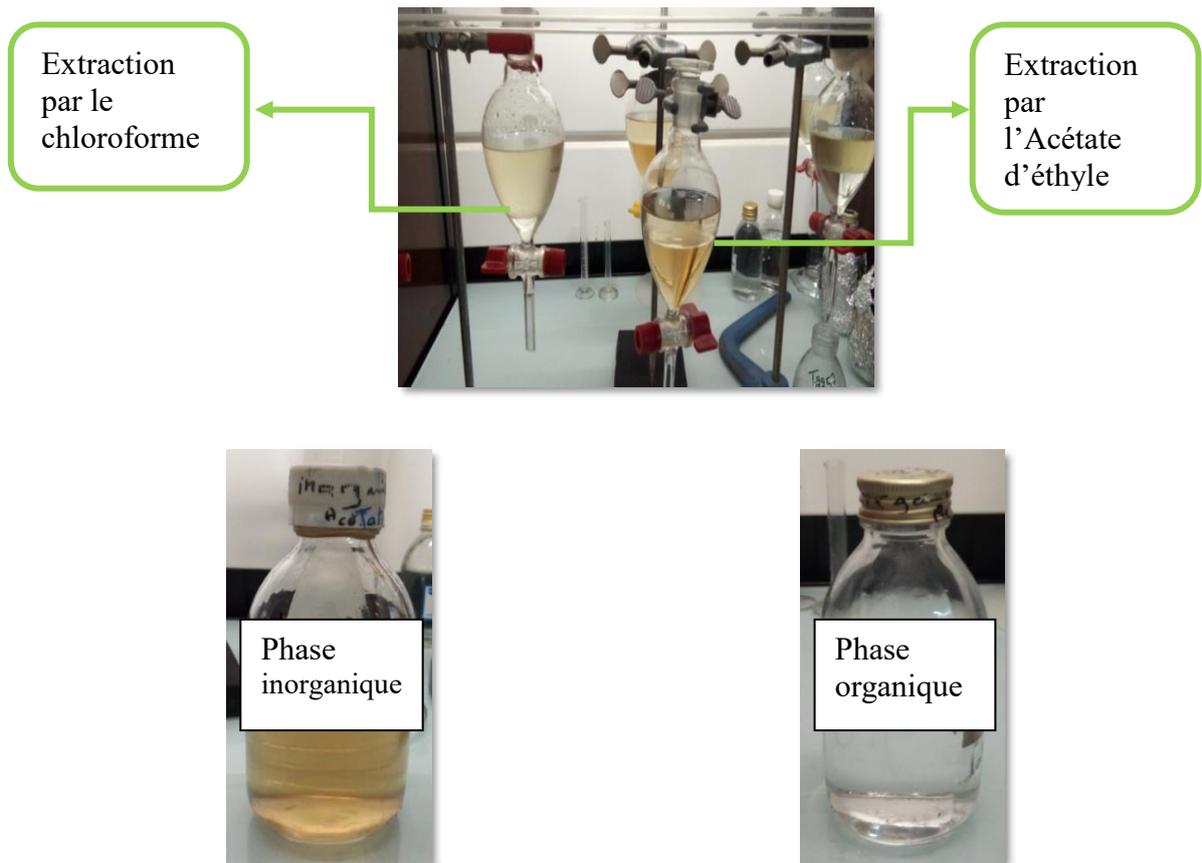


Figure 11 : Séparation de mélange (Extrait +solvant) par décantation (la phase organique est transparente et la phase inorganique est jaune).

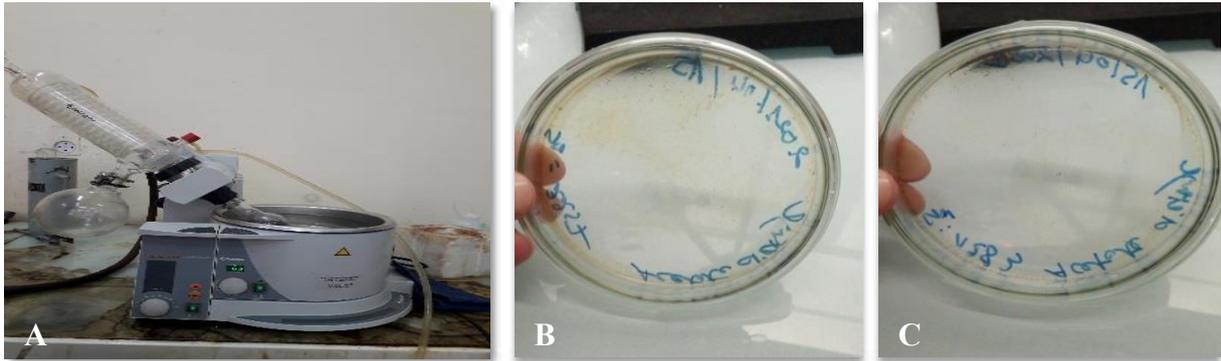


Figure 12 : Récupération l'extrait brut. **(A)** : Concentration de la phase organique par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (Rotavapeur du type BÜCHI). **(B)** : Extrait brut de chloroforme. **(C)** : Extrait brut de l'acétate d'éthyle.

-Fermentation et révélation de la présence des nanoparticules :

La détection de la présence des nanoparticules dans un échantillon biologique (Filtrat brut) est réalisée par différentes étapes (**Figure 13**). Des flacons de 250 ml contenant 100 ml du milieu PDB ont été inoculés par 8 disques de cultures fongiques âgées de 7 jours pour chaque souche d'*Aspergillus terreus*. Les flacons sont recouverts par du papier aluminium et incubées par la suite à une température ambiante avec une agitation continue pendant 96 heures (4 jours).

-Filtration de bouillon de culture :

Les 3 flacons sont filtrés par l'utilisation des microfiltres de 0,22 μm et le filtrat est déposé dans des tubes stériles de 10 ml.

-Détection de la présence des nanoparticules dans les filtrats de cultures

Pour détecter la présence des nanoparticules deux méthodes ont été utilisées

- Méthode de diffusion dynamique de la lumière ou Dynamic Light Scattering (DLS)

Les filtrats de cultures ont été déposés dans une cuve en quartz. Un analyseur de nanoparticules (HORIBA Scientific Nanopartical SZ-100) est utilisé pour les tests. La série SZ-100 mesure le diamètre des particules puis la lecture a été faite à l'aide d'un logiciel. Cette méthode de spectroscopie à corrélation des photos qui permis la détection et détermination de la valeur des nanoparticules présents dans les filtrats de cultures (Harika et al., 2017).

-Méthode colorimétrique

5 ml du chaque filtrat de culture a été mélangé avec 1 ml de solution AgNO_3 (10 mmol) dans des tubes, qui sont incubés par la suite à 28°C dans l'obscurité pendant 24 heures, 48 heures, 72 heures et même jusqu'à une semaine, puis toutes ces réactions ont été analyse suivies par spectroscopie UV-visible (HOTICHA) à longueur d'onde 440 nm (Guangquan et *al.*, 2012).

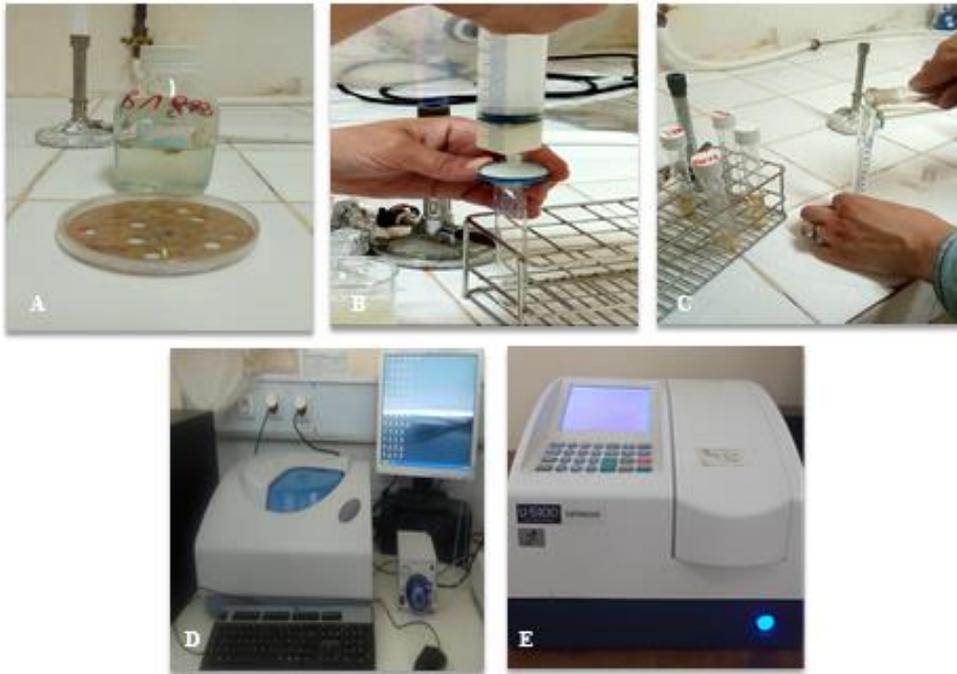


Figure 13 : Les étapes de la détection de la présence des nanoparticules dans les trois filtrats de cultures *d'Aspergillus terreus*. **(A)** : Fermentation, **(B)** : Filtration des bouillons de cultures par des microfiltres de $0,22\ \mu\text{m}$ de diamètre, **(C)** : Dépôt des filtrats de cultures dans des tubes stériles, **(D)** : Détection de la présence des nanoparticules par DLS, **(E)** : absorbance des AgNPs par spectrophotométrie UV-visible.

II. 2.4.3.2. Technique des disques :

Dans cette technique, l'extrait brut et le filtrat brut ont été testés.

-Technique des disques de l'extrait brut et du filtrat brut (nanoparticules) :

Un écouvillon stérile trempé dans la suspension (bactérie ou levure) a servi pour ensemercer le milieu Mueller Hinton. Après séchage de la surface de la boîte pendant 5 min. trois disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman l'un imbibé avec 10 µl l'extrait brut chloroforme, l'autre imbibé avec 10 µl l'extrait brut acétate d'éthyle, et le troisième est imbibé avec 10 µl de filtrat brut (nanoparticules totales) et 10 µl AgNO₃ plus filtrat brut (AgNPs), puis les disques sont séchés et déposés à la surface des boîtes contenant les suspensions microbiennes testées (**Figure 14**). Ces dernières, sont incubées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2 heures pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives puis sont placées pour incubation dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures (Hazline et *al.*, 2009). Les témoins positifs dans le cas des cultures microbiennes étaient représentés par trois antibiotiques, amoxicilline (AX10), céftriaxone (CTR30), tobramycine (TOB10), ont été déposées et incubées pendant 24 heures. Après incubation la lecture a été réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibitions, qui sont représentées par une auréole formée autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse.

II. 2.4.3.3. Technique des puits :

Des boîtes de Pétri contenant une couche de gélose de Mueller Hinton d'une épaisseur de 4 mm, sontensemencées avec les souches testées, après séchage de la surface de la boîte pendant 5min, la gélose est perforée avec un cylindre de 3 mm de diamètre. Les puits sont remplis avec 10 µl du filtrat brut (nanoparticules) ou 10 µl du filtrat brut plus AgNO₃ (nanoparticules d'argents). Les boîtes sont laissées à la température ambiante pendant 30 minutes puis incubées à 37° C pendant 18 à 24 heures (Tortorano et *al.*, 1979) (**Figure 14**). Après incubation la lecture a été réalisée en mesurant les diamètres des zones d'inhibitions, qui sont représentées par une auréole formée autour de chaque puits à l'aide d'un pied à coulisse.

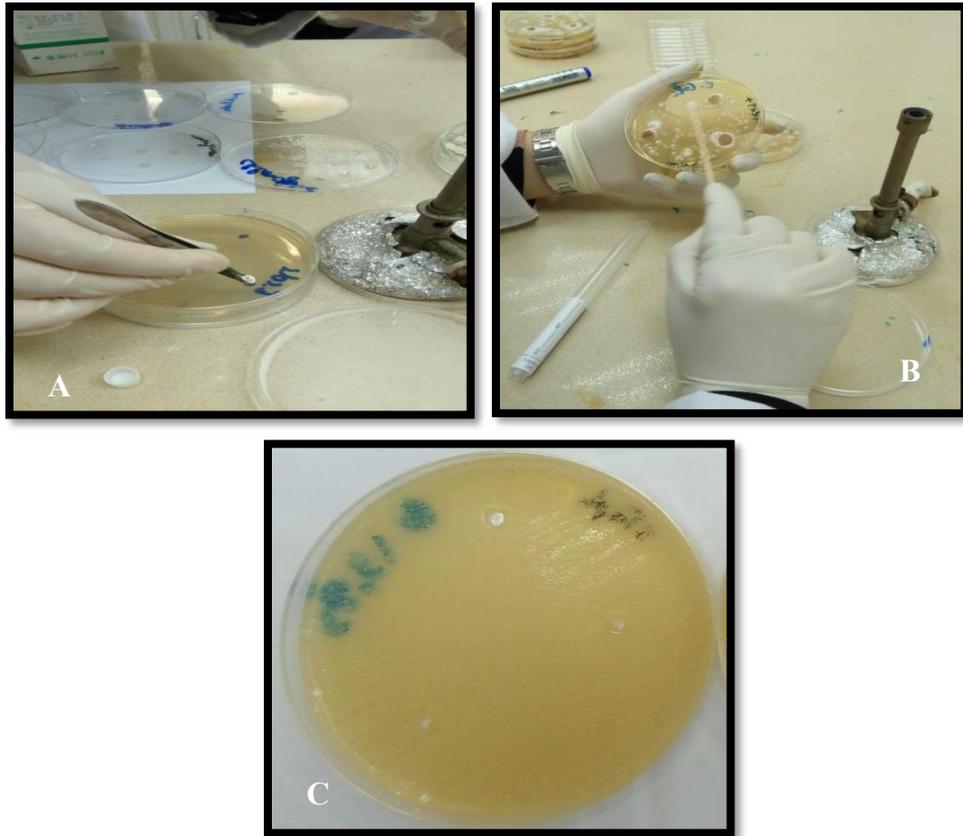


Figure 14 : Les trois techniques utilisées. **(A)** : technique des disques, **(B)** : technique des cylindres d'agar et **(C)** : technique des puits.

CHAPITRE III

Résultats et Discussion

III. Résultat et discussion :

L'activité antimicrobienne recherchée chez les souches d'*Aspergillus terreus* a montré que les trois souches ont une activité antimicrobienne, qui dépend des souches utilisées ainsi que des méthodes testées.

III.1. Caractérisation morphologiques des souches d'*Aspergillus terreus* :

Selon L'observation macroscopique des cultures fongiques a été effectuée après 7 jours d'incubation. Il a été constaté que les trois souches se développent d'une manière plus ou moins lente, présentant un centre élevé, couleur brune et une texture duveteuse et poudreuse. L'observation microscopique a révélé que le thalle mycélien est sépté, les conidiophores sont dressés, la tête conidienne est bisériée en colonnes, et les spores sont lisses et globuleuses (Pitt et Hocking, 1985 ; Botton *et al.*, 1990 ; Champion, 1997) (**Figure 15**).

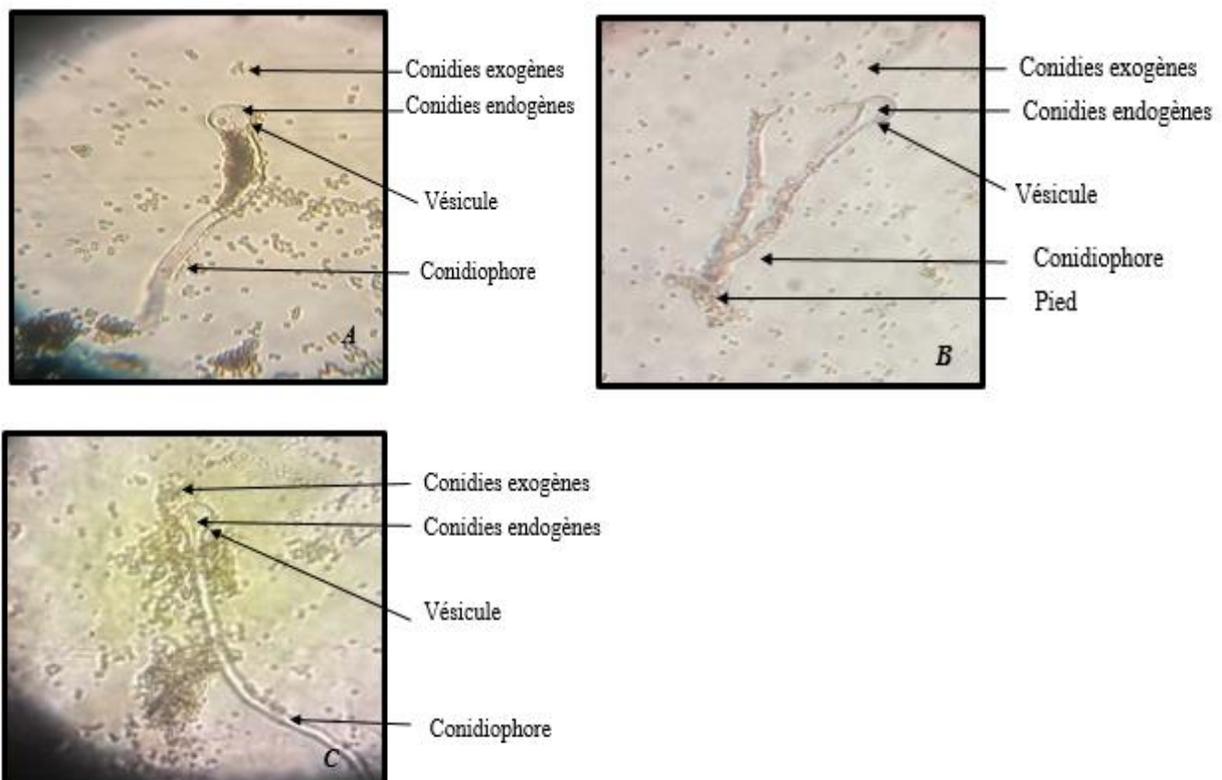


Figure 15 : Aspect microscopique des trois souches d'*Aspergillus terreus*, au grossissement X32. (A) : T2257, (B) : B1283, et (C) : T1172.

III.2. Etude morphologique des souches microbiennes

L'observation macroscopique des cultures bactériennes a été effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C sur des milieux sélectifs. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température d'incubation. Des colonies vertes sur milieu Hektoen caractéristique des espèces bactériennes d'*Escherichia coli*. Des colonies pigmentées en vert pâle sur gélose nutritive, sont présomptives de *Pseudomonas aeruginosa*. Des colonies jaunes entourées d'une zone jaune, mannitol (+) sur le milieu Chapman, sont des *Staphylococcus aureus*. Des petites colonies vertes sur milieu gélose nutritive caractéristique de *Candida albicans*.

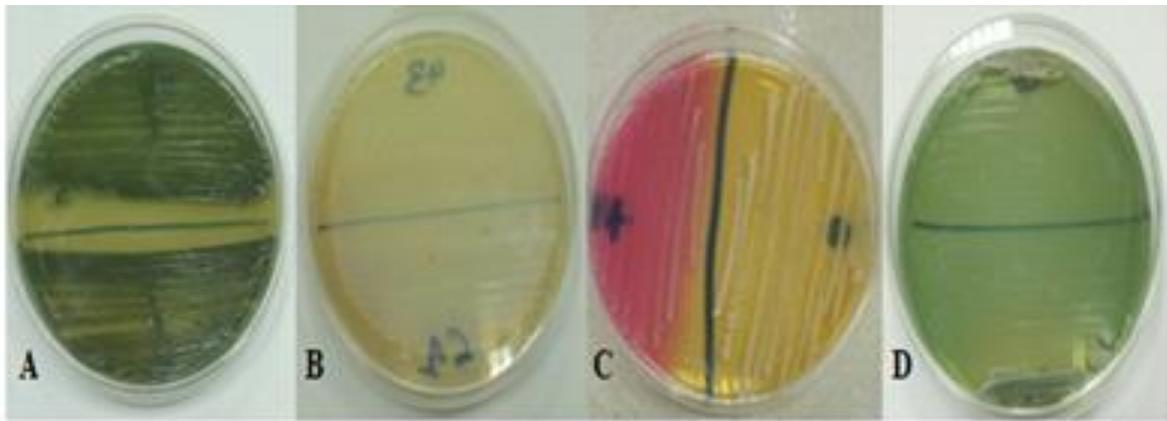


Figure 16 : Les souches testées. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

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

Les trois souches d'*Aspergillus terreus* ont été étudiées pour rechercher leur activité antimicrobienne. Pour cela trois techniques ont été utilisées : la technique des cylindres d'agar ainsi que les techniques des disques et des puits.

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

L'apparition d'une zone claire autour des cylindres d'agar permet, après incubation, montré la présence des métabolites fongiques qui inhibent la croissance de la levure et les bactéries testées, , en revanche l'absence de cette zone et la bonne croissance des souches d'*Aspergillus terreus* qui est observée par un envahissement complet de la boîte de Pétri explique qu'il y'a une activité d'antagoniste exercée par ces souches et exprimé par un phénomène de compétition vis-à-vis de l'espace et des nutriments (**Figure 18, 19, et 20**).

Les trois souches d'*Aspergillus terreus* présentent une faible activité antimicrobienne. La zone d'inhibition la plus élevée 11 mm a été constaté en présence de la souche T1172 à l'encontre de *Candida albicans* et la zone d'inhibition la plus faible 3 mm a été constaté dans le cas de la souche T2257 contre *Staphylococcus aureus*.

Les souches T1172 et B1283 ne montrées aucun effet sur la souche *Staphylococcus aureus*. La souche B1283 a exercé une zone d'inhibition de 4 mm à l'encontre de la souche *Candida albicans* alors que la souche T2257 n'a montré aucun effet sur cette même souche. Une zone d'inhibition de 4 mm a été constatée en présence de la souche T1172 contre la souche *E.coli*, cependant aucun effet n'a été exercé par les souches T2257 et B1283.

Les trois souches d'*Aspergillus terreus* ne montrées aucun effet après la confrontation avec la souche de *Pseudomonas aeruginosa*.

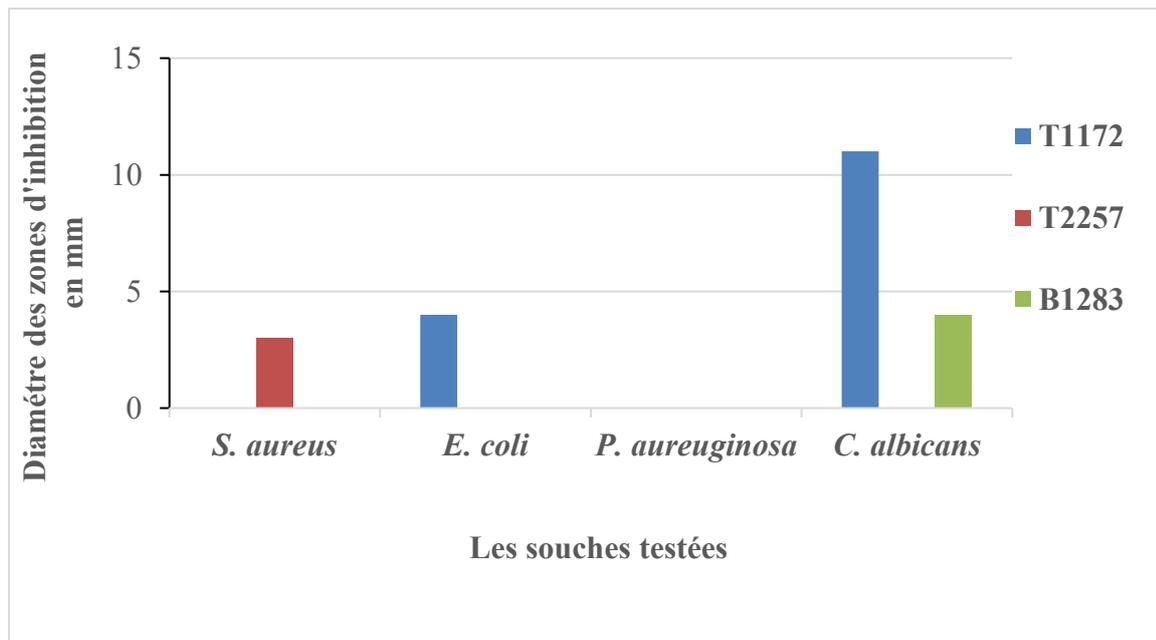


Figure 17 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les trois souches d'*Aspergillus terreus* contre les souches microbiennes testées (technique des cylindres d'agar).

La souche T2257 a exercé un effet plus important de compétition trophique et même de l'espace à l'encontre de *Candida* par rapport aux autres, cependant en présence des autres souches les deux phénomènes ont été observé compétition et antibiose (figure 18).

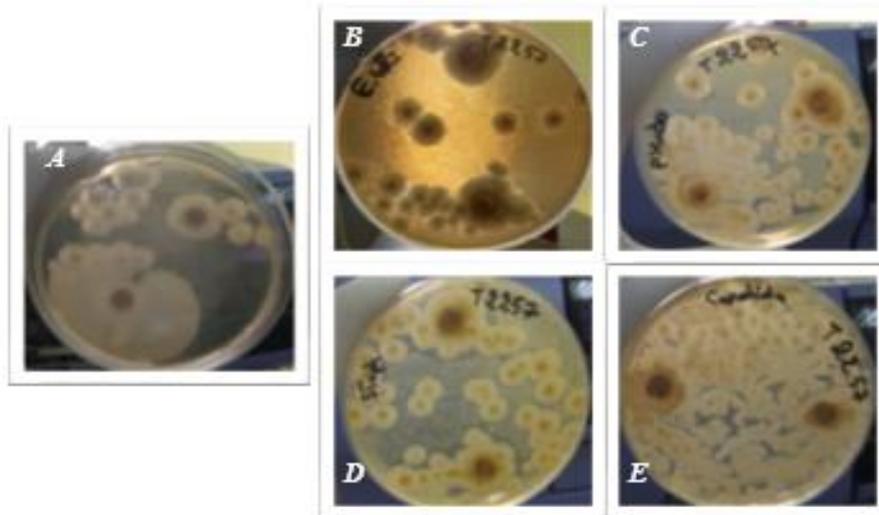


Figure 18 : Activités antimicrobiennes de la souche T2257 déterminées par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : T2257/ *Escherichia coli*, (C) : T2257/ *Pseudomonas aeruginosa*, (D) : T2257/ *Staphylococcus aureus*, (E) : T2257/ *Candida albicans*.

La souche T1172 a montré un phénomène peut être d'antibiose à l'encontre de *Candida* et *E. coli* et un phénomène de compétition en présence de *Staphylococcus aureus*, alors qu'aucun effet n'a été constaté contre *P. aeruginosa* (figure 19).

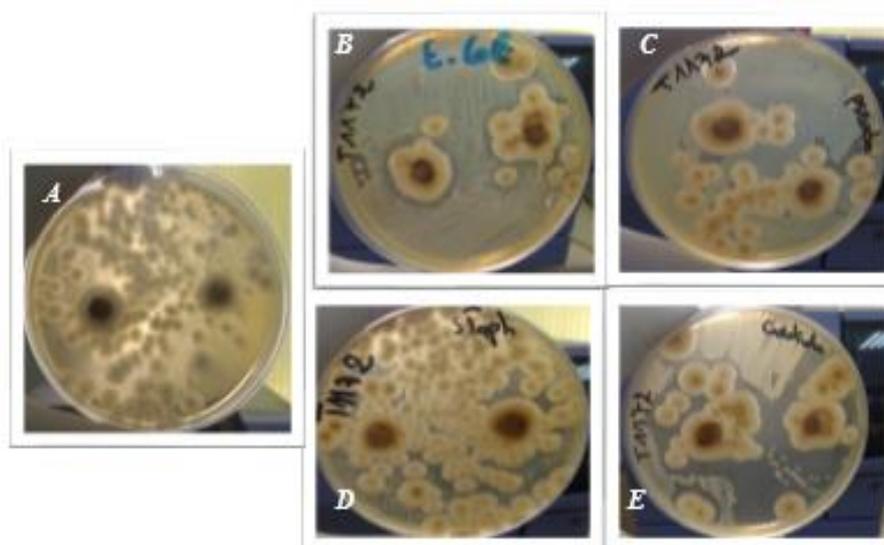


Figure 19 : Activités antimicrobiennes de la souche T1172 déterminée par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : T1172/ *Escherichia coli*, (C) : T1172/ *Pseudomonas aeruginosa*, (D) : T1172/ *Staphylococcus aureus*, (E) : T1172/ *Candida albicans*.

La souche B1283 a réagi par un phénomène de compétition en présence de *Pseudomonas* et *E. coli* et par antibiose à l'encontre de *Candida* et *Staphylococcus* (figure 20).

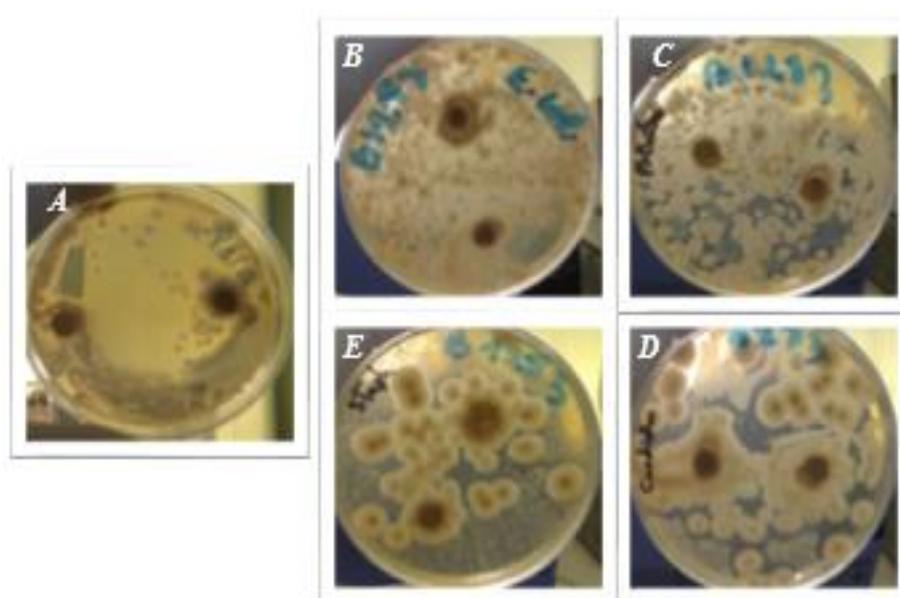


Figure 20 : Activités antimicrobiennes de la souche B1283 déterminée par la technique des cylindres d'agar. (A) : Témoin négatif, (B) : B1283/ *Escherichia coli*, (C) : B1283/ *Pseudomonas aeruginosa*, (D) : B1283/ *Staphylococcus aureus*, (E) : B1283/ *Candida albicans*.

III.3.2. Techniques des disques et des puits :

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

III.3.2.1. Fermentation et extraction des substances antimicrobiennes

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

-Fermentation et extraction d'extraits bruts

Deux solvants organiques ont été utilisées pour extraire les substances antimicrobiennes dans le surnageant : il s'agit de chloroforme et de l'acétate d'éthyle (**Tableau 03**). Selon le

tableau le rendement été plus important en présence de l'acétate d'éthyle pour T1172 et B1283 par rapport à T2257.

Tableau 03 : Comparaison poids des extraits bruts des souches d'*Aspergillus terreus*.

souches	Solvant	
	L'acétate d'éthyle	chloroforme
T1172	1,41g	0,67g
T2257	0,96g	1,23g
B1283	1,21g	0,03g

La méthode de calcul des poids des extraits bruts :

$$\text{PEB} = \text{PT} - \text{P}$$

PEB : poids d'extrait brut

PT : poids totale (boit + l'extrait brut)

P : poids de boîte pétrie vide

-Fermentation et révélation de la présence des nanoparticules

La révélation de la présence des nanoparticules dans les trois filtrats bruts des souches d'*Aspergillus terreus* a été réalisé par deux méthodes ; la diffusion dynamique de la lumière et la méthode colorimétrique.

-Méthode de diffusion dynamique de la lumière ou Dynamic Ligh Scattering (DLS) :

L'analyse par DLS a révélé la présence des nanoparticules avec des tailles différentes en apport avec les souches d'*Aspergillus terreus*. D'après les résultats, la taille des nanoparticules varie entre 96,5 nm et 178,3 nm (**Tableau 04**).

Tableau 04 : La taille des nanoparticules présent dans les filtrats de culture des trois souches d'*Aspergillus terreus*.

Souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	Taille des nanoparticules (nm)
T1172	96,65nm
T2257	160,05nm
B1283	178,3nm

-Méthode colorimétrique

Après l'ajout d'une solution d'AgNO₃, la couleur du filtrat de culture brut d'A. terreus est passé du jaune clair au brun en quelques heures, alors qu'aucun changement de couleur n'a été observé dans le surnageant de culture sans AgNO₃ (figure 21). Ainsi, le changement de couleur de la solution indique clairement la formation d'AgNPs. Ce qui explique que les particules étaient bien dispersées dans la solution et qu'il n'y avait pas d'agrégation évidente.

Pour prouver la présence d'argent élémentaire des solutions colloïdales d'AgNPs dans les tubes qui ont révélé une coloration, des analyses par DLS et par spectroscopie ultraviolette visible à une longueur d'onde de 440 nm ont été réalisées (tableau 05). D'après les résultats de DLS, la taille des nanoparticules d'argent est intermédiaire entre 12,75 et 64,05 nm. Les spectres UV sont variables entre 0,253 et 2,061. Le changement de couleur a été surveillé visuellement et l'absorbance à 440 nm dans les spectres UV-visible a indiqué la présence d'AgNPs qui peut être due à l'excitation des vibrations de plasmon de surface dans les AgNPs.

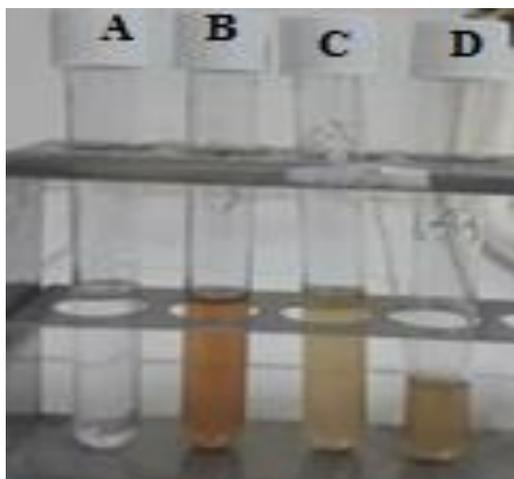


Figure 21 : Révélation de la présence des nanoparticules d'argent. (A) : Témoin négatif, AgNO₃ seulement. (B) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche

T1172, (C) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche T2257, (D) : présence des AgNPs dans le cas du filtrat de culture de la souche B1283.

Tableau 05 : La taille des nanoparticules d'argent (AgNPs) et leur absorbance.

Souches	Taille des AgNPs (nm)	absorbance
T1172	14,4nm	0,253
T2257	12,75nm	2,061
B1283	64,05nm	1,249

III.3.2.2. Technique des disques :

L'activité antimicrobienne est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des disques contenant l'extrait ou filtrat de culture brut d'*Aspergillus terreus* à tester vis-à-vis des quatre souches pathogènes, après 24 heures d'incubation à une température de 37°C.

-Technique des disques de l'extrait brut

Cette technique a révélé que la majorité des extraits organiques présentent une activité antimicrobienne sur les microorganismes testés. Les résultats font ressortir l'acétate d'éthyle comme le meilleur solvant pour l'extraction des métabolites fongiques à effet antimicrobien suivi par le chloroforme. Concernant les extraits de l'acétate d'éthyle, des zones d'inhibition considérables ont été observées chez l'extrait de la souche T2257 avec un diamètre de 22 mm contre *S.aureus* et 13 mm contre *E. coli*, alors que, pour les extraits chloroformiques, la zone d'inhibition était de 20 mm de diamètre en présence de l'extrait de la souche B1283 contre *S. aureus*. Pour *P. aeruginosa* et *Candida albicans*, aucune activité antimicrobienne des extraits organiques n'a été détectée (**figure 22**).

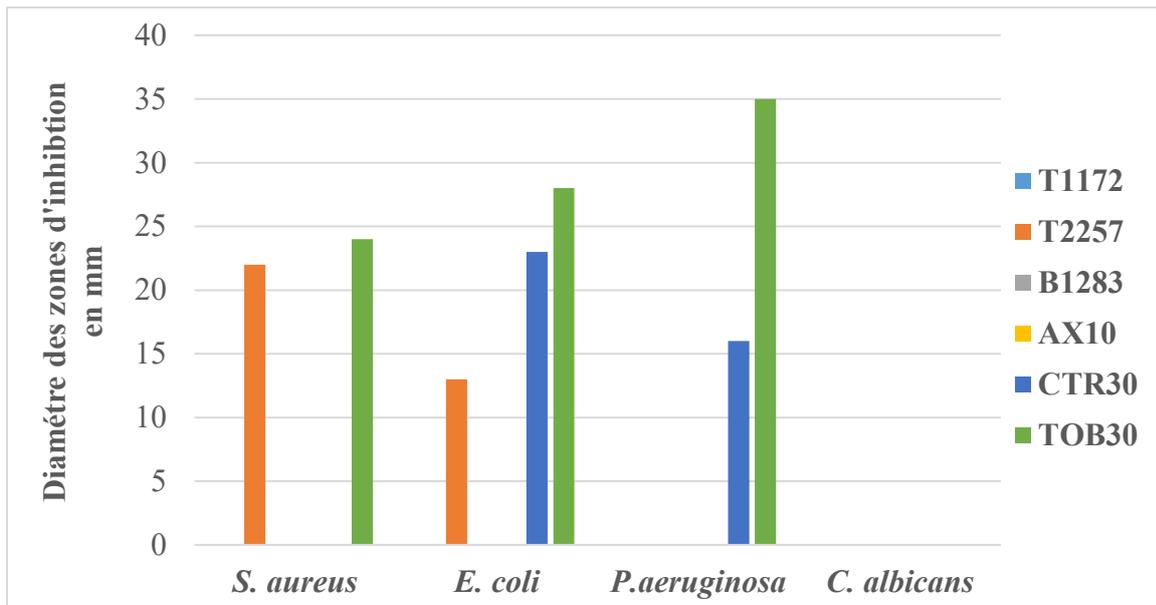


Figure 22 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits bruts d'acétate d'éthyle des trois souches d'*Aspergillus terreus* contre les souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.

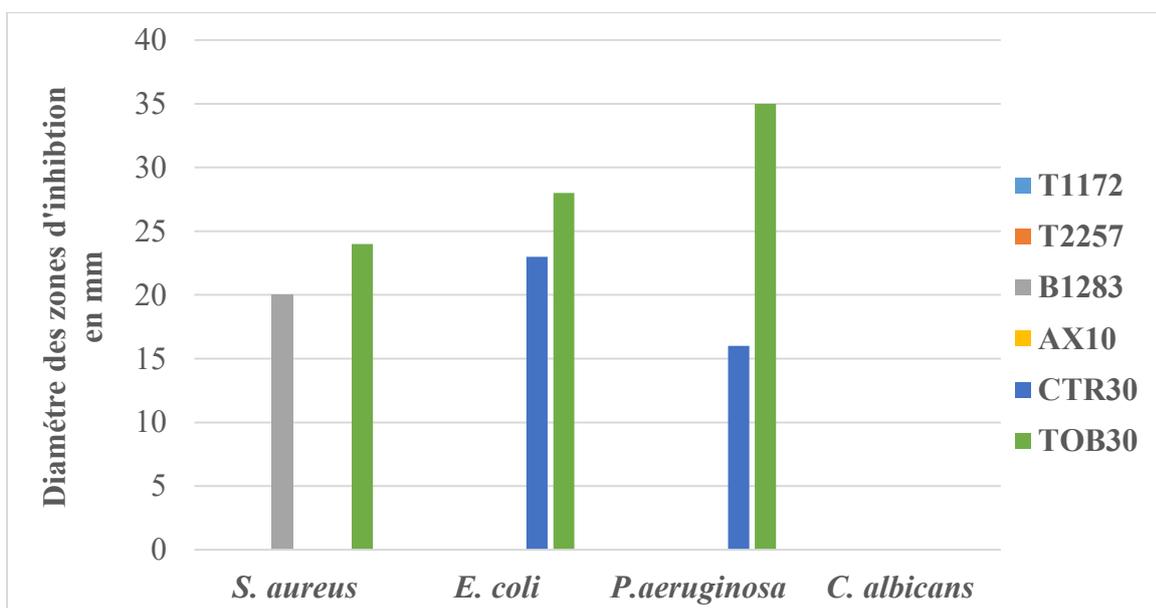


Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les extraits bruts de chloroforme des trois souches d'*Aspergillus terreus* contre les souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.

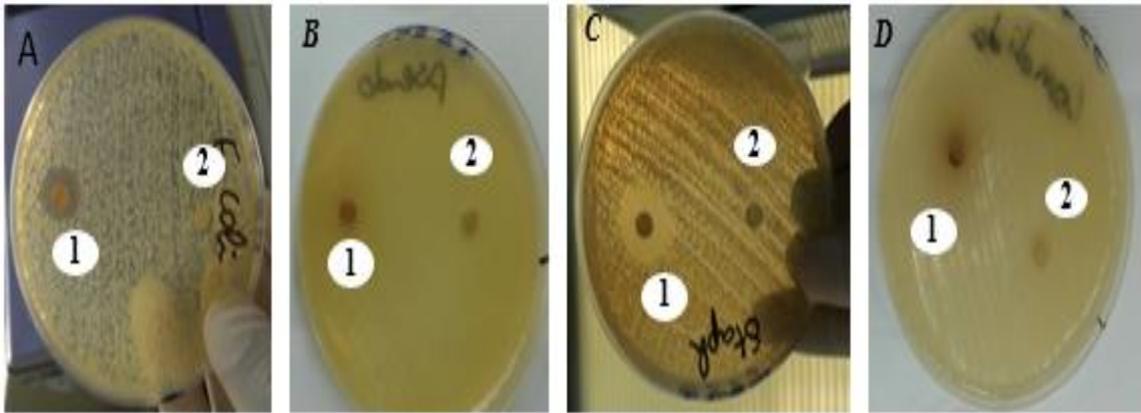


Figure 24 : Activités antimicrobiennes de la souche T2257 détectées par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

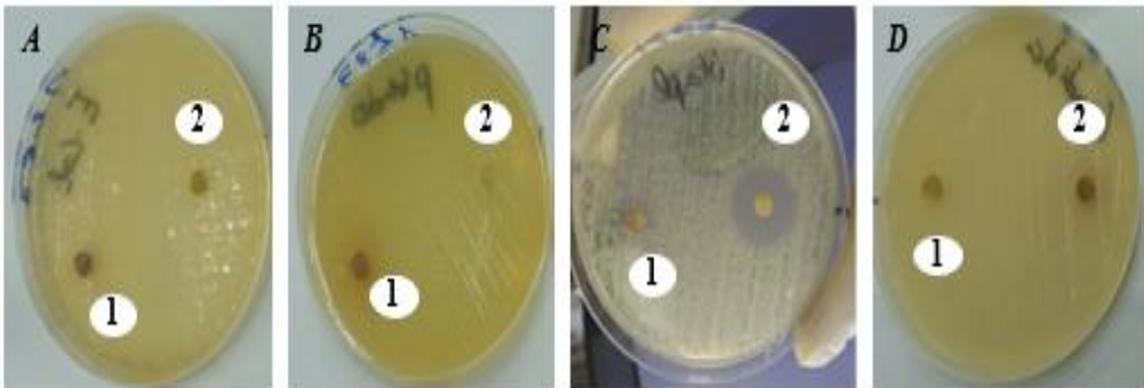


Figure 25 : Activités antimicrobiennes de la souche B1283 déterminées par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

Aucune activité antimicrobienne des extraits organiques de la souche T1172 n'a été détectée contre les quatres souches microbiennes testées.

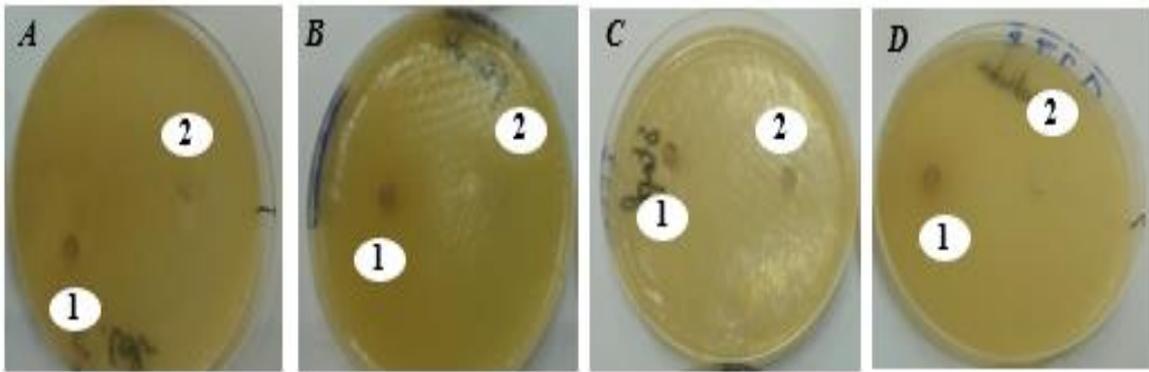


Figure 26 : Activités antimicrobiennes de souche la T1172 détectées par la technique des disques des extraits bruts (acétate d'éthyle 1 et chloroforme 2). (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

Cependant, l'antibiogramme réalisé en présence des disques de céftriaxone, la valeur la plus élevée 23 mm a été constaté en présence d'*E.coli*, suivie par une zone d'inhibition de 16 mm qui a été constaté en présence de *P. aeruginosa*, et absence de zone en à l'encontre de *S. aureus*.

Les disques de tobramycine, ont montré la valeur la plus élevée 35 mm constaté en présence de *P.aeruginosa*, suivie par des zones d'inhibition de l'ordre de 28 mm et 24 mm avec *E. coli* et *S. aureus* respectivement. En revanche, l'antibiotique amoxicilline n'a exercé aucun effet contre les souches testées.

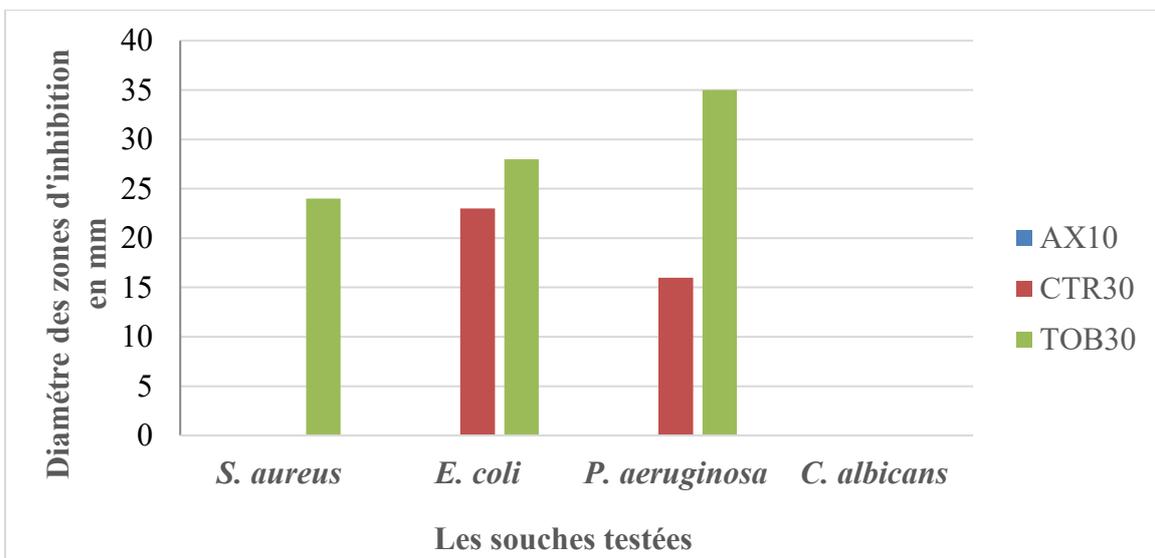


Figure 27 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les trois antibiotiques contre les souches microbiennes testées.

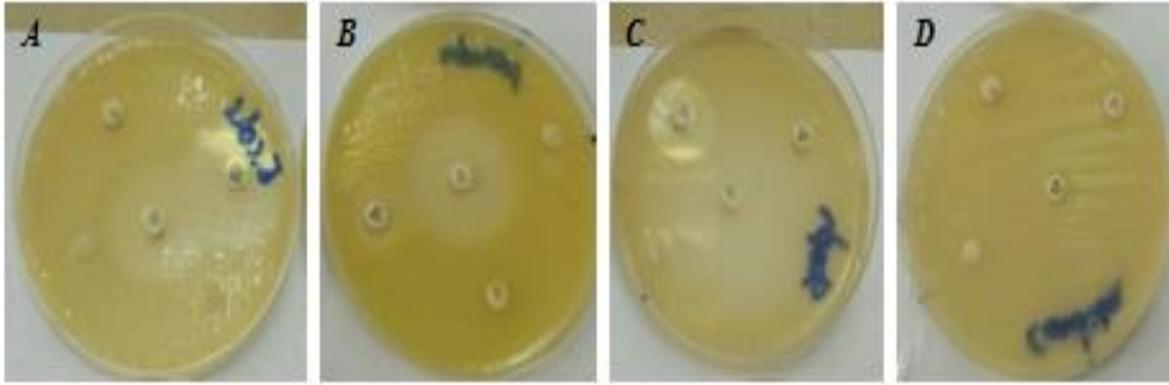


Figure 28 : Activités antimicrobiennes exercées par les trois antibiotiques par test d'antibiogramme. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

-Technique des disques du filtrat brut (nanoparticules)

Les filtrats de culture des souches T2257, B1283 et T1172 ne présentent aucuns effets sur les bactéries et la levure testées (**figure 29, 30 et 31**), mais un virage de couleur vert autour de disque été constaté en présence de la souche *E. coli* (**figure 29**).

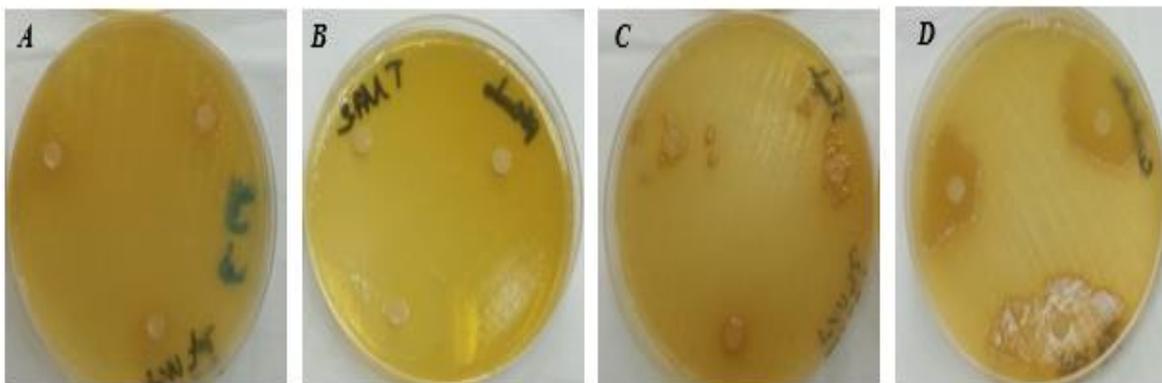


Figure 29 : Activités antimicrobiennes exercées par la souche T1172. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

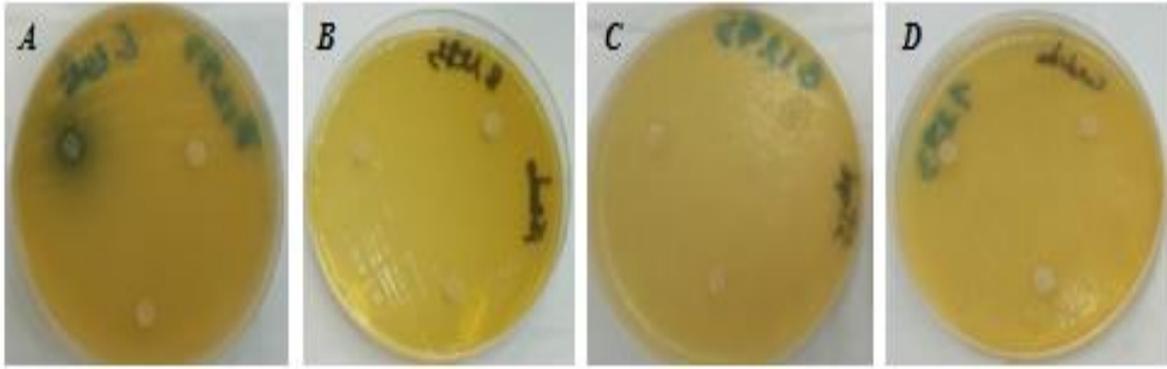


Figure 30 : Activités antimicrobiennes montrées en présence de la souche B1283. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

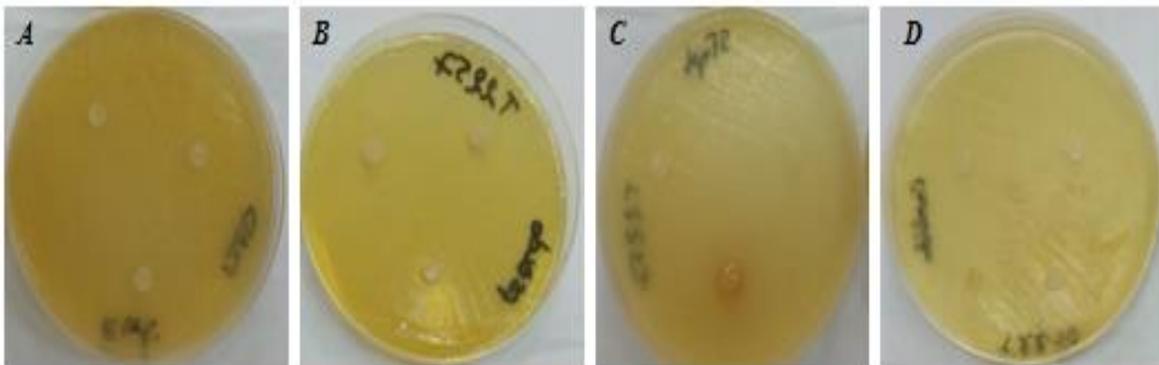


Figure 31 : Activités antimicrobiennes détectées en présence la souche T2257 par la technique des disques. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

-Technique des disques des nanoparticules d'argent AgNPs

D'après cette technique, les résultats montrent que seulement le filtrat de culture de la souche T1172 a exercé une activité antibactérienne élevée contre *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 22 mm, alors qu'aucun effet n'a été constaté lors d'utilisation des autres bactéries (*S.aureus* et *E.coli*) (**Figure 32**).

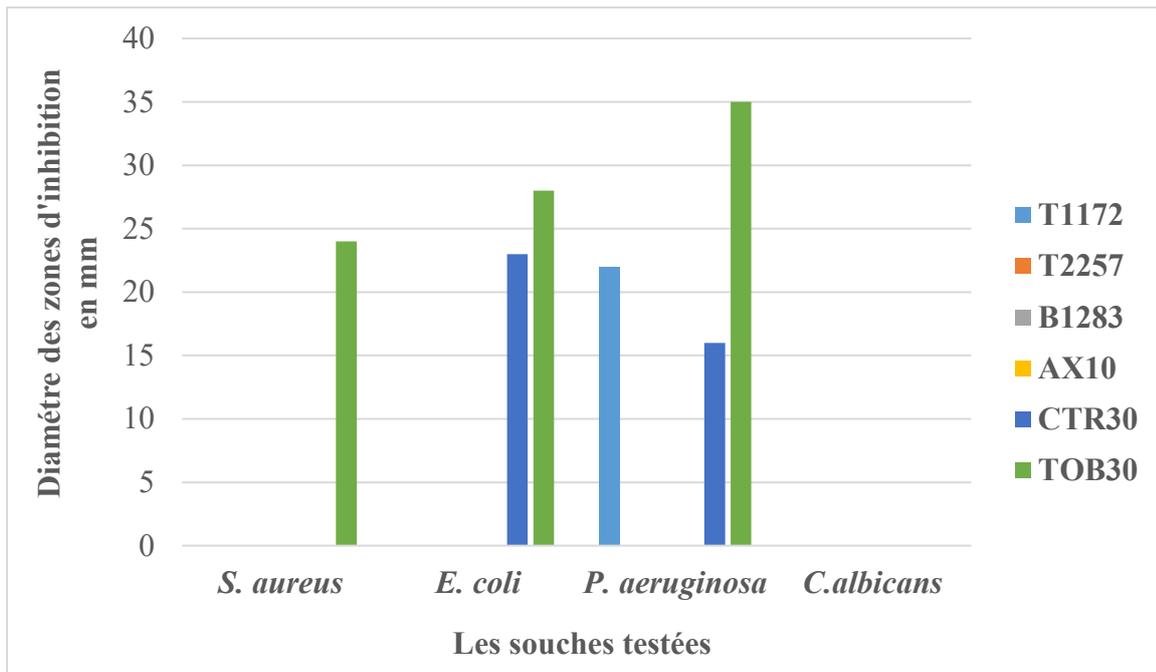


Figure 32 : Diamètres des zones d'inhibition exercées par les AgNPs des trois souches en présence des souches microbiennes testées (technique des disques) vis-à-vis les antibiotiques.

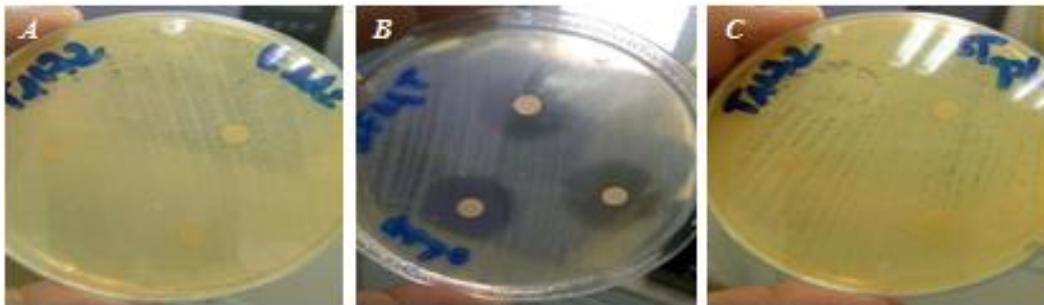


Figure 33 : Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche T1172 détectées par la technique des disques. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*.

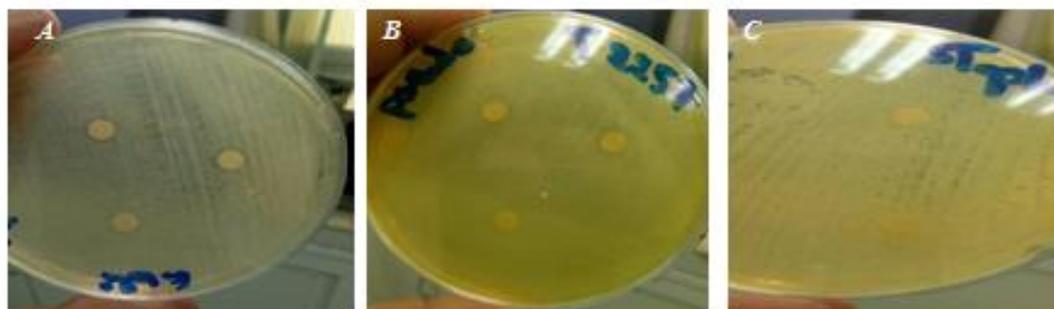


Figure 34 : Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche T2257 détectées par la technique des disques. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*.

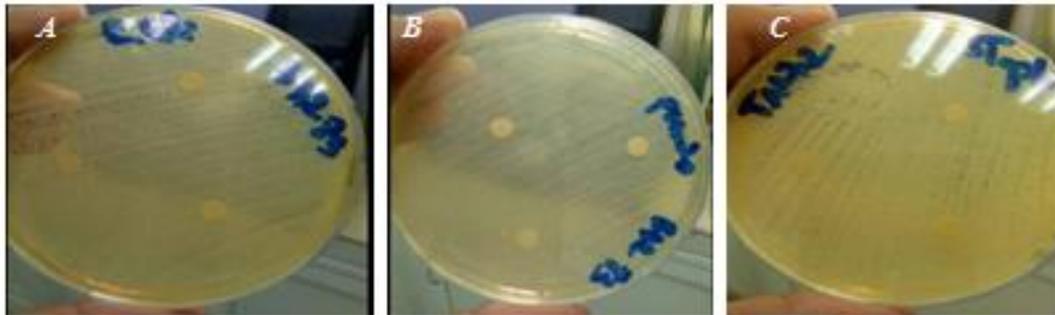


Figure 35 : Activités antimicrobiennes d'AgNPs de la souche B1283 déterminées par la technique des disques. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*.

III.3.2.3. Technique des puits des filtrats brut :

Les résultats montrent que les filtrats de culture des trois souches d'*Aspergillus terreus* ne présentent aucune activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans* (**figure 36, 37,38**). Par contre, nous avons remarqué un virage de la couleur du milieu en présence de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* en présence des AgNPs des trois souches d'*Aspergillus terreus*. Cette bactérie est caractérisée par la production d'un pigment pyoverdine (vert fluorescent). Egalement un virage de la couleur de la levure *Candida albicans* en présence chez des deux souches T1172 et B1283. Un virage de la couleur du milieu en présence de *C. albicans* et *S. aureus* exercé par AgNPs de T2257, alors qu'un faible virage de la couleur du milieu contenant la culture d'*E. Coli* et AgNPs de B1283.

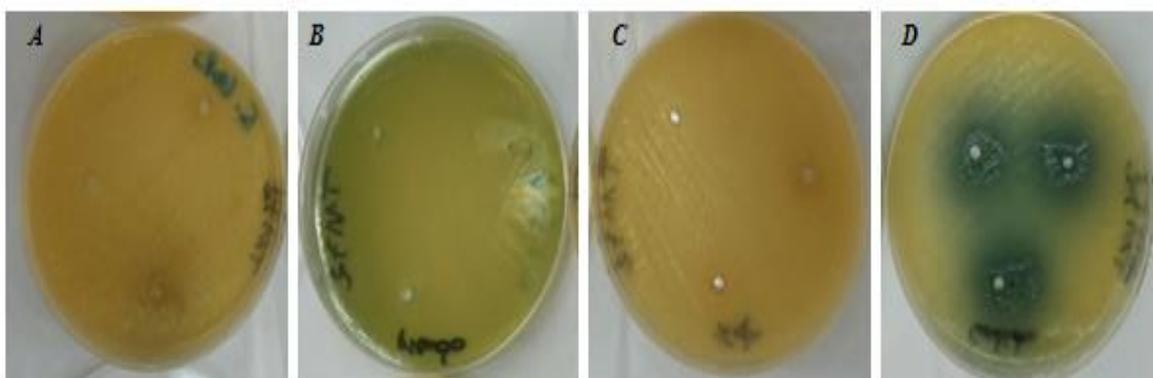


Figure 36 : Activités antimicrobiennes de la souche T1172 déterminées par la technique des puits. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

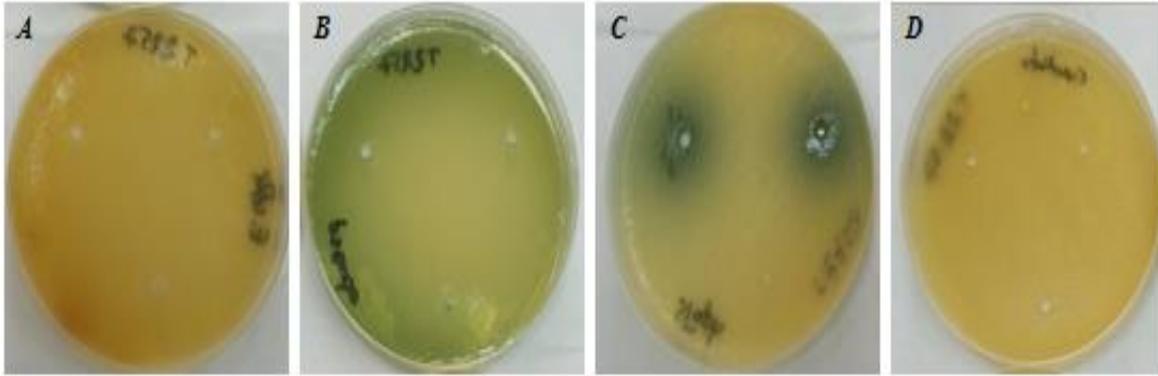


Figure 37 : Activités antimicrobiennes de la souche T2257 exercées par la technique des puits. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

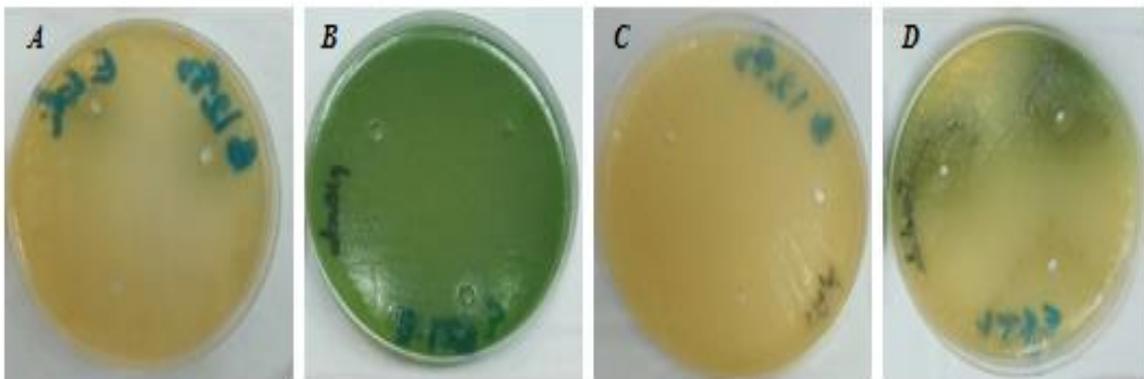


Figure 38 : Activités antimicrobiennes de la souche B1283 enregistrées par la technique des puits. (A) : *Escherichia coli*, (B) : *Pseudomonas aeruginosa*, (C) : *Staphylococcus aureus*, (D) : *Candida albicans*.

On peut expliquer les résultats par le fait que la diffusion en puits, nous doublons le volume de solutions de nanoparticules et donc augmentons la diffusion dans le milieu.

III.4. Discussion

L'activité antimicrobienne des trois souches fongiques d'*Aspergillus terreus* (T1172, T1257 et B1283) à l'encontre de trois souches bactériennes (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*) ainsi qu'une levure (*Candida albicans*) a été mise en évidence à travers l'utilisation d'extraits et des filtrats de culture des trois souches fongiques par trois techniques : technique des cylindres d'agar, technique des disques et des puits.

Les résultats obtenus dans les techniques de confrontation directe, ont révélé la capacité d'*Aspergillus terreus* a inhibé la croissance de certains microorganismes testés.

Les souches d'*Aspergillus terreus* sont des endophytes et Selon les travaux de Choi et *al.*, (2005), Selim et *al.* (2012) et Sunitha et *al.* (2013), les champignons endophytes sont parmi les microorganismes qui produisent des métabolites secondaires qui présentes une activité antibactérienne qui peut inhiber le développement de certains bactéries avec des effets variables (Kaul et *al.*, 2012 ; Arivudainambi et *al.*, 2014).

Ces molécules bioactives 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 (Botton et *al.*, 1990 ; Barrios et Mejia, 2008). Les composés bioactifs des plantes et des micro-organismes pourraient constituer la meilleure alternative comme source de médicaments potentiels et prometteurs (Nurunnabi et *al.*, 2020). Betton et *al.*, (1990) ont montré que les espèces du genre *Aspergillus* sont connus pour leur production de substances à effet antibactérien.

Bezerra et *al.* (2015) ont montré que l'endophyte *Aspergillus ochraceus* présentait une gamme élevée d'activité antibactérienne et inhibait la croissance de quatre bactéries pathogènes sur 10. Six espèces différentes d'*Aspergillus* ont été isolées à partir de *Calotropis procera* présentaient une bonne activité antibactérienne contre toutes les bactéries testées, mais elles étaient plus faibles contre les bactéries à Gram négatif (Murali et *al.*, 2017 ; Rani et *al.*, 2017). Yadav et *al.* (2016) ont signalé que les extraits de deux champignons endophytes *Aspergillus terreus* et *Aspergillus tubingensis* sont capables d'inhiber la croissance des souches multirésistantes *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

D'après les résultats obtenus, une différence dans la sensibilité des espèces microbiennes a été enregistrée pour les souches d'*Aspergillus terreus* étudiées. Cette différence suggère la sensibilité des différents microorganismes aux composants des Métabolites secondaires fongiques bruts des mycoendophytes étudiés. Pour cela cette sensibilité des microbes aux MSFB varie selon les espèces microbiennes. *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* ont montré une grande sensibilité aux MSFB tandis qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une faible sensibilité.

Nos résultats ressemblent l'étude de Mansour et Mazzi en 2017, qui ont étudiée l'activité antibactérienne de trois souches d'*Aspergillus* sur cinq germes pathogènes les résultats montrent que : *B. subtilis*, et *S. aureus* ont montré une grande sensibilité aux MSFB, suivi de *Streptococcus* sp, contrairement au *E. coli* et *K. pneumoniae* qui montrés moins de sensibilité tandis que *P. aeruginosa* s'est montrée résistante aux MSFB.

Selon Ladjal (2012), le test d'activité antimicrobienne des isolats, qui consiste à rechercher l'activité antibactérienne et antifongique sur le développement des souches test : *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, montrent que les genres *Penicillium*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichosporom*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, ont manifesté par un effet antagoniste et antibiotique important. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes diffèrent morphologiquement. La plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif aux composés bioactifs par rapport à celle des bactéries à Gram négatif. Cette sensibilité différente pourrait être attribuée aux différences dans les constituants de la paroi cellulaire et leur disposition dans les deux groupes de bactéries (Stefanovic et al., 2012). La paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif est plus complexe, constituée d'un espace périplasmique et d'une fine couche de peptidoglycane adjacente à la membrane cytoplasmique, elle est également entourée d'une membrane externe supplémentaire composée de phospholipides et de lipopolysaccharides (Praptiwi et al., 2020), ce qui pourrait rendre la paroi cellulaire imperméable aux composés bioactifs et a tendance à expulser les antibiotiques des cellules en agissant comme une barrière sélective (Sebola et al., 2019). Alors que les parois des bactéries à Gram positif sont caractérisées par la perméabilité aux composés efficaces, car elle est constituée d'une couche de peptidoglycane et une barrière de perméabilité inefficace (Stefanovic et al., 2012; Hate et al., 2017).

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

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* à la capacité de synthétiser la chitinase, qui est une enzyme importante de la lyse des parois pourrait 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 montré que les champignons endophytes tels 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).

D'après les résultats obtenus dans la technique des cylindres d'agar, les trois souches d'*Aspergillus terreus* exercent une faible activité antimicrobienne à cause de la faible zone d'inhibition, en revanche un phénomène de compétition apparaît dans le milieu de culture vis-à-vis de l'espace et des nutriments. Ce phénomène a été observé clairement dans les travaux de Mohamed Mahmoud (2017) vis-à-vis de certains agents pathogènes des plantes.

Selon Mohamed Mahmoud et *al.*, (2017) l'efficacité de l'activité antagoniste des trois souches fongiques vis-à-vis de quelques agents pathogènes des plantes (F.o.a, F.o.l et Ggt) a été déterminé. Cette activité exprime le pouvoir antagoniste de ces souches à travers deux phénomènes l'antibiose et la compétition. Cette variation dépend non seulement des espèces antagonistes utilisées mais aussi les isolats fongiques étudiés.

La technique des cylindres d'agar est couramment utilisée pour le criblage préliminaire afin de minimiser le temps, les dépenses et les tentatives de sélection des microorganismes actifs. Cette technique est également utilisée pour détecter les composés non volatils produits par les micro-organismes (Sadrati et *al.*, 2013 ; Hamzah et *al.*, 2018).

L'activité antagoniste obtenue contre les bactéries pathogènes par cette technique, peut donc être due à la sécrétion dans le milieu gélosé des métabolites antibactériens diffusibles (antibiotiques) (Kamil et *al.*, 2018), alors que celle obtenue contre les champignons phytopathogènes peut être due aussi bien à la sécrétion de molécules antifongiques, ou

d'enzymes extracellulaires dégradant la paroi cellulaire (protéase, cellulase, lipase, et chitinase) ou les deux (Mohamad et *al.*, 2018), mais aussi au mycoparasitisme ou à la compétition par rapport aux nutriments (Aramsirirujwet et *al.*, 2016).

Selon Fuchs et *al.*, 1997 et El Hassni et *al.*, 2005, *Fusarium* sp a été largement utilisé pour le contrôle biologique, le principale mécanisme d'action de champignon est la compétition pour le carbone et le glucose.

L'activité antimicrobienne d'*Aspergillus terreus* consiste à rechercher l'effet antimicrobien de ces métabolites secondaires sur la croissance des souches testés.

Les extraits des isolats fongiques utilisés dans cette étude ont présenté une activité antimicrobienne intéressante contre deux souches multirésistantes (*S. aureus* et *E. coli*). Cela suggère que ces souches sécrètent des antibiotiques différents de ceux auxquels ces germes sont résistants. Selon ces résultats, les souches pourraient être une source très prometteuse pour la découverte de nouveaux composés antimicrobiens ayant des effets bactéricides ou bactériostatiques (Sadrati, 2021).

Les résultats de la technique des disques de l'extrait brut montrent que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant pour l'extraction des métabolites fongiques à effet antibactérien suivi par le chloroforme.

Concernant le choix des solvants, l'activité antibactérienne maximale des extraits fongiques bruts a été observée avec les extraits de l'acétate d'éthyle pour la plupart des isolats. Ces résultats rejoignent les travaux de Sadrati (2021), l'extrait de l'isolat *P. griseofulvum* JOR22 était actif contre toutes les bactéries à Gram positif et négatif. L'efficacité de cet extrait était très forte contre la plupart des bactéries pathogènes surtout contre les différentes souches d'*E. coli* et celles de *S. aureus* où les moyennes des zones d'inhibition atteignaient les 45 mm contre *S. aureus* et 51.5 mm contre *E. coli*, alors que contre la plupart des autres bactéries, l'activité était forte.

Les solvants organiques jouent un rôle important dans l'extraction des produits naturels bioactifs sous forme de composés bruts à partir des milieux de culture (Sewelam et *al.*, 2017). En fonction de leur polarité, ils peuvent également extraire des métabolites secondaires présents de manière différentielle (Kamat et *al.*, 2020). L'acétate d'éthyle, le chloroforme et le dichlorométhane sont des solvants semi-polaires qui peuvent dissoudre les stérols, les alcaloïdes, les glycosides, les terpénoïdes et les flavonoïdes. Tandis que l'hexane est non polaire

et peut dissoudre des composés non polaires tels que la lignine, la cire, les lipides, l'aglycone, et le stérol (Tata et *al.*, 2020).

D'après l'analyse par DLS et par spectro à UV montre que *Aspergillus terreus* a la capacité de synthétiser des nanoparticules et spécialement les nanoparticules d'argent AgNPs. Ces dernières sont des particules qui montrent des activités antimicrobiennes et peuvent inhiber efficacement divers organismes pathogènes, y compris les bactéries multirésistantes comme *Pseudomonas aeruginosa* et les champignons comme les levures (Botton et *al.*, 1990 ; Guangquan et *al.*, 2011). Malgré la faible concentration d'AgNPs dans le filtrat de culture une zone d'inhibition a été déterminée contre *P. aeruginosa*.

Selon Gaurav, (2018), les AgNPs se sont révélés efficaces comme agent antimicrobien même à faible concentration et ils inhibent la croissance des bactéries résistantes aux antibiotiques. Actuellement, le mécanisme le plus raisonnable est que l'exposition des cellules bactériennes à de faibles concentrations de nanoparticules provoque la désintégration complète des cellules et l'élimination de la couche de LPS (uniquement chez les Gram négatifs) (Dadi, 2019). Par rapport au résultat de Guangyuan et *al.*, 2011, qui montrent que la taille des AgNPs entre (1 à 20) nm, les deux souches T1172 et T2257 possèdent des nanoparticules d'argent.

Nos résultats sont en accord avec Gurunathan, (2014), les nanoparticules plus petites ont des surfaces spécifiques plus grandes, ce qui entraîne une probabilité plus élevée d'être en contact avec la membrane cellulaire bactérienne et de passer à travers celle-ci. Dans les membranes des cellules bactériennes à Gram négatif, les porines, qui permettent généralement le passage de molécules inférieures à 600 Da, sont les principaux canaux pour le mouvement des molécules étrangères entrant et sortant du corps cellulaires bactériens (Dadi, 2019). Donc les recherches actuelles ont montré que la taille des nanoparticules influence principalement le mécanisme antibactérien.

Les nanoparticules d'argent ont des applications diverses et importantes et ils sont connus pour avoir un effet désinfectant. Il a été rapporté que les nanoparticules d'argent sont non toxiques pour les humains, sont efficaces contre les microbes à de faibles concentrations et n'ont pas d'effets secondaires (Mohanpuria et *al.*, 2009).

Les nanoparticules d'argent possèdent des effets contre *candida albicans*, mais à cause de l'indisponibilité de cette souche au niveau du laboratoire au moment de la réalisation de notre expérimentation le test n'a pas été fait.

Selon Guangquan et *al.*, (2012), les AgNPs produits par *A. terreus* ont présenté une puissante activité antifongique contre les espèces de *Candida*. Les AgNPs produits pourraient inhiber trois bactéries pathogènes typiques différentes, dont *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* (Guangquan et *al.*, 2012).

D'après les résultats des filtrats de culture montrent que les trois souches d'*Aspergillus terreus* ne présentent aucune activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*.

L'effet antibactérien le plus fort se produit à la phase de croissance exponentielle pendant la multiplication des bactéries actives, ce qui nécessite un apport accru d'un milieu nutritif contenant des espèces biocides. En revanche, les échanges bactériens avec l'environnement s'affaiblissent fortement aux phases de latence et stationnaire, ce qui peut expliquer en partie le renforcement de la résistance aux agents biocides (Dadi, 2019).

Le taux de croissance bactérienne diffère pour les trois souches et ne dépend pas du type de bactérie, Gram positif ou Gram négatif. En effet, *E.coli* a le taux de multiplication bactérien le plus rapide, tandis que *S.aureus* et *P.aeruginosa* ont des taux de croissance plus bas, assez similaires.

Les résultats de la technique des puits montrent un virage de la couleur du milieu de la culture bactérienne de *Pseudomonas aeruginosa* car elle caractérise par la présence du pigment la pyoverdine (vert fluorescent) commune aux *Pseudomonas* dits "fluorescents".

Selon Abdezn et *al.*, 2014, les nanoparticules interagissent facilement avec d'autres particules et augmentent leur activité. Cette l'intégration peut être la cause de virage de couleur de milieu de la culture. La couleur de milieu des autres cultures autour des puits à également a changé pour les trois souches *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* et *Escherichia coli*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Dadi, 2019. Ces deux résultats peuvent être exprimés par l'agrégation des nanoparticules synthétisées par les souches d'*Aspergillus terreus* (Belteky, 2018), et que les souches microbiennes testées produisent également des nanoparticules d'argent. La première preuve de bactéries synthétisant des nanoparticules d'argent a été

établie en utilisant la souche *Pseudomonas stutzeri* AG259 qui a été isolée de la mine d'argent (Husseiny et al., 2006).

Les NP interagissent avec les composants de base de la cellule bactérienne, tels que l'ADN, les lysosomes, les ribosomes et les enzymes, entraînant un stress oxydatif, des altérations hétérogènes, des modifications de la perméabilité de la membrane cellulaire, des troubles de l'équilibre électrolytique, une inhibition enzymatique, une désactivation des protéines et des modifications du gène (Wang, 2017).

Ainsi que le fait que la diffusion en puits, le volume des solutions de nanoparticules est doublé ce qui augmente la diffusion dans le milieu (Dadi, 2019).

D'après les résultats de l'effet des nanoparticules, il y'a différentes facteurs qui peuvent influencer ou inhiber l'effet des nanoparticules tels que leurs tailles et leurs concentrations.

En outre, l'état physiologique de la bactérie, c'est-à-dire la forme planctonique, le biofilm, le taux de croissance, peut grandement contribuer à la sensibilité des bactéries au NPs (Huh, 2011 ; Nath, 2013). Dans certains cas, le rapport entre les bactéries et les NPs est essentiel à la toxicité de ces dernières. En outre, de nombreux facteurs environnementaux jouent un rôle et ont une incidence sur la létalité des NPs sur les bactéries, notamment le pH et la température. Les propriétés physicochimiques des particules, notamment leur taille, leur forme, et leur mélange dans divers rapports avec d'autres nanoparticules et solvant utilisés, affectent grandement leur activité antibactérienne (Gatoo, 2014). Ainsi, avec cette complexité, il n'est pas étonnant que de grandes parties du mode d'action antibactérien et du niveau de risque qu'elles posent soient encore obscures et que l'on trouve dans la littérature des articles contradictoires (Hajiour et Ashkarran, 2012).

Selon Sadrati, 2021, La composition chimique des milieux de culture (par exemple les sources de carbone, d'azote, de phosphore, de soufre ou de fer) est l'un des facteurs les plus importants influençant la production des métabolites secondaires.

Selon les résultats de l'antibiogramme et en comparaison avec les valeurs critiques de Pasteur, 2020, les trois souches bactériennes est considérées comme sensible en présence du tobramycine. *P. aeruginosa* est considérées comme sensible en présence du céftriaxone.

En comparaison les zones d'inhibitions obtenues par les trois souches d'*Aspergillus terreus* avec les résultats de l'antibiogramme, des zones d'inhibitions faibles en présence *E. coli*, une

zone d'inhibition forte en présence *P. aeruginosa* et des zones d'inhibitions très fortes en présence *S. aureus*.

L'intérêt grandissant pour la recherche et le développement de nouveaux agents antimicrobiens de diverses sources pour lutter contre la résistance microbienne. Donc on conclut que les souches d'*Aspergillus terreus* (T1172, T2257, B1283) constituent un large réservoir de nouvelles molécules qui peuvent être exploitées dans le futur.

Conclusion

Conclusion

Le nombre de pathogènes résistants aux antibiotiques sans cesse d'augmenté depuis quelques années et constitue un problème majeur de santé publique. La découverte de nouveaux agents antimicrobiens se trouve à être la solution pour combattre ce problème. Heureusement, les ressources naturelles présentent un grand potentiel et l'opportunité de découvrir de nouveaux antibiotiques qui seraient efficaces.

Les champignons endophytes sont considérés comme des sources d'excellents nouveaux produits naturels bioactifs tels que les antibiotiques et les enzymes. Ils ont un potentiel d'exploitation dans le domaine, médicale, agricole et industrielle. Ces molécules bioactifs possèdent d'action antifongique et antibactérienne.

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne d'*Aspergillus terreus* est réalisée par trois techniques de confrontation. L'effet des extraits organiques des souches fongique, a été testé par la technique des disques imbibés. Ce test montré que les extraits d'acétate d'éthyle avaient plus d'effet que le Chloroforme. Les résultats de cette confrontation montrent que l'extrait brut de la souche T2257 et le filtrat brut de la souche T1172 ont donné une meilleure zone d'inhibition (22 mm de diamètre) et la souche T2257 a donné une faible zone d'inhibition (3 mm de diamètre) avec *Staphylococcus aureus*.

Cette étude rapporte la présence de composé antimicrobien de trois souches d'*Aspergillus terreus* à l'encontre de trois bactéries *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* ainsi que une levure *Candida albicans*.

Les résultats des trois techniques (technique cylindre d'agar, technique des disques et des puits) montrent que *Staphylococcus aureus* et *Candida albicans* ont montré une grande sensibilité aux MSFB tandis qu'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré une faible sensibilité.

Les analyses par DLS et par spectro à UV montre que *Aspergillus terreus* a la capacité de synthèse des nanoparticules et plus spécialement d'argent «AgNPs», qui montrent des activités antimicrobiennes et peuvent inhiber efficacement les bactéries multirésistantes comme *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de 22 mm

Nous avons constaté que l'activité antagoniste in vitro dépend non seulement des extraits des souches antagonistes, mais aussi des pathogènes étudiés. Cette variation est liée aux mécanismes exercés par les extraits des endophytes qui fait intervenir des antibiotiques avec mécanisme de compétition au nutriment et l'espace.

En conclus que l'activité antimicrobienne contre les bactéries testées à coloration de Gram positif apparait plus importante que celle contre les bactéries à coloration de Gram négatif et que les souches d'*Aspergillus terreus* peuvent constituer une source potentiel de substances bioactives contre des agents multirésistantes.

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

- La purification et l'identification des substances bioactives produits par les souches d'*Aspergillus terreus*.
- La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antimicrobiennes secrétées (CMI).
- Extraction et ultra-purification et identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précises « HPLC, CPG....etc ».
- L'optimisation de la biosynthèse des MSFB à des fins médicale.
- La production des substances antibactériennes à l'échelle industrielle (Scall-up).

Références
Bibliographique

- 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.
- Ahamogbe K .A .L. (2014).Résistance bactérienne en cas d'infection de plaies diabétiques : Diagnostic et surveillance au laboratoire Rodolphe Mérieux de Bamako .Thèse de doctorat en pharmacie .Université des sciences des techniques et des technologies de Bamako.74P.
- Aramsirujiwet Y, Gumlangmak C, Kitpreechavanich V. 2016. Studies on antagonistic effect against plant pathogenic fungi from endophytic fungi isolated from *Hottuynia cordata* Thunb. and screening for siderophore and Indole-3-acetic acid production. *KKU Res J.* 21:55–66.
- Arivudainambi, U.S. E., Anantha Koteswararao Kanugula., Kotamraju S., Karunakaran C and Aajendran A. (2016). 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.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2012). Whitman WB. Goodfellow M, Kampf P, Busse, Trugillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). Vol 5 : The Actinobacteria. 2ème édition, spring, new york. 1750 p.
- Balajee, S. A., Nickel, J. Varga, and K. A. Marr. 2006. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell.* 5 : 1705-12.
- BIOFORMA. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale.* N° 25 Mars, 2002.
- Banerjee, D., & Stableforth, D. (2000). The treatment of respiratory pseudomonas infection in cystic fibrosis : what drug and which way? *Drugs*, 60(5), 1053-1064).

- Botton, B., Bretton, A., Fever M., Gautier, S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond, P., Sanglier, JJ., Vayssier, Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- Barrios, Gonzalez, j, Mejia, A. (2008). Production of antibiotics and other Commercially valuable secondary metabolites. 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.
- Bennett, J. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics.
- Bélteky P, Ronavari A, Igaz N, Szerencsés B, Thoth IY, Pfeiffer I, Kiricsi M, Konya Z. (2018). Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity
- Bezerra JDP, Nascimento CCF, Barbosa RN, Silva DCV, Svedese VM, Silva-Nogueira EB, Gomes BS, Paiva LM, Souza-Motta CM. 2015. Endophytic fungi from medicinal plant *Bauhinia forficata*: Diversity and biotechnological potential. *Braz J Microbiol.* 46: 49-57.
- BIOFERMA. Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation biologie médicale.* N° 25 Mars, 2002.
- Brady S. F. and Clardy J. CR377, a new pentaketide antifungal agent isolated from an endophytic fungus. *Journal of Natural Products* 2000; 63: 1447-1448.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.

- Cahagnier, B., Dragacc, S., Frayssint, C, Fremy J.M., Hennebert G.L., Lesage Messen L., Multo J.L., Richard, Molard, D et Reoquebert M.F. (1998). Moissisures des aliments peu hydrates Lovoisier Tec and Doc. France 104.
- Chua, K., Seemann, T., Harrison, P.F., Davies, J.K., Coutts, S.J., Chen, H., Haring, V., Moore, R., Howden, B.P., and Stinear, T.P. "Complete genome sequence of *Staphylococcus aureus* strain JKD6159, a unique Australian clone of ST93-IV community methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* (2010) 192:5556-5557.
- Chun-Jun Guo et al. *Org Lett.* 2014. Molecular genetic characterization of terreic acid pathway in *Aspergillus terreus*.
- 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.
- Clave, d. (2011). Fiche technique bactériologie *Pseudomonas aeruginosa* centre toulousain pour la contrôle de qualité en biologie clinique.
- Deshmukh SK, Gupta MK, Prakash V, Saxena S. 2018. Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. *J Fungi.* 4:77. Available from: <https://doi.org/10.3390/jof4030077>.
- David, Kadosh. (2016). Control of *Candida albicans* morphology and pathogenicity By posttranscriptional mechanisms. P. 1,2.
- Denis, F., Ploy, M., Martin.C., Bingen, Quentin R. (2007). Bactériologie médicale Paris Masson, 594 P.

- Deshmukh, S.K., Verckar and Sarita, V. (2015). Endophytic fungi : a réservoir of antibacterials. *Frome Microbiol.* 5 : 715. PMID : PMC4288058. doi : 10.3389/fmicb.201400715.
- DADI Rania. 2019. Thèse doctorat. Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Docteur de l'Université Paris 13.
- Enoch, D. A., Simpson, A. J., & Kibbler, C. C. (2004). Predictive value of isolating *Pseudomonas aeruginosa* from aerobic and anaerobic blood culture bottles. *Journal of Medical Microbiology*, 53(Pt 11), 1151-1154.
- Eisenstein, B. I. (2008). Treatment challenges in the management of complicated skin and soft-tissue infections. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 2, 17-25. doi : 10.1111/j.1469-0691.2008.01922.x)
- Fadiji AE, Babalola OO. 2020. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Front Bioeng Biotechnol.* 8:1–20.
- Fan Y, Gao L, Chang P, Li Z. 2020. Endophytic fungal community in grape is correlated to foliar age and domestication. *Ann Microbiol.* 70:4–11.
- Farmer, J. J., Boatwright, K. D., & Janda, J. M. (2007). Enterobacteriaceae : Introduction and Identification. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 649-669). Washington, DC : ASM press).
- Fuchs J. G., Moenne-Loccoz Y. et Defago G., 1997. Ability of Nonpathogenic fungal root-endophyte communities and populations, in particular of the dark septate endophyte

Phialocephala fortinii s. l. *Fusarium oxysporum* Fo47 to Protect Tomato against Fusarium Wilt, *Phytopathology. Soil Biology*. Springer-Verlag, Heidelberg, Berlin.

- Gattoo M. A., Naseem S., Arfat M. Y., Dar A. M., Qasim K., Zubair S. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. *BioMed Research International*. 2014; 2014:8.
- Gellatly S.L., Hancock R.E., *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses, *Pathog. Dis.* 67 (2013) 159–173.).
- Grace, Delia, Alexandra, fetsch. (2018). *Staphylococcus aureus* A Foodborne Pathogen : Epidemiology, Detection, characterization, prevention, and Control : An Overview. In *Staphylococcus aureus*. Elsevier. p 3-10.
- Guanguan Li, Dan He, Yongqing Qian, Buyuan Guan , Song Gao, Yan Cui, Koji Yokoyama and Li Wang.2012. Fungus-Mediated Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using *Aspergillus terreus*, 466-476 P.
- Guide pratique des bactéries pathogènes. Edition 2017.
- Gurunathan S, Han JW, Kwon DN, Kim JH. Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against gram-negative and gram-positive bacteria. *Nanoscale Res Lett*. 2014;9(1):373.
- Hajipour M. J., Fromm K. M., Ashkarran A. A., et al. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*. 2012 ; 30(10):499–511.
- Hate RR. 2017. Isolation and identification of three bioactive compounds from endophytic fungus *Trichoderma* sp. *J Al-Nahrain Univ*. 20:108–113.
- Hart,T., Shears, p. (2000). Atlas de poche de microbiologie, 1^{er} édition, Médecine-Sciences Flammarion, Paris, P71.

- Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, et al., 2007. A higherlevel phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* 111: 509-47.
- Hamzah TNT, Lee SY, Hidayat A, Terhem R, Faridah-Hanum I, Mohamed R. 2018. Diversity and characterization of endophytic fungi isolated from the tropical mangrove species, *Rhizophora mucronata*, and identification of potential antagonists against the soil-borne fungus, *Fusarium solani*. *Front Microbiol.* 9: 1707.
- Hazalin N. A., Ramasamy K., Lim S. M., Wahab I. A., Cole A. L. and Abdul Majeed A. B. Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2009 ; 9: 46.
- Huh A. J., Kwon Y. J. ‘Nanoantibiotics’: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release.* 2011 ; 156(2):128–145.
- Jean-Pierre BRU, François CARON, Christian CATTOEN, Vincent CATTOIR, Luc DUBREUIL, Gérard LINA, Audrey MERENS, Patrick PLESIAT, Marie-Cécile PLOY, Claude-James SOUSSY, Emmanuelle VARON. (2020). Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- Jinkui Ouyang, Ziling Mao, Yunying Xie, Zehua Cui, Xiujun Wen, Jun Wang and Tijia. (2018). Mollicellins O-P, Four Depsidones Isolated from the Endophytic Fungus *Chaetomium*.
- Kamil FH, Saeed EE, El-Tarabily KA, AbuQamar SF. 2018. Biological control of mango dieback disease caused by *Lasiodiplodia theobromae* using streptomycete and non-streptomycete actinobacteria in the United Arab Emirates. *Front Microbiol.* 9:1–19.

- Kaul, S., Gupta S., Ahmed, M., Dhar, M.K. (2012). Endophtic fungi from medicinal plants : à treasure hunts for bioactive metabolites *Phytochem Rev* doi: 10.1007/s11101012-9260-6.
- Keswani C., Singh S.P., Singh H.B., 2015 – *Beauveria bassina* : Status, Mode of action, Aploications and Safety issues. *Biotech Today*. n° 3(1), p.p.16-20.
- Khiralla A., Spina R., Yagi S., Mohamed I., Laurain-Mattar D., 2017 - Endophyticfungi : occurrence, classification, function and natural products. *Microbiology reserarch advances*, Chapter 1.
- Kirck, P.M., Cannon, P. F., Minter, D.W and Stalpers, J. A (2008). *Dictionnaire of the Fungi*. (10th edn). CABI.
- King, L. A., Loukiadis, P., Mariani., Kurkdjian. S., Haeghebaert, F. X., Weill, C., Baliere, 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*.
- Kamat S, Kumari M, Taritla S, Jayabaskaran C. 2020. Endophytic Fungi of Marine Alga From Konkan Coast, India—A Rich Source of Bioactive Material. *Front Mar Sci*. 7:31.Available from: doi: 10.3389/fmars.2020.00031 .
- Ladjel, S. (2012). M&moire fin d'études. Activité antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (*Pinus halepensis* Mill.) de la région de M'sila.
- Larpant J. P., Larpant- Gourguand M. 1996. *Mémento Technique de microbiologie*, 2éme édition. Technique et Documentation. Lavoisier.

- LE LOIR, Y, GAUTIERE. (2010). Monographie de la microbiologie : *Staphylococcus aureus* Tec et Doc, Lavoisier, paris.
- Liu P, Zhang D, Shi R, Yang Z, Zhao F, Tian Y. 2019. Antimicrobial potential of endophytic fungi from *Astragalus chinensis*. 3 Biotech. 9:1–9.
- Linlin Wang, ¹, * Chen Hu, ², * Longquan Shao. (2017). L'activité antimicrobienne des nanoparticules : situation actuelle et perspectives d'avenir. 12 pages 1227—1249.
- Mansoour. M, Mazzi. Y. (2017). Mémoire fin d'étude. Recherche de l'activité antibactérienne des souches du genre *Aspergillus*.
- Mohanpuria .P, N.K. Rana, S.K. Yadav. 2009. Biosynthesis of nanoparticles: technology concepts and future applications. J Nanopart Res 10, 507
- Mohamed Mahmoud, f. (2017). Activités biologiques de champignons endophytes isolés du palmier dattier (*Phoenix dactylifera* L.). Thèse de doctorat, en Science Agronomiques. Spécialité Phytopathology, Ecole Nationale Supérieure Agronomique d'El Harrach, P188-189.
- Mohamad OAA, Li L, Ma JB, Hatab S, Xu L, Guo JW, Rasulov BA, Liu YH, Hedlund BP, Li WJ. 2018. Evaluation of the antimicrobial activity of endophytic bacterial populations from Chinese traditional medicinal plant licorice and characterization of the bioactive secondary metabolites produced by *Bacillus atrophaeus* against *Verticillium dahliae*. Front Microbiol. 9:1–14.
- Madki M. A., Manzoor A. S., Powar P. V. and Patil K. S. Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. International Journal of Pharmaceutical Sciences 2010; 2: 848-858.

- Murali M, Mahendra C, Hema P, Rajashekar N, Nataraju A, Sudarshana MS, Amruthesh KN. 2017. Molecular profiling and bioactive potential of an endophytic fungus *Aspergillus sulphureus* isolated from *Sida acuta*: A medicinal plant. *Pharm Biol.* 55: 1623-30.
- Naouar MS, Mekki LZ, Charfi L, Boubaker J, Filali A. 2016. Preventive and curative effect of *Pistacia lentiscus* oil in experimental colitis. *Biomed Pharmacother.* 83:577–583.
- Nath D., Banerjee P. Green nanotechnology—a new hope for medical biology. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* 2013;36(3):997–1014.
- Nurunnabi TR, Sabrin F, Sharif DI, Nahar L, Sohrab MH, Sarker SD, Rahman SMM, Billah MM. 2020. Antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from the mangrove plant *Sonneratia apetala* (Buch.-Ham) from the Sundarbans mangrove forest. *Adv Tradit Med.* Available from: <https://doi.org/10.1007/s13596-019-00422-9> .
- Oliveira Silva M. R., Sena Xisto K. and Buarque Gusumao N. 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, Industrial and Applied Microbiology (Biomicroworld2007)*, 2009; pp. 519-520.3
- Ouyang J, Mao Z, Guo H, Xie Y, Cui Z, Sun J, Wu H, Wen X, Wang J, Shan T. 2018. Mollicellins O–R, four new depsidones isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. EEF-10. *Molecules.* 23:1–11.
- Praptiwi, Fathoni A, Ilyas M. 2020. Diversity of endophytic fungi from *Vernonia amygdalina*, their phenolic and flavonoid contents and bioactivities. *Biodiversitas.* 21:436–441.

- Prabavathy D. and Valli Nachiyar C., (2012). Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus* sp isolated from *Justicia adathoda*. Indian Journal of Science and Technology. Vol. 5 No. 9 ISSN: 0974- 6846.
- Pimentel M. R., Molina G., Dionisio A. P., Marostica Junior M. R. and Pastore G. M. The use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in biotransformation process. *Biotechnol Res Int* 2011; doi:10.4061/2011/576286.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. Paris : Edition Tachnique § Documentation,. ISBN : 2-7430-0293-X.
- Pitt JI, Samson RA, Frisvad J C., 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In : Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification (Samson RA. Oitt JI, eds). Harwood Academic Publishers, Amsterdam : 9-79.
- Park H, Wood MR, Malysheva OV, Jones S, Mehta S, Brannon PM, Caudill MA., 2017. Placental vitamin D metabolism and its associations with circulating vitamin D metabolites in pregnant Women. *106 (6)* : 1439-1448. Doi : 10.3945/ajcn.117.153429.
- Palleroni, N.J., 2008. The road to the taxonomy of *Pseudomonas*. In: Cornelis, P.(Ed.), *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Belgium, pp. 1–18.
- Poole. K, 2004. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* Volume 10, Issue 1 p. 12-26.
- Rani R, Sharma D, Chaturvedi M, Parkash Yadav J. 2017. Antibacterial activity of twenty different endophytic fungi isolated from *Calotropis procera* and Time Kill Assay. *Clin Microbiol Open Access*. 06. 280. Available from: DOI: 10.4172/2327-5073.1000280.

- Rania Dadi. (2019). Thèse de doctorat de l'université paris 13. synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne.
- Ryan, K. J. (2004). *Candida, Aspergillus, and Other Opportunistic Fungi*. In Ryan, K.J. and Ray, C.G. (Ed.), *Sherris Medical Microbiology* (4th ed., pp. 659-668). USA: McGraw-Hill.)
- Sharma N, Sharma V, Abrol V, Panghal A, Jaglan S. 2019. An update on bioactive natural products from endophytic fungi of medicinal plants. In: *Pharmaceuticals from Microbes*, Pandey A. (eds). Springer International Publishing. pp: 121-153.
- Strobel G., Daisy B., Castillo U. and Harper J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*; 67: 257-268.
- Stefanovic O, Radojevic I, Vasic S, Comic LJ. 2012. Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants. In: *Antimicrobial Agents*. Bobbarala V, (eds). 1st ed. Rijeka: InTech. pp: 1-24.
- Sebola TE, Uche-Okerefor NC, Tapfuma KI, Mekuto L, Green E, Mavumengwana V. 2019. Evaluating antibacterial and anticancer activity of crude extracts of bacterial endophytes from *Crinum macowanii* Baker bulbs. *Microbiologyopen*. 8:1–10.
- Stefanovic O, Radojevic I, Vasic S, Comic LJ. 2012. Antibacterial activity of naturally occurring compounds from selected plants. In: *Antimicrobial Agents*. Bobbarala V, (eds). 1st ed. Rijeka: InTech. pp: 1-24. as effective biocontrol against chilli soilborne fungal phytopathogens. *Eur. J. Exp. Biol.* 2 (1): 163–173.
- SADRATI Nouari. 2021. Thèse doctorat. Isolement, identification et culture des champignons endophytes isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs.

- Sewelam N, Abo-Kassem EA, Sobhy S ien, Dowidar S. 2017. Roles of Calcium and ABA in Alleviating Drought Stress Effects on *Triticum aestivum* L . *Plants. Egypt J Experimental Biol.* 13:423–438.
- Teixeira TR, Dos Santos GS, Armstrong L, Colepicolo P, Debonsi HM. 2019. Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi. *Antibiotics.* 8:1–24.
- Teixeira TR, Dos Santos GS, Armstrong L, Colepicolo P, Debonsi HM. 2019. Antitumor potential of seaweed derived-endophytic fungi. *Antibiotics.* 8:1–24.
- Tabuc C. (2007). Flore fongique de différentes substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Université Bucarest. Toulouse.
- Tata CM, Ndinteh D, Nkeh-Chungag BN, Oyedeji OO, Sewani-Rusike CR. 2020. Fractionation and bioassay-guided isolation of antihypertensive components of *Senecio serratuloides*. *Cogent Med.* 7. Available from: <https://doi.org/10.1080/2331205X.2020.1716447> .
- Tsujibo, 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.
- Wang JF, Liang R, Liao SR, Yang B, Tu ZC, Lin XP, Wang BG, Liu Y. 2017. Vaccinols J–S, ten new salicyloid derivatives from the marine mangrove-derived endophytic fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. *Fitoterapia.* 120:164–170.
- Wang JT, Sheng WH, Wang JL, Chen D, Chen ML, Chen YC, et al. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:514-7.
- Xiaoling C., Xiaoli L., Shining Z., Junping G., Shuiping W., Xiaoming L., Zhigang S. and Yongcheng L. 2010. Cytotoxic and topoisomerase I inhibitory activities from extracts of

endophytic fungi isolated from mangrove plants in Zhuhai, China. *Journal of Ecology and The Natural Environment*; 2: 017-024.

Annexes

Annexe 01 : Matériel de laboratoire utilisé

Les appareils :

Nom de l'appareil	photo	Nom de l'appareil	Photo
Autoclave		Etuve	
Balance		réfrigérateur	
Hotte		Microscope	

<p>Agitateur</p>		<p>Centrifugeuse</p>	
<p>Four pasteur</p>		<p>UV-VIS Perkin Elmer</p>	
<p>Pompe de filtration</p>		<p>Evaporateur rotatif</p>	
<p>Pied à coulisse</p>			

Les matériels consommables :

Gants	Flacons 250 ml et 500 ml	pince	Eau javel
Bavette	Boite pétri en plastique	Tubes à essai en plastique	Alcool
Bec bunsen	Boite petri en verre	Gaz	Coton
Aiguilles	Pipettes pasteur	Ciseaux	Papier aluminium
Entonnoirs en verre	Lame et lamelle	Mèche à gaz	Papier filtre para-film
Eprouvettes graduées 500 ml 100 ml	Portoire	Eau distillé	

Annexe 02 : Composition des milieux de cultures

Milieu PDA (Potato Dextrose Agar) JOHNSON et BOOTH (1983) :	
pomme de terre	200g
Glucose	10g
Agar	20g
PH	6.5
Eau distillé	complété à 1000ml

Autoclavage	20 min 120°C
-------------	--------------

Milieu PDB (Potato Dextrose Broth) (JOHNSON et BOOTH, 1983).	
pomme de terre	200g
Glucose	10g
Eau distillé	complété à 1000ml
Autoclavage	20 min 120°C

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 de GN (géloe nutritive)	
Milieu MH (Muller hinton)	

Infusion de viande	2.0 g
Hydrolysate de caséine	17.5 g
Amidon de maïs	1.5 g
pH final	7.3 / -0.2
ca ²⁺	20 – 25 mg
Mg ²⁺	10 – 12.5 mg
Agar	15.0 g
Eau distillée	1 litre

Milieu HK (hektoene)	
Protéase peptone	1 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Thiosulfate de sodium	5 g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniacal	1.5 g
Salicine	2g
Lactose	12 g
Fuchsine acide	0.1 g
Bleu bromothymol	0.0645 g
Agar	14
PH final	7.5

Annexe 03 : Résultat de l'activité antibactérienne et antifongique

Tableau : Les zones d'inhibition de la technique cylindre d'agar en (mm) des 03 souches bactériennes et une levure vis-à-vis des filtrats de culture des souches *Aspergillus terreus*

Les souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	La zone d'inhibition en (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
T1172	3	-	-	11
T2257	-	3	-	4
B1283	-	-	-	-

Tableau : Les zones d'inhibition obtenir à partir la technique des disques de l'extrait brut (mm) des 03 souches bactériennes et une levure vis- à-vis des filtrats de culture des souches *Aspergillus terreus*

Souches d' <i>Aspergillus terreus</i>	souches bactériennes et levure solvants				Solvants	
	<i>E. coli</i>	<i>P.aeroginosa</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>	Acétate	Chloroforme
T2257	+(13)	-	+(22)	-	-	+
T1172	-	-	-	-	-	-
B1283	-	-	(20) +	-	+	-
AX10	0	0	0	0		
CTR30	23 mm	16 mm	0	0		
TOB10	28 mm	35 mm	24 mm	0		

Tableau : Les zones d'inhibition technique des disques de filtrat (mm) des 03 souches bactériennes et une levure vis- à-vis des filtrats de culture des souches *Aspergillus terrus*

La zone d'inhibition en (mm)	

Les souches d' <i>Asprgillus terrus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
T1172	-	-	-	-
T2257	-	-	-	-
B1283	-	-	-	-

Tableau : les zones d'inhibition technique des nanoparticules AgNPs (mm) des 03 souches bactériennes et une levure vis- à-vis des filtrats de culture des souches *Aspergillus terrus*

Les souches d' <i>Asprgillus terrus</i>	La zone d'inhibition en (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
T1172	-	-	22	-
T2257	-	-	-	-
B1283		-	-	-

Tableau : les zones d'inhibition technique des puits (mm) des 03 souches bactériennes et une levure vis- à-vis des filtrats de culture des souches *Aspergillus terrus*

Les souches d' <i>Asprgillus terrus</i>	La zone d'inhibition en (mm)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
T1172	-	-	-	-
T2257	-	-	-	-
B1283	-	-	-	-