

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**Université des Frères Mentouri-Constantine1**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire**



N° d'Ordre : 80/D3C/2019

N° de Série : 04/BIO/2019

**Thèse**

**En vue de l'obtention du diplôme de**  
**Doctorat 3ème Cycle**  
**Option : Biochimie Appliquée**

---

**Isolement et identification de souches d'*Aspergillus* de différents écosystèmes productrices de substances à activité antibactérienne et caractérisation partielle des molécules élaborées**

---

Présentée par :

**BRAMKI Amina**

**Soutenue le : 22/07/2019**

**Devant le jury :**

Président : Mr. BENSEGUENI A. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine1.  
Directeur de thèse : Mr. DEHIMAT L. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine 1.  
Examineurs : Mr. HAMIDECHI A. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine1.  
Mr. SOUMATI B. Prof. Université de Badji Mokhtar. Annaba.

**Année universitaire : 2018-2019**

## **Remerciements**

*Avant tout, je commencerai par remercier Dieu, le Tout Puissant, de m'avoir aidée et donné la volonté et la patience à mener à bien ce travail.*

*Je ne remercierai jamais assez : Monsieur DEHIMAT L., Professeur à l'Université des Frères Mentouri de Constantine et directeur de ma thèse qu'il a dirigée avec rigueur et beaucoup d'enthousiasme. Puisse-t-il trouver, à travers ces lignes, l'expression de mon profond respect et ma parfaite considération.*

*Un grand MERCI à Monsieur KACEM CHAOUICHE N., Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine, qui a amplement participé à la réalisation et au bon déroulement de ce travail. Qu'il me permet de lui exprimer mes sentiments les plus respectueux.*

*A Monsieur JAOUANI A., Maître de conférences à l'institut Supérieur des Sciences Biologiques (I.S.S.B.A.T) de Tunis, qui a amplement participé à la réalisation et au bon déroulement de ce travail. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire où j'ai beaucoup appris, échangé et tissé des relations avec toute l'équipe du laboratoire LMBA.*

*Des remerciements particuliers s'adressent à Monsieur le professeur DE PAUW E. et son équipe de laboratoire de Spectrométrie de Masse (LSM), l'institut de Chimie, Université de Liège, Belgique pour avoir accepté de m'accueillir aussi chaleureusement.*

*A Monsieur BENSEGUENI A., Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine, qui m'a fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. Qu'il trouve l'expression de mon profond respect et de ma parfaite considération.*

*Mes remerciements s'adressent également à Monsieur HAMIDECHI A., Professeur à l'université des frères Mentouri Constantine. Et à Monsieur SOUMATI B., Professeur à l'université de Badji Mokhtar Annaba, qui ont accepté de sacrifier de leur temps pour juger ce travail. Qu'ils me permettent de leur exprimer mes sentiments les plus respectueux.*

*Un grand MERCI à tous ceux qui m'ont aidé, m'ont conseillé, m'ont ouvert leurs portes, parfois même avec un sourire, et qui se reconnaîtront sans que je n'ai à citer leurs noms.*

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail en premier lieu aux êtres, les plus chers au monde : mes parents.*

*Quoi que je fasse je ne pourrais leur rendre ce qu'ils ont fait pour moi, si je suis arrivée là c'est bien grâce à eux que dieu les bénisse, et leur accorde longue vie et les protège.*

*A mes frères Achraf et Ouassim*

*A toute ma famille et A toutes mes amies.*

## *Table des matières*

<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
------------------------------------	----------

### **Revue bibliographique**

1. Les bactéries.....	4
1.1. Généralité.....	4
1.2. Pouvoir pathogène.....	4
2. Les infections bactériennes et l'antibiothérapie.....	4
3. Les antibiotiques.....	5
3.1. Définition.....	5
3.2. Classification des antibiotiques.....	6
3.3. Mode d'action des antibiotiques.....	8
3.3.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi.....	8
3.3.2. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique.....	10
3.3.3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs.....	10
3.3.4. Antibiotiques inhibiteurs de voies métaboliques.....	11
4. La résistance aux antibactériens.....	11
4.1. Evolution de la résistance bactérienne au cours du temps.....	12
4.2. Types et mécanismes de résistance.....	14
4.2.1. Types de résistance.....	14
4.2.1.1. La résistance naturelle.....	14
4.2.1.2. La résistance acquise.....	14

4.2.1.3. Autres résistances : croisée/associée.....	16
4.2.2. Les mécanismes de résistance.....	16
4.2.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques.....	17
4.2.2.2. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques.....	19
4.2.2.3. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques.....	22
5. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne.....	23
6. Généralités sur les mycètes.....	24
7. Les <i>Aspergillus</i> .....	26
7.1. Habitats.....	26
7.2. Taxonomie.....	27
7.3. Caractères morphologiques.....	27
7.3.1. Caractères macroscopiques.....	27
7.3.2. Caractères microscopiques.....	27
7.4. Identification moléculaire.....	28
7.5. Les <i>Aspergillus</i> : source d'une variété de métabolites secondaires.....	29
7.5.1. Généralités.....	29
7.5.2. Les différentes classes des métabolites secondaires.....	31
7.5.3. Métabolites secondaires rencontrés chez les <i>Aspergillus</i> .....	31

## **Partie expérimentale**

### **Chapitre I : Isolement et identification des souches fongiques du genre *Aspergillus***

1. Matériel et méthodes.....	34
1.1. Prélèvement des échantillons.....	34

1.2. Isolement.....	35
1.3. Purification.....	35
1.4. Conservation des isolats.....	36
1.5. Identification des isolats fongiques.....	36
1.5.1. Identification morphologique.....	36
1.5.1.1. Etude macroscopique.....	36
1.5.1.2. Etude microscopique.....	37
1.5.2. Identification moléculaire.....	37
1.5.2.1. Préparation des cultures.....	37
1.5.2.2. Extraction d'ADN génomique.....	37
1.5.2.3. Quantification de l'ADN.....	38
1.5.2.4. Amplification de l'ADN par PCR.....	38
1.5.2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	39
1.5.2.6. Purification des fragments d'ADN.....	39
1.5.2.7. Séquençage.....	39
1.5.2.8. Comparaison des séquences avec la banque bioinformatique.....	40
2. Résultats .....	42
2.1. Isolement des champignons du genre <i>Aspergillus</i> .....	42
2.2. Identification des isolats.....	42
2.2.1. Caractères morphologiques et culturels.....	42
2.2.3. Amplification et séquençages de l'ARNr 18S avec des amorces universelles...	45
3. Discussion.....	48

## **Chapitre II: Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

1. Matériel et méthodes.....	51
1.1. Souches bactériennes.....	51
1.1.1. Confirmation de la pureté des bactéries tests.....	52
1.1.2. Identification des souches cliniques au niveau de l'espèce.....	52
1.1.3. Conservation des souches bactériennes.....	55
1.1.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	55
1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	56
1.2.1. Technique des cylindres d'agar.....	57
1.2.2. Techniques des disques et des puits.....	57
1.2.2.1. Fermentation.....	57
1.2.2.2. Technique des disques.....	58
1.2.2.3. Technique des puits.....	58
2. Résultats.....	59
2.1. Confirmation de la pureté des bactéries tests.....	59
2.2. Identification des souches cliniques au niveau de l'espèce.....	60
2.3. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques.....	60
2.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	63
2.4.1. Technique des cylindres d'agar.....	63
2.4.2. Techniques des disques et des puits.....	64
2.4.2.1. Technique des disques.....	64
2.4.2.2. Techniques des puits.....	65
3. Discussion.....	67

## **Chapitre III : Etude préliminaire de l'activité antibactérienne**

1. Matériel et méthodes.....	71
1.1. Choix du solvant optimum pour l'extraction des molécules bioactives.....	71
1.2. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne.....	74
1.3. Choix du milieu optimum pour la production des substances bioactives.....	74
1.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits organiques par le système des micro-cultures (Biolog).....	74
1.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	76
2. Résultats.....	77
2.1. Choix du solvant optimum pour l'extraction des molécules bioactives.....	77
2.2. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne.....	79
2.3. Choix du milieu optimum pour la production des substances bioactives.....	82
2.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits organiques par le système des micro-cultures (Biolog).....	84
2.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide.....	90
3. Discussion.....	91

## **Chapitre IV : Etude préliminaire des molécules bioactives**

1. Matériel et méthodes.....	94
1.1. Préparation des échantillons.....	94
1.2. Fractionnement sur colonne.....	94
1.3. Chromatographie sur couche mince.....	95
1.4. Analyse par (LC/MS) et (LC/MS/MS).....	95
1.4.1. Préparation de l'échantillon.....	96

1.4.2. Chromatographie Liquide Ultra Performance.....	96
1.4.3. Spectrométrie de masse.....	97
1.4.3.1. Principe.....	97
1.4.3.2. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation (LC-ESI-MS et LC/MS/MS).....	99
2. Résultats.....	101
2.1. Séparation chromatographique.....	101
2.2. Analyse par (LC/MS) et (LC/MS/MS).....	101
3. Discussion.....	107
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>109</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>112</b>
<b>Annexes</b>	

## *Liste des Figures*

<b>Figure 1:</b> Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques.....	8
<b>Figure 2:</b> Corrélation de la mise sur le marché des antibiotiques et de l'identification des premières résistances bactériennes.....	13
<b>Figure 3:</b> Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries.....	15
<b>Figure 4:</b> Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	17
<b>Figure 5:</b> Système d'efflux bactérien.....	19
<b>Figure 6:</b> Inactivation enzymatique de l'antibiotique par les $\beta$ -lactamases.....	20
<b>Figure 7:</b> Résistance aux $\beta$ -lactames due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PLP suite à une mutation.....	23
<b>Figure 8:</b> Structure d'un hyphes et son développement vers la formation d'un mycélium.....	25
<b>Figure 9:</b> Schéma d'une tête aspergillaire.....	28
<b>Figure 10:</b> Représentation d'une unité d'ADN ribosomique.....	29
<b>Figure 11 :</b> La méthode de suspension-dilution.....	35
<b>Figure 12:</b> Etapes de l'identification phylogénique des isolats fongiques.....	41
<b>Figure 13:</b> Séparation sur gel d'agarose (1.5%) des produits d'amplification par PCR des ADN des isolats d' <i>Aspergillus</i> .....	46
<b>Figure 14:</b> Etapes d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.....	54
<b>Figure 15 :</b> Aspect macroscopique des bactéries tests.....	annexe4
<b>Figure 16 :</b> Aspect microscopique des bactéries tests.....	annexe4
<b>Figure 17:</b> Procédé d'extraction des métabolites secondaires des souches fongiques.....	73

<b>Figure 18:</b> Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique <i>A. quadrilineatus</i> .....	78
<b>Figure 19:</b> Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique <i>A. niveus</i> .....	78
<b>Figure 20:</b> Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique <i>A. wentii</i> .....	78
<b>Figure 21:</b> Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. quadrilineatus</i> après le traitement.....	79
<b>Figure 22:</b> Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche <i>A. quadrilineatus</i> après le traitement.....	79
<b>Figure 23:</b> Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche <i>A. quadrilineatus</i> après le traitement.....	79
<b>Figure 24:</b> Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche <i>A. quadrilineatus</i> après le traitement.....	79
<b>Figure 25:</b> Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. niveus</i> après le traitement.....	80
<b>Figure 26:</b> Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche <i>A. niveus</i> après le traitement.....	80
<b>Figure 27:</b> Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche <i>A. niveus</i> après le traitement.....	80
<b>Figure 28:</b> Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche <i>A. niveus</i> après le traitement.....	80
<b>Figure 29:</b> Effet antibactérien de l'extrait d'hexane de la souche <i>A. niveus</i> après le traitement.....	81
<b>Figure 30:</b> Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. wentii</i> après le traitement.....	81

<b>Figure 31:</b> Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche <i>A. wentii</i> après le traitement.....	81
<b>Figure 32:</b> Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche <i>A. wentii</i> après le traitement.....	82
<b>Figure 33:</b> Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche <i>A. wentii</i> après le traitement.....	82
<b>Figure 34:</b> Effet antibactérien de l'extrait d'hexane de la souche <i>A. wentii</i> après le traitement.....	82
<b>Figure 35:</b> Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique <i>A. quadrilineatus</i> .....	83
<b>Figure 36:</b> Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique <i>A. niveus</i> .....	83
<b>Figure 37:</b> Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique <i>A. wentii</i> .....	84
<b>Figure 38:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. quadrilineatus</i> avec différentes concentrations (de 100 à 25mg/ml).....	85
<b>Figure 39:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. niveus</i> avec différentes concentrations (de 100 à 25mg/ml).....	86
<b>Figure 40:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. wentii</i> avec différentes concentrations (de 100 à 25mg/ml).....	86
<b>Figure 41:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. quadrilineatus</i> avec différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/ml).....	87

<b>Figure 42:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. niveus</i> avec différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/ml).....	87
<b>Figure 43:</b> Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche <i>A. wentii</i> avec différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/ml).....	88
<b>Figure 44:</b> Source d'ionisation par électronébulisation.....	98
<b>Figure 45:</b> Construction de spectromètre de masse Q-exactive.....	99
<b>Figure 46:</b> Système UPLC couplé à la spectrométrie de masse.....	100
<b>Figure 47:</b> Chromatogramme UPLC de la fraction active de la souche <i>A. quadrilineatus</i> ...	102
<b>Figure 48:</b> Somme des spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour la fraction active de la souche <i>A. quadrilineatus</i> .....	102

## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau 1:</b> Principales familles d'antibiotiques.....	7
<b>Tableau 2:</b> Espèces du genre <i>Aspergillus</i> productrices d'antibiotiques.....	33
<b>Tableau 3:</b> Aspects macroscopiques et microscopiques des souches représentant les dix groupes phénotypiques d' <i>Aspergillus</i> sélectionnés .....	43
<b>Tableau 4:</b> Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank.....	47
<b>Tableau 5:</b> Les différentes bactéries tests et leurs milieux convenables.....	52
<b>Tableau 6:</b> Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.....	54
<b>Tableau 7:</b> Diamètres critiques pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations du CASFM.....	56
<b>Tableau 8:</b> Description macroscopique des bactéries tests.....	59
<b>Tableau 9:</b> Description microscopique des bactéries tests.....	59
<b>Tableau 10:</b> Résultats d'identification des bactéries tests par MALDI-TOF MS.....	60
<b>Tableau 11:</b> Sensibilité des bactéries tests aux antibiotiques.....	62
<b>Tableau 12:</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres d'agar.....	63
<b>Tableau 13:</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques.....	65
<b>Tableau 14:</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits.....	66
<b>Tableau 15:</b> Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique <i>A. quadrilineatus</i> sur les bactéries tests.....	89

<b>Tableau 16:</b> Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique <i>A. niveus</i> sur les bactéries tests.....	89
<b>Tableau 17:</b> Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique <i>A. wentii</i> sur les bactéries tests.....	89
<b>Tableau 18:</b> Programme de gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite.....	97
<b>Tableau 19:</b> Les différents composés détectés dans la fraction active par analyse UPLC-SM.....	104
<b>Tableau 20:</b> Les différents composés détectés avec leurs fragments MS/MS.....	105

## *Liste des abréviations*

**ATCC** : American Type Culture Collection

**$\alpha$ -HCCA** : Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic Acid

**BLAST**: Basic Local Aligement Search Tool

**BLASTn** : BLAST Nucleotide

**BLSE** : Bêta-Lactamases à Spectre Etendu

**CASFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CCD** : Charge-Coupled Device

**CCM** : Chromatographie sur Couche Mince

**DMSO** : dimethylsulfoxyde

**dNTP**: Mélange des quatre désoxyribonucléotides

**EDTA**: Éthylène Diamine Tétra-Acétique

**ERG** : Entérocoques Résistantes aux Glycopeptides

**ESI** : Electrospray Ionization

**GISA** : *Staphylococcus aureus* de sensibilité intermédiaire aux glycopeptides

**HCD** : Higher-energy Collisional Dissociation

**ITS** : Internal Transcribed Spacer

**LC/MS** : Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse

**MALDI-TOF MS**: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry

**MDR**: Multi-Résistance aux Drogues

**MEA** : Malt Extract Agar

**MEB** : Malt Extract Broth

**MLS** : Macrolides, Lincosamides, Streptogramines

**MS** : Spectrométrie de masse

**MS/MS** : Spectrométrie de masse en tandem

**m/z** : Rapport masse sur charge

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**PDB** : Potatoes dextrose broth

**PLP** : Proteines Liant la Penicilline

**PRP** : Pneumocoques résistantes aux pénicillines

**PSDP** : Pneumocoques à Sensibilité Diminuée aux Pénicillines

**Rf** : rapport frontal

**SARM** : *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline

**SARV** : *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine

**TBE** : Tris-Borate-EDTA

**TSA** : Trypticase Soy Agar

**UDP**: Uridine Diphosphate

**UFC** : Unité Formant Colonie

**UPLC** : Ultra Performance Liquid Chromatography

# *Introduction générale*

## *Introduction*

---

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques. Dès lors, la quête des substances anti-infectieuses est devenue un intérêt de santé publique. À partir d'une succession d'observations et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne puis Fleming, la quête a abouti à la découverte des antibiotiques. Depuis cette découverte, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne (Moroh, 2013).

L'introduction et l'utilisation en clinique des premières classes de ces molécules ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. L'efficacité de l'antibiothérapie dans le contrôle et la limitation de la dissémination des agents pathogènes a ainsi fait naître l'espoir de pouvoir éradiquer l'ensemble des maladies infectieuses. Malheureusement, l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques a mis un terme à cette vague d'optimisme (El Amri *et al.*, 2014).

L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines, et érythromycine, par ordre chronologique d'utilisation) fut suivie d'une évolution comparable. En fait, si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, surtout bactériennes, il n'en a nullement modifié la morbidité. Cet usage fréquemment abusif, est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec, pour conséquence, une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques (Loucif, 2011).

La résistance aux antibiotiques apparaisse plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé. Il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes. Le mécanisme de résistance peut avoir comme support génétique un gène d'origine plasmidique ou chromosomique. La réponse de la bactérie est souvent complexe, il peut s'agir d'empêcher l'antibiotique de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne, d'inactiver le xénobiotique par des enzymes ou modifier le site d'action de l'antibiotique, voire de synthétiser des systèmes additionnels qui permettent de contourner l'action de l'antibiotique, voire de le refouler activement à l'extérieur (efflux) (Kitouni, 2007).

Aujourd'hui, cette résistance bactérienne aux antibiotiques, constitue l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Chaque jour, de nouveaux mécanismes de résistance

voient le jour et se propagent à l'échelle mondiale, compromettant notre capacité de traiter les maladies infectieuses les plus courantes (Azoun, 2016).

Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques restent absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules. Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (Madigan et Martinko, 2007 ; Saisivam *et al.*, 2008 ; Berger Savin, 2014). Dans les années 1990, la découverte de métabolites bioactifs d'origine microbienne a progressé de manière exponentielle grâce aux progrès technologiques. Malheureusement, parmi les métabolites découverts, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs. La découverte de nouvelles familles chimiques innovantes se raréfie (Berdy, 2005). Face à ces besoins émergent et aux germes multirésistants, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que ce soit par : l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées, la réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connue, la synthèse de nouveaux dérivés ou l'obtention de nouvelles substances produites par de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés (Sharma *et al.*, 2005 ; Kitouni, 2007), c'est cette dernière voie que nous avons adopté lors de notre étude.

En fait, la principale source d'antibiotiques est représentée par les microorganismes qui, depuis longtemps font l'objet de nombreuses recherches et ont permis et permettent toujours la découverte de métabolites secondaires intéressants et exploitables par l'homme (Breton *et al.*, 1989). Cependant, les champignons ont été largement étudiés dans ce domaine. Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons (Botton *et al.*, 1990). Parmi ces derniers en citant les espèces du genre *Aspergillus* qui sont très connues par leur production des métabolites secondaires à effet antibactérien (Abu-Seidah, 2003 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Abdelaziz, 2006).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont le premier objectif consiste à l'étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques du genre *Aspergillus* isolées à partir d'écosystèmes particuliers. Mais au-delà de cet objectif primaire, cette étude est réalisée dans le but de caractériser les molécules bioactives, éventuellement, produites par ces souches fongiques.

## *Introduction*

---

La première partie de notre travail est consacrée à la description de données bibliographiques relatives aux antibiotiques, à la résistance bactérienne, au genre *Aspergillus* d'une manière générale et enfin aux antibiotiques synthétisés par les espèces de ce genre.

La seconde partie est structurée en quatre chapitres composés chacun d'une partie illustrant les différentes techniques utilisées et d'une autre exposant, comparant et discutant les résultats obtenus :

- Le chapitre 1 concerne l'isolement des souches fongiques du genre *Aspergillus* à partir des sols prélevés d'écosystèmes particuliers et leur identification par l'utilisation des techniques morphologiques et moléculaires.
- Dans le chapitre 2 nous nous intéressons à la mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques isolées vis-à-vis des bactéries tests (sensibles et résistants) et ceci par l'utilisation de différentes méthodes.
- Dans le chapitre 3, le solvant organique le plus adéquat à l'extraction, la stabilité thermique et le milieu de fermentation optimal pour la production des métabolites bioactifs sont déterminés pour chaque souche fongique criblée au préalable.
- Le chapitre 4 regroupe les étapes de séparation, et de caractérisation des molécules bioactives élaborées par les souches fongiques par application des techniques chromatographiques séparées et couplées avec des techniques de détection (Spectrométrie de masse simple et spectrométrie de masse en tandem).

Enfin, la dernière partie rassemble la conclusion générale et met en évidence les perspectives de recherche.

*Revue  
bibliographique*

## **1. Les bactéries**

### **1.1. Généralité**

Les bactéries sont des organismes minuscules que l'on trouve à peu près partout (ubiquitaire). Elles manifestent leur présence par les blessures qui s'infectent, le lait qui surnit ou la viande qui se putréfie, etc. (Singleton, 1999).

L'organisation cellulaire des bactéries est fondamentalement différente de celle de toutes les autres cellules vivantes ; elles n'ont pas de noyau et leur génome est le plus petit des cellules vivantes. Elles ont des taux de croissance exceptionnellement courts. Elles se présentent sous des formes et des tailles diverses, génétiquement déterminées et caractéristiques de l'espèce (Bousseboua, 2005).

### **1.2. Pouvoir pathogène**

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

Les facteurs de virulence, ou facteurs de pathogénicité, regroupent l'ensemble des éléments qui concourent à l'apparition de la maladie. Dans l'infection, il s'agit des capacités bactériennes à adhérer, à coloniser, à envahir et à proliférer dans les tissus. Dans l'intoxication, c'est la toxine qui est le facteur de virulence puisqu'elle peut provoquer la maladie même en l'absence de l'organisme producteur, comme c'est le cas de la toxine botulinique par exemple (Singleton, 1999 ; Bousseboua, 2005).

## **2. Les infections bactériennes et l'antibiothérapie**

Les maladies infectieuses, censées être vaincues par le progrès en matière d'hygiène, les succès réels dans le domaine de la prévention et des traitements antibiotiques, le développement des vaccins et l'amélioration des conditions de vie en général, demeurent la principale cause de mortalité dans le monde selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) avec 14,7 millions de morts en 2001 soit 26 % de la mortalité mondiale.

Elles comportent un risque de prolifération rapide, d'émergence ou de réémergence du fait principalement des changements environnementaux et sociaux associés à la rapidité, la facilité et à l'intensité accrue des transports internationaux qui favorisent la dissémination rapide des phénomènes épidémiques.

L'émergence des résistances aux médicaments anti-infectieux se développe en raison de leur pression de sélection mais aussi de leur mauvaise utilisation. Enfin, les maladies infectieuses se caractérisent par des disparités, souvent importantes, entre les pays dans l'élaboration et la mise en œuvre des stratégies de lutte.

Il est donc essentiel de reconnaître leur importance, de prendre la mesure de leurs risques, et de mettre en œuvre des politiques adéquates de lutte et de prévention à l'échelon national, régionale et internationale (Mesbah, 2009).

### **3. Les antibiotiques**

#### **3.1. Définition**

Depuis celle donnée par Waksman en 1942, la définition d'un antibiotique a connu plusieurs évolutions. À l'heure actuelle, le terme antibiotique désigne toute substance naturelle ou synthétique, d'origine microbienne ou dérivée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la vitalité des microorganismes (Walsh, 2003 ; Zomahoun, 2005).

En effet, les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés (Newman *et al.*, 2003 ; Singh et Barrett, 2006). Les antibiotiques synthétiques sont obtenus, soit à partir de dérivés totalement artificiels, soit en recréant des substances initialement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi-synthétiques sont issus de la modification, en laboratoire, de substances produites par des microorganismes (Guinoiseau, 2010).

L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large.

Les molécules d'antibiotiques doivent être idéalement les plus toxiques pour les bactéries et les moins toxiques pour les cellules de l'organisme qui les hébergent (Gaudy, 2005). L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries. Ainsi, ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont qualifiés de «bactériostatiques» alors que ceux qui tuent les bactéries sont dits «bactéricides».

L'administration d'antibiotiques bactériostatiques suffit généralement pour arrêter un processus infectieux, le système immunitaire de l'hôte se chargeant d'éliminer les bactéries restantes. Cependant, chez les sujets immunodéprimés, le recours à un antibiotique bactéricide est recommandé (Prescott, 2003 ; Guinoiseau, 2010).

### **3.2. Classification des antibiotiques**

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs origines, leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques (Yala *et al.*, 2001). En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles-mêmes divisées en plusieurs classes. Les plus courantes sont répertoriées dans le tableau (1).

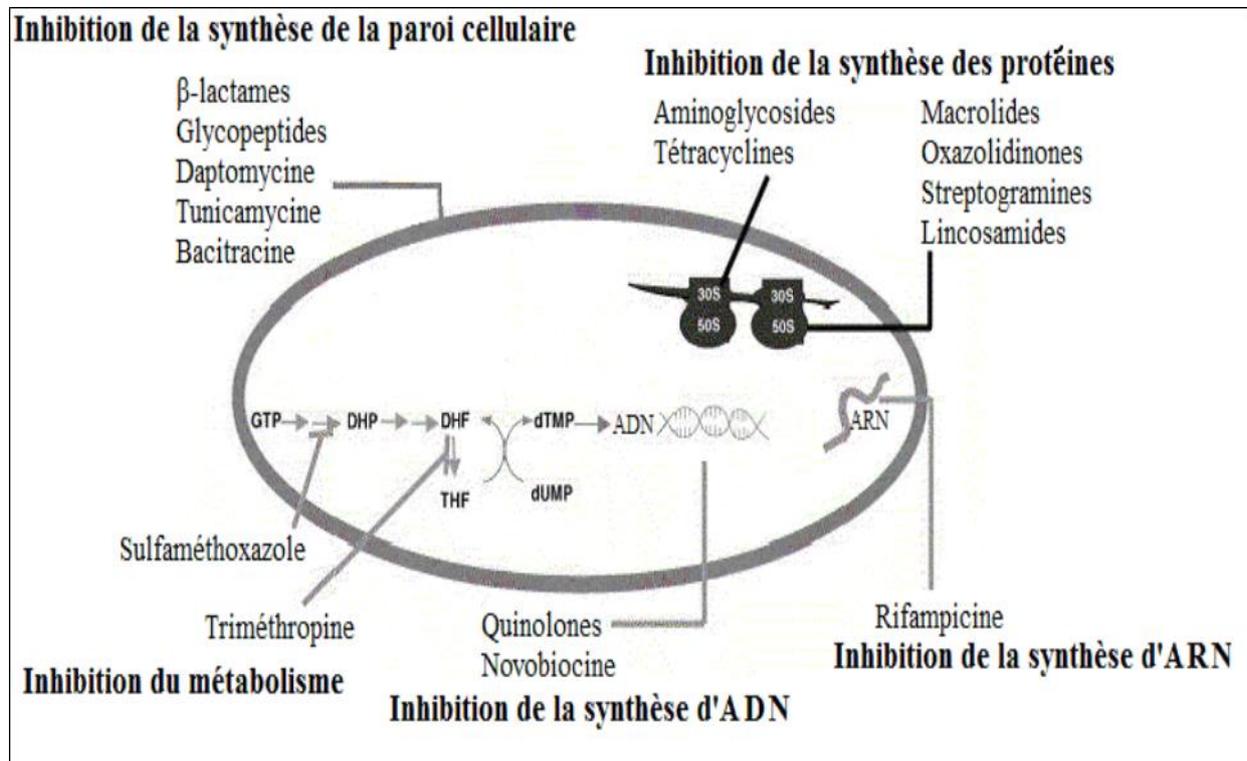
**Tableau 1:** Principales familles d'antibiotiques (Robert-Dernuet, 1995).

<b>Famille</b>	<b>Antibiotiques</b>
BETA-LACTAMINES	Pénicillines G Pénicillines V Oxacilline (mécicilline) Ampicilline Amoxicilline Carbénicilline Ticarcilline Pipéracilline
AMINOSIDES	Streptomycine Neomycine Kanamycine Nétilmycine Tobramycine Gentamicine Amikacine
TETRACYCLINES	Tétracycline Chlortétracycline Oxytétracycline Doxycycline Minocycline
PHENICOLES	Thiamphénicol Chloramphénicol
SULFAMIDES	Sulfadiazine Sulfamoxole Sulfisoxasole Sulfaméthoxazole
DIAMINOPYRIMIDINES	Triméthoprim
QUINOLONES	Acide naldixique Acide oxolinique Enoxacine Norfloxacin Ciprofloxacine Ofloxacin

### 3.3. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte (Smaoui, 2010).

Comme le montre la figure (1), le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre ; ils peuvent inhiber la biosynthèse des acides nucléiques (ADN et ARN), interférer avec les voies métaboliques, mais leurs cibles principales sont la paroi cellulaire et les ribosomes bactériens (Guinoiseau, 2010).



**Figure 1:** Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Singh et Barrett, 2006).

Avec DHP : dihydroptéroate ; DHF : dihydrofolate ; THF : tétrahydrofolate.

#### 3.3.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi

La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : la première qui se passe à l'intérieur de la bactérie, consiste en la formation des unités de base, l'UDP-N-acétylglucosamine et l'UDP-N-acétylmuramyl pentapeptide. La deuxième étape permet le

passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide. Au cours de la troisième étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade, deux enzymes essentielles interviennent : une transglycosylase qui permet l'attachement des disaccharides-pentapeptides entre elles aboutissant à la formation des chaînes polysaccharidiques, et une transpeptidase qui réticule les chaînes entre elles par formation d'une liaison peptidique entre l'alanine-4 d'un disaccharide –pentapeptide et le peptide d'une chaîne voisine (Smaoui, 2010).

Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple :

- **Les  $\beta$ -lactames** inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane en se fixant sur des protéines de la membrane cytoplasmique : les protéines liant les pénicillines (PLP), ce sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane : les transpeptidases, les carboxypeptidases et les transglycosylases. Les  $\beta$ -lactamines bloquent leur fonctionnement en inhibant ainsi la formation du peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2007).

Les  $\beta$ -lactamines exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier. Le blocage de la multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (Calamita et Doyle, 2002).

- **Les glycopeptides** sont au même titre que les  $\beta$ -lactamines des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane. Leur fixation sur la membrane cytoplasmique entraîne une inhibition de la transglycosylase et la transpeptidase nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2007).
- **La fosfomycine** agit sur des étapes précoces de la synthèse du peptidoglycane (Kahan *et al.*, 1974). En effet, la fosfomycine se comporte comme un analogue du phosphoénolpyruvate et inhibe l'enzyme pyruvyl-transférase (ou pyruvate-UDP-N-acétylglucosamine-transférase), ce qui a pour conséquence de bloquer la formation d'acide N-acétylmuraminique (Smeyers *et al.*, 1983).

### **3.3.2. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse protéique**

Ces antibiotiques agissent préférentiellement sur la sous-unité 30S et/ou la sous-unité 50S des ribosomes et cela au niveau de l'une des étapes principales de la traduction. Pour ce mode d'action on peut citer ;

- **Les phénicol**s, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl. Ils inhibent l'élongation de la chaîne peptidique ce qui arrête le mouvement des ribosomes le long de l'ARN messager (Prescott *et al.*, 2007).
- **Les tétracyclines**, qui se fixent sur le ribosome au niveau du site aminoacyl et aussi au niveau du site peptidyl. La conséquence est l'arrêt de la fixation du nouvel aminoacyl-tRNA sur le ribosome et un arrêt de l'élongation des chaînes peptidiques (Zomahoun, 2005).
- **L'acide fusidique**, qui en se liant au site aminoacyl, bloque l'adjonction d'un nouvel acide aminé dans la chaîne peptidique en formation (blocage de la translocation) (Philippon, 2006).
- **Les aminosides**, agissent sur divers métabolismes cellulaires dont la synthèse des protéines. Ils pénètrent dans le cytoplasme par un mécanisme actif nécessitant de l'énergie (systèmes de transporteurs d'électrons et ATP). Ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la traduction. En effet, ils provoquent des erreurs de lecture du message porté par l'ARN messager ce qui engendre plusieurs perturbations : altération fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, blocage des systèmes de sécrétion et de respiration, etc. (Carter *et al.*, 2000 ; Madigan et Martinko, 2007).
- **Les macrolides**, inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome, et bloquent les réactions de transpeptidation (streptogramines inhibant la fixation des aminoacyl-ARNt) et/ou de translocation (macrolides qui se fixent au niveau du site Aminoacyl) (Philippon, 2006).

### **3.3.3. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques et de leurs précurseurs**

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, et un deuxième groupe intervient au niveau de leurs précurseurs de synthèse. Dans le premier groupe on peut distinguer :

- **Les quinolones** qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN telles que les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN.
- **Les nitroimidazoles** sont des antibiotiques limités aux bactéries anaérobies. La condition nécessaire à l'activité de ces antibiotiques est la réduction partielle de leurs groupements  $\text{NO}_2$ . Les dérivés réduits se fixent sur l'ADN, notamment au niveau des régions riches en adénine et en thymine, provoquant ainsi des coupures des brins et le déroulement de l'ADN (Le Minor et Veron, 1989).
- **Les nitrofuranes** nécessitent la réduction préalable du groupement  $\text{NO}_2$  pour leur action. Cette réduction est réalisée par les nitroréductases des bactéries aérobies. Les dérivés réduits réagissent de façon électrostatique avec l'ADN, provoquant ainsi des coupures, substitutions de bases et même un effet mutagène.

Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines (Smaoui, 2010).

### **3.3.4. Antibiotiques inhibiteurs de voies métaboliques**

Chez les procaryotes, le métabolisme procède de voies très variées car ils ont acquis une capacité d'adaptation à la vie dans des milieux nutritifs et des conditions de survie très différents des eucaryotes. Malgré ce fait, le nombre de molécules d'antibiotiques agissant à ce niveau et utilisables en clinique est très réduit (Van Bambeke et Tulkens, 2009).

## **4. La résistance aux antibactériens**

La découverte des antibiotiques à la fin des années 1940 a marqué une étape capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces traitements ont permis d'épargner un grand nombre de vies et l'on a cru, un peu trop vite, que les maladies infectieuses seraient un jour toutes jugulées. En effet, cette introduction aurait dû provoquer une catastrophe chez les microbes, mais leur plasticité génétique leur a permis, non seulement de survivre, mais même de prospérer dans cet environnement hostile. Ainsi, on assiste de plus en plus au développement de souches microbiennes résistantes aux molécules bioactives. Plus la résistance est élevée, plus on prescrit de biomolécules et on favorise l'émergence de nouvelles résistances et la

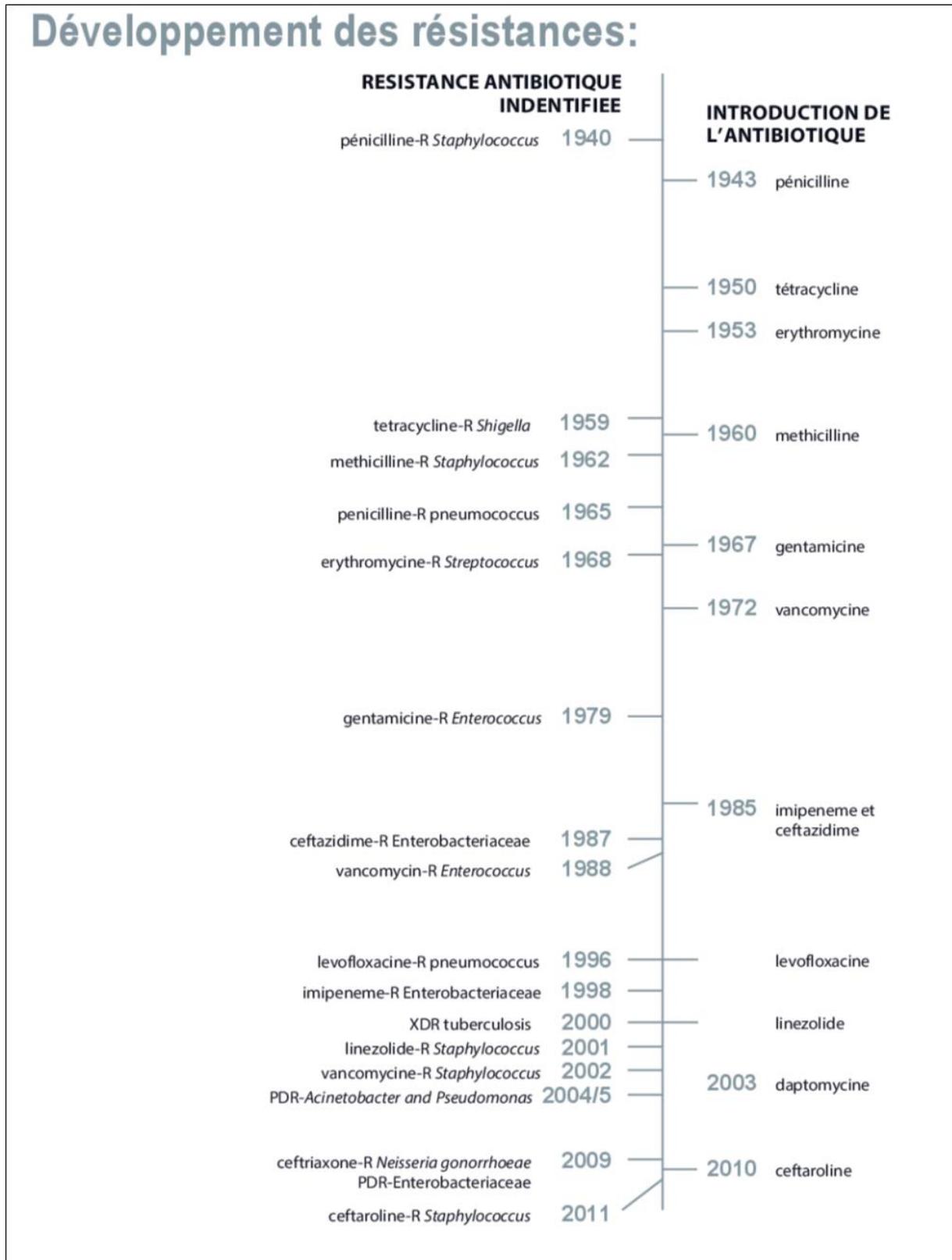
survenue d'infections incurables. On assiste à une sorte de spirale infernale de la résistance, avec ses graves conséquences médicales (Smaoui, 2010).

#### **4.1. Evolution de la résistance bactérienne au cours du temps**

Les résistances s'étendent quantitativement mais aussi qualitativement. Depuis plus de 20 ans, de nombreux déterminants de résistance ont été décrits avec l'émergence de bactéries de plus en plus résistantes (Alekhshun et Levy, 2007). C'est le cas des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (SARM), à la vancomycine (SARV) ou de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA), des souches de pneumocoques de sensibilité diminuée ou résistantes aux pénicillines (PSDP et PRP, respectivement), des souches d'entérocoques résistantes aux glycopeptides (ERG), des souches d'entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases ou des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Des souches de SARM résistantes à la daptomycine, antibiotique agréé depuis 2003, ont récemment été identifiées (Mangili *et al.*, 2005 ; Marty *et al.*, 2006).

L'impact de cette multi-résistance aux antibiotiques est important au niveau clinique, en termes de morbidité et de mortalité, mais aussi sur le plan économique car les infections liées aux bactéries multi-résistantes engendrent des coûts d'hospitalisation élevés (Cosgrove *et al.*, 2005 ; Maragakis *et al.*, 2008). L'extension géographique des résistances se produit au niveau international (Boras *et al.*, 2001). Les infections causées par les bactéries résistantes et multi-résistantes, autrefois cantonnées au milieu hospitalier, deviennent communautaires (extra-hospitalières) (Maltezou et Giamarellou, 2006). Ainsi, le nombre de personnes, susceptibles d'être exposées aux bactéries résistantes et multi-résistantes, est continuellement démultiplié.

Une simple étude historique permet de corréliser la mise sur le marché d'un antibiotique et l'apparition de ses premières résistances comme l'illustre la figure (2).



**Figure 2:** Corrélation de la mise sur le marché des antibiotiques et de l'identification des premières résistances bactériennes (Mangin, 2016).

## **4.2. Types et mécanismes de résistance**

Les bactéries peuvent accroître leur résistance aux antibiotiques (qui se caractérise par son caractère naturel ou acquis) par une multitude de mécanismes dont la nature et l'efficacité varient suivant les espèces et les antibiotiques considérés (Yala *et al.*, 2001 ; Courvalin *et al.*, 2006).

### **4.2.1. Types de résistance**

#### **4.2.1.1. La résistance naturelle**

La résistance naturelle ou intrinsèque est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes).

L'expression de ce caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques. Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, ou l'absence de cible sont autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle (Guinoiseau, 2010 ; Lozniewski et Rabaud, 2010).

Exemple de résistances naturelles :

1/ *Klebsiella spp.* produit naturellement des bêta-lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne ;

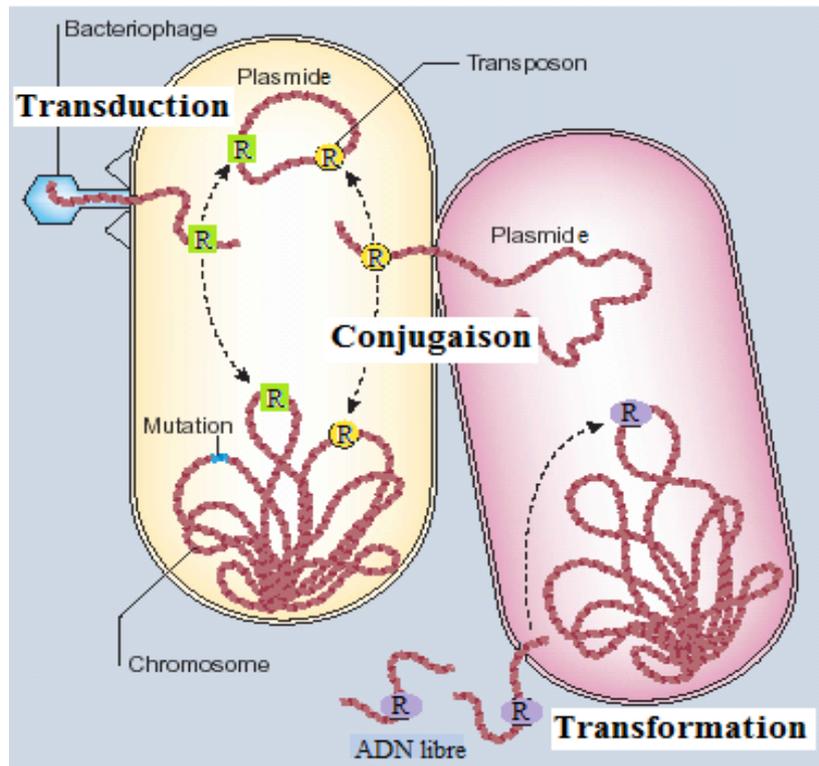
2/ les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides car le passage des aminosides à travers la membrane cytoplasmique nécessite un système de transport actif absent chez les anaérobies.

#### **4.2.1.2. La résistance acquise**

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Elle est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien. Cette résistance peut être acquise par mutation ou par transfert de gènes (Lozniewski et Rabaud, 2010).

La résistance acquise par mutation est aussi qualifiée de résistance chromosomique. Le phénomène de mutation est conditionné par l'utilisation des antibiotiques. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. En éliminant les bactéries sensibles, les antibiotiques permettent aux mutants résistants de se multiplier plus facilement. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine (Goossens *et al.*, 2006). Ces prescriptions sont souvent mal ciblées, comme dans les cas d'infections virales, ou incorrectement dosées. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (Yagupsky, 2006).

La transmission d'éléments génétiques mobiles, comme les plasmides et les transposons, favorise également l'acquisition des résistances par les bactéries. Elle peut s'effectuer par transduction, conjugaison ou transformation (Figure 3)



**Figure 3:** Les différents modes d'acquisition des gènes de résistance (R) aux antibiotiques chez les bactéries (Levy et Marshall, 2004).

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique de l'opéron vanA, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis* (Alekshun et Levy, 2007).

#### **4.2.1.3. Autres résistances : croisée/associée**

La résistance croisée est la conséquence d'un seul mécanisme biochimique et concerne des antibiotiques qui n'appartiennent pas forcément à la même famille, comme par exemple la résistance aux MLS (Macrolides, lincosamides, streptogramines) conférée par méthylation de l'ARN 23S.

La résistance associée est la conséquence de plusieurs mécanismes biochimiques et concerne des antibiotiques qui appartiennent à des familles différentes (Mangin, 2016).

#### **4.2.2. Les mécanismes de résistance**

Pour lutter contre l'action des antibiotiques, les bactéries ont élaboré plusieurs stratégies. Certaines ciblent directement les antibiotiques tandis que d'autres sont dirigées contre les mécanismes cellulaires, impliqués dans le transport de ces substances.

Aux niveaux physiologique et moléculaire, la résistance bactérienne est la résultante de trois phénomènes : la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique par diminution de la perméabilité membranaire et/ou sur-activation de l'efflux bactérien, l'inactivation des antibiotiques par dégradation ou modification enzymatique et l'altération de leurs cibles cellulaires (Figure 4) (Guinoiseau, 2010).

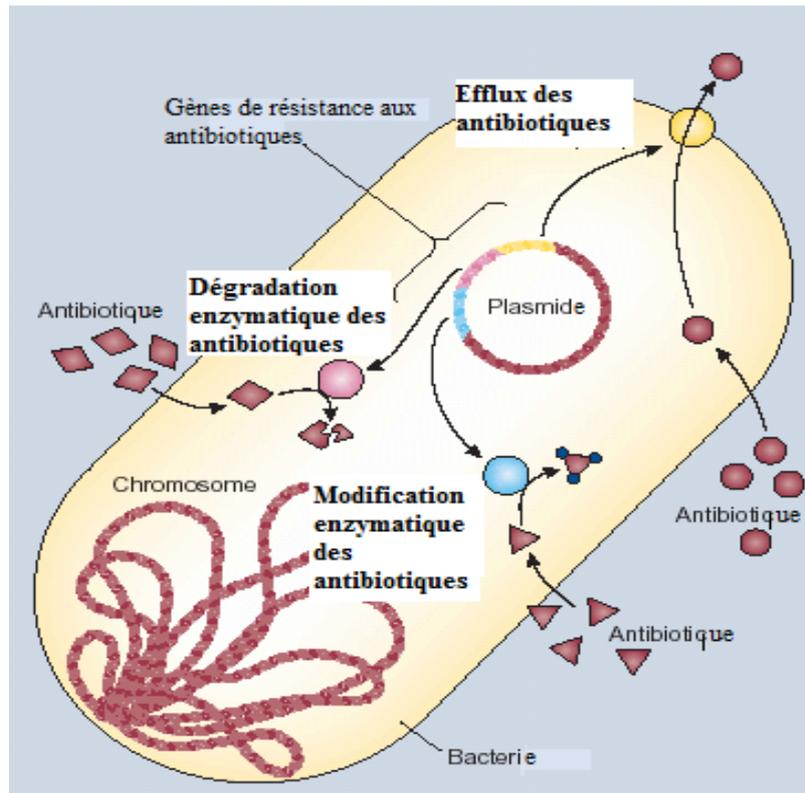


Figure 4 : Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques (Levy et Marshall, 2004).

#### 4.2.2.1. Diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques

Les bactéries sont capables de se protéger de l'action des antibiotiques en réduisant la concentration intracellulaire de ces derniers par :

- **Modification de la perméabilité membranaire**

La paroi des bactéries à Gram positif est presque exclusivement constituée de peptidoglycane, auquel sont associés des polymères d'acide teichoïque. La paroi des bactéries à Gram négatif est plus complexe. Le peptidoglycane, réduit à une fine couche, est entouré par deux membranes. La membrane interne comporte majoritairement des phospholipides alors que la membrane externe présente une structure asymétrique, avec une face interne constituée de phospholipides et une face externe, caractérisée par la présence du lipopolysaccharide (LPS) (Cronan *et al.*, 1987). Le LPS représente 75% de la surface totale de la membrane externe et établit des interactions spécifiques avec des protéines membranaires, telles que les porines.

Le LPS est constitué de trois domaines structuraux, comprenant le lipide A, qui assure son ancrage à la membrane externe, un oligosaccharide central et l'antigène O, formé de plusieurs unités oligosaccharidiques. Son caractère hydrophile rend la membrane externe des bactéries à Gram négatif imperméable à la plupart des macromolécules hydrophobes. Cette particularité structurale est, en partie, responsable de la résistance intrinsèque des entérobactéries et de *Pseudomonas aeruginosa* à certains antibiotiques hydrophobes, comme les macrolides (Normak et Normak, 2002). La forte charge négative du LPS facilite néanmoins le passage des antibiotiques cationiques. Des modifications chimiques, visant à diminuer la charge négative nette du LPS, ont ainsi été observées dans certains cas de résistances. Le transfert de groupements polaires, comme la phosphoéthanolamine ou le 4-amino-4-désoxy-L-arabinose sur le lipide A, confère à certaines souches de *Salmonella enterica* une résistance accrue à la polymyxine B (Helander *et al.*, 1994).

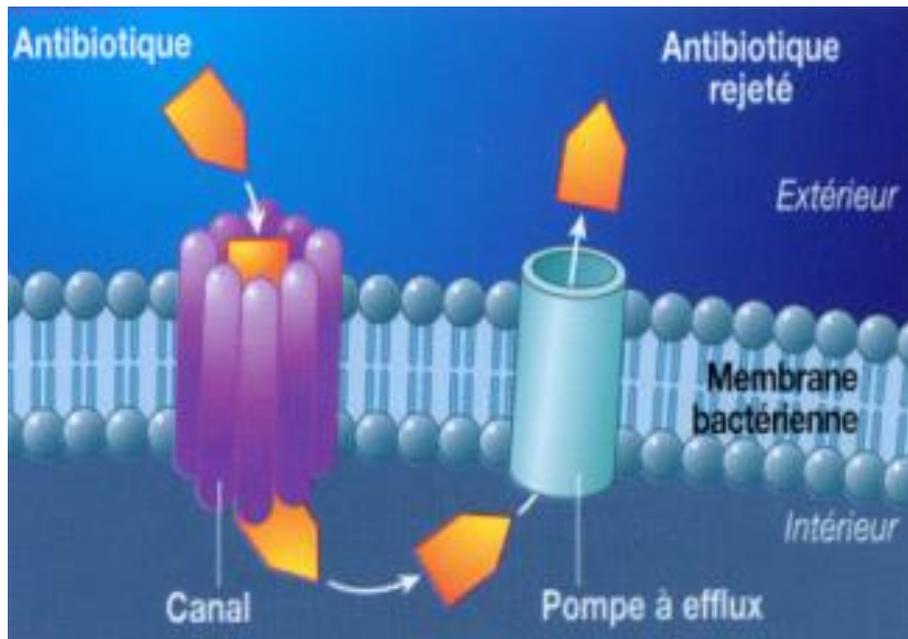
Certains antibiotiques, comme les  $\beta$ -lactames, le chloramphénicol et les fluoroquinolones, traversent la membrane externe des bactéries à Gram négatif et atteignent leurs cibles grâce aux porines (Nikaido, 2003). De ce fait, des changements au niveau de ces canaux protéiques limitent l'efficacité des antibiotiques. La résistance de certaines souches d'*Enterobacter aerogenes* à l'imipénème ( $\beta$ -lactame de 3<sup>ème</sup> génération) est ainsi causée par une diminution de l'expression des gènes codant pour les porines (Chow et Shlaes, 1991). La taille ou la sélectivité des porines peut également être modifiée et aboutir à une exclusion des antibiotiques (Nikaido et Rosenberg, 1981).

- **Les systèmes d'efflux bactériens**

Un processus assez répandu dans le monde vivant pour maintenir l'homéostasie cellulaire consiste à refouler de façon active les agents nocifs dans le milieu extérieur. Ces systèmes d'efflux, encore appelés « pompe », ont été mis en évidence dans les années 80 par S. Levy chez des souches d'*Escherichia coli* résistantes à la tétracycline (Courvalin *et al.*, 2006).

Les pompes d'efflux sont des transporteurs membranaires, impliqués dans la résistance aux antibiotiques par exportation active des drogues dans le milieu extracellulaire (Figure 5). Ces pompes peuvent être des transporteurs « drogue-spécifiques » et conférer une résistance vis-à-vis d'une seule classe d'antibiotiques. Tel est le cas des pompes Tet, qui effluent exclusivement les tétracyclines ou des pompes Mef, qui sont spécifiques des macrolides (Markham et Neyfakh, 2001). Cependant, la plupart de ces transporteurs peut prendre en

charge des composés de structures très différente et contribuer ainsi, de manière significative, à la multi-résistance (MDR: multi-résistance aux drogues) des bactéries vis-à-vis des antibiotiques (Poole, 2004). Les gènes, codant pour les pompes « drogue-spécifiques », sont souvent situés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons) alors que ceux qui codent pour les pompes MDR sont, pour la plupart, chromosomiques (Butaye *et al.*, 2003).



**Figure 5 :** Système d'efflux bactérien (Archambaud, 2009).

Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont des complexes protéiques tripartites constitués d'une pompe transmembranaire, d'une protéine périplasmique de jonction (MFP : Membrane Fusion Protein) et d'une porine, enchâssée dans la membrane externe (OMP : Outer Membrane Protein). Les pompes les plus fréquemment rencontrées sont les pompes AcrB chez *Escherichia coli* ou MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*. Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux ne sont constitués que de la pompe. Les plus étudiés sont les pompes NorA ou QacA, chez *Staphylococcus aureus*, et PmrA chez *Streptococcus pneumoniae* (Pao *et al.*, 1998).

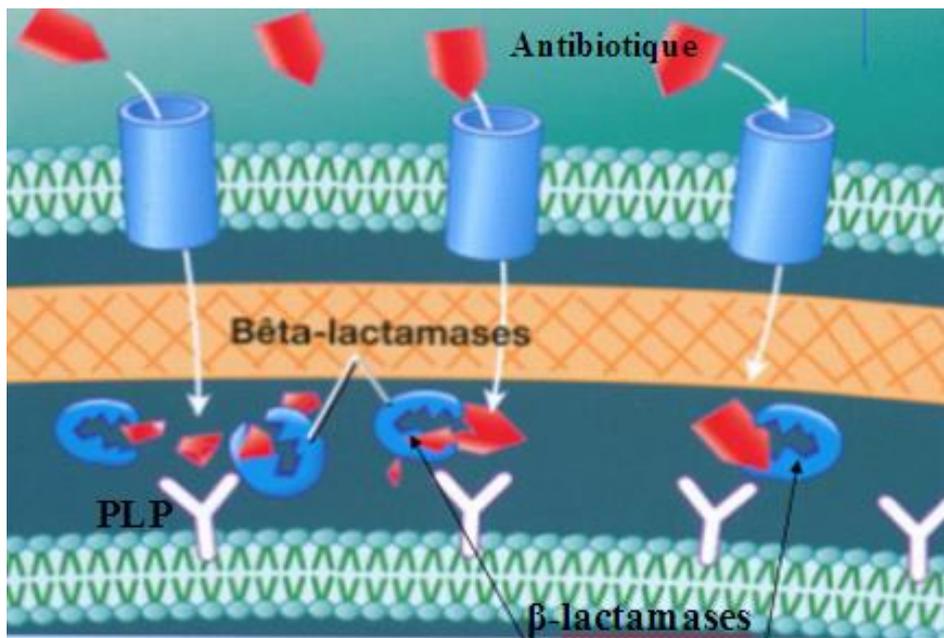
#### **4.2.2.2. Dégradation et modification enzymatique des antibiotiques**

Un des mécanismes de résistance les plus répandus et des plus efficaces consiste, pour les bactéries, à modifier la structure même de l'antibiotique de façon à lui faire perdre sa capacité

à se lier à sa cible cellulaire et, par voie de conséquence, à l'inhiber. Il repose sur la production d'enzymes dont l'origine peut être intrinsèque (gène chromosomique appartenant à l'espèce) ou extrinsèque (gène transmis par des plasmides ou des transposons) (Courvalin *et al.*, 2006).

Les réactions enzymatiques, conduisant à l'inactivation des antibiotiques, peuvent s'effectuer par hydrolyse, transfert de groupements chimiques ou oxydo-réduction (Wright, 2005).

L'exemple le plus connu est l'hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame par les  $\beta$ -lactamases, qui empêche les  $\beta$ -lactamines de se fixer de façon covalente (acylation) sur le site actif des enzymes impliquées dans la synthèse de la paroi, les PLP. (Figure 6). Depuis leur découverte à la fin des années 1940 chez des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la pénicilline G, plusieurs centaines de  $\beta$ -lactamases ont été identifiées chez diverses espèces bactériennes pathogènes ou non (Braford, 2001 ; Courvalin *et al.*, 2006).



**Figure 6:** Inactivation enzymatique de l'antibiotique par les  $\beta$ -lactamases (Archambaud, 2009).

Ces enzymes peuvent être classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tels que l'acide clavulanique sur un plan pratique, les bêta-lactamases peuvent être regroupées en 4 catégories:

**a/ Les pénicillinases sensu stricto** ; chez *Staphylococcus aureus*, elles inactivent la pénicilline G, la pénicilline A, elles sont par contre sans action sur la pénicilline M ainsi que sur les céphalosporines.

**b/ Les bêta-lactamases à spectre élargi** ; ces bêta-lactamases, entraînent une résistance (ou une diminution d'activité) vis-à-vis des pénicillines G, des pénicillines M, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des céphalosporines de 1<sup>ère</sup> et de 2<sup>ème</sup> génération (sauf les céphamycines).

**c/ Les bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)** ; ces bêta-lactamases dérivent des enzymes précédentes par mutation des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi. Le profil de résistance conféré est identique à celui conféré par les bêta-lactamases à spectre élargi mais, il s'étend aux céphalosporines de 3<sup>ème</sup> génération et à l'aztréonam. Les bêta-lactamases à spectre étendu restent sensibles aux inhibiteurs.

**d/ Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs** ; les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivent de certaines bêta-lactamases à spectre élargi par mutation ponctuelle. Le profil de résistance conféré est identique à celui des bêta-lactamases à spectre élargi mais ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam (Conton et Coque, 2006 ; Lozniewski et Rabaud, 2010).

A côté des  $\beta$ -lactamases, d'autres enzymes, comme certaines estérases, participent à l'inactivation des antibiotiques. Les macrolides sont cyclisés grâce à une liaison ester et sont rendus inactifs par les macrolides estérases, qui clivent cette liaison fonctionnelle (Wright, 2005). Les gènes, qui codent pour la synthèse de ces enzymes sont situés sur des éléments mobiles du génome, ce qui implique une grande diffusion de ce mode de résistance (Biskri et Mazel, 2003).

Les antibiotiques peuvent également être inactivés par ajout de groupements chimiques au cours de réactions d'acétylation, de phosphorylation, de glycosylation, de nucléotidylation ou de ribosylation. Les enzymes impliquées dans ce type de mécanisme forment le groupe le plus vaste des enzymes de résistance. Elles ont généralement besoin de co-substrats, tels que l'ATP ou l'acétyl-CoA, présents dans le cytoplasme. L'inactivation des antibiotiques ne se produira donc qu'après leur pénétration dans la bactérie (Wright, 2005).

#### **4.2.2.3. Altération des cibles cellulaires des antibiotiques**

La modification de la cible d'un antibiotique est un mécanisme commun de résistance. Elle est la conséquence d'une mutation spontanée au niveau d'un gène bactérien ou de l'acquisition du gène de résistance (Lambert, 2005).

- **Altération de la cible ribosomiale**

Les antibiotiques qui agissent sur la synthèse protéique peuvent voir leur activité annihilée par une mutation de leur site de fixation sur le ribosome bactérien.

Au niveau de la sous-unité 50S, par exemple, une méthylation confère la résistance croisée aux macrolides, lincosamides et streptogramines chez *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Bacteroides fragilis*, ou *Clostridium perfringens*. Elle peut être constitutive ou inductible, plasmidique ou chromosomique.

- **Altérations des précurseurs de la paroi**

Comme par exemple, les glycopeptides, qui doivent leur action antibiotique à leur liaison aux extrémités D-Ala-D-Ala des chaînes pentapeptidiques des précurseurs de peptidoglycane. Des souches d'entérocoques ont acquis un ensemble de gènes conduisant à la production d'une série d'enzymes permettant la synthèse de peptidoglycane au départ d'un précurseur caractérisé par une extrémité D-Ala-D-Lac à laquelle les glycopeptides ne se lient plus (Van Bambeke et Tulkens, 2009).

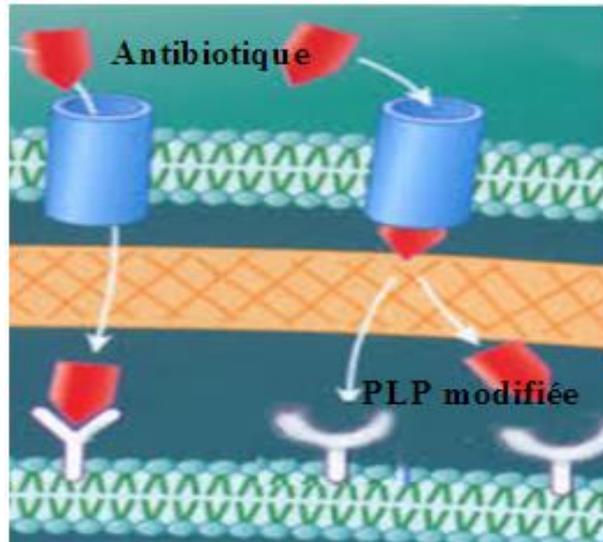
- **Altérations d'enzymes-cible**

Les antibiotiques inhibiteurs d'enzyme sont rendus inactifs lorsqu'une mutation de l'enzyme-cible y empêche leur liaison.

- La résistance aux  $\beta$ -lactames peut être due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PLP suite à une mutation de celles-ci, ou à une diminution du nombre de PLP produites (Figure 7). Ces deux mécanismes peuvent se rencontrer chez les Gram (+) alors que seule la réduction d'affinité est documentée chez les Gram (-). L'exemple le plus connu de ce type de résistance est constitué par les SARM.

- La résistance aux sulfamides et au triméthoprim est le plus souvent due à la production de dihydroptérorate synthase (plasmidique) ou de dihydrofolate réductase (chromosomique ou plasmidique) modifiées et ne liant plus l'antibiotique.

- La résistance aux fluoroquinolones peut être due à la mutation de l'ADN gyrase, qui empêche la formation du complexe ternaire fluoroquinolone-gyrase-ADN. Ce mode de résistance est décrit pour *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries, *Escherichia coli* et les Gram (+) (Van Bambeke et Tulkens, 2009 ; Lozniewski et Rabaud, 2010).



**Figure 7:** Résistance aux  $\beta$ -lactames due à une diminution de l'affinité de leur liaison aux PLP suite à une mutation ((Archambaud, 2009).

## 5. Stratégies moléculaires de lutte contre la résistance bactérienne

La montée des résistances contre les principales classes d'antibiotiques, combinée au nombre limité d'agents en cours de développement, a conduit à l'avènement de l'ère postantibiotique.

Face à la perte d'efficacité de l'antibiothérapie, mise en péril par l'émergence de germes multi-résistants, la découverte de nouvelles molécules est devenue une nécessité absolue. Les champs d'investigation sont vastes. Toutefois, plusieurs stratégies, recourant aux progrès récents de la modélisation moléculaire, de la biologie moléculaire, de la génomique et de la protéomique, se dessinent dans le domaine de la recherche.

La plus originale se base sur l'identification de nouvelles cibles bactériennes, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009). Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance, leurs facteurs de virulence ou en entravant la communication intercellulaire.

L'idée sous-jacente est d'empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, ce qui devrait ainsi limiter l'apparition des résistances. En réduisant la pathogénicité et la résistance bactérienne, ces molécules devraient permettre de restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus aujourd'hui inefficaces.

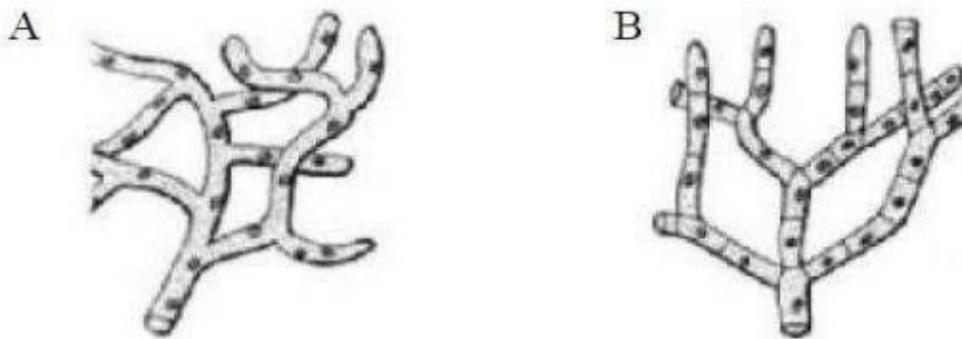
Les efforts se concentrent également sur la recherche d'agents antibactériens, capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action (Schmidt, 2004 ; Falconner et Brown, 2009). Ces molécules devraient être radicalement différentes des antibiotiques classiques, qui concentrent leurs effets sur une seule et même cible bactérienne. Aussi, pour être innovants, les nouveaux antibactériens devraient pouvoir induire la mort cellulaire en agissant simultanément sur plusieurs cibles bactériennes ou en développant des mécanismes d'action originaux. Depuis quelques années, les substances naturelles, qui avaient été délaissées au profit des molécules de synthèse, connaissent un regain d'intérêt. Les ressources naturelles sont donc à nouveau exploitées pour mener à terme de telles recherches qui sont orientées vers la découverte de nouveaux réservoirs de molécules bioactives, consistant à explorer ces molécules notamment à partir de microorganismes. Les champignons, sont parmi les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce groupe de microorganisme est à l'origine d'environ 22% des molécules actives à effet antibactérien produites à l'échelle industrielle (Atoui, 2006). En effet, les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Moniliales constituent les réservoirs les plus importants (Botton *et al.*, 1990).

## **6. Généralités sur les mycètes**

Les champignons (fungi ou mycètes) représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (Mueller et Schmit, 2007). Ce sont des microorganismes eucaryotes, aérobies strictes et rarement anaérobies, ayant un métabolisme hétérotrophe car ils tirent leur énergie de la respiration et de la fermentation des matières organiques solubles disponibles dans leur environnement (Tortora *et al.*, 2003); certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Leveau et Bouix, 1993). Ils peuvent être uni- ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques et d'autres microscopiques, d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ce sont des organismes à mode de reproduction sexuée ou asexuée (Tabuc, 2007).

Ce groupe d'organisme ubiquistes comprend environ 120000 espèces, présentant des structures et caractéristiques biologiques extrêmement diversifiées (Kirk *et al.*, 2001).

D'un point de vue morphologique, le champignon est constitué d'un thalle formant l'appareil végétatif (Hawksworth *et al.*, 1994). L'appareil végétatif se compose d'une structure de base appelé hyphe qui forme un réseau de filaments ramifiés : le mycélium (Mathew, 1995). Chez la plupart des champignons les hyphes sont divisés par des cloisons ou Septa contenant un seul noyau, on les appelle des hyphes segmentés ou septés. Chez certaines classes de mycètes, les hyphes sont dépourvus des cloisons et ont l'aspect d'une longue cellule continue à noyaux multiples ; ils sont donc appelés cénocytes (Figure 8) (Tortora *et al.*, 2003).



**Figure 8 :** Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium : (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonné (Chabasse *et al.*, 2002).

Les hyphes, segmentés ou non, sont en fait de petits tubules transparents s'entourant d'une paroi cellulaire rigide formée de polymère de chitine et des polymères de la cellulose, éléments chimiques qui lui confèrent une grande rigidité, une longévité et une grande capacité de résistance à la chaleur et à des pressions osmotiques élevées. De ces faits, les champignons sont donc capables de vivre dans un environnement rude (Tortora *et al.*, 2003). En effet la tolérance des champignons à l'égard du pH est souvent étendue mais avec généralement une préférence pour les pH légèrement acides (Botton *et al.*, 1990) ; beaucoup d'espèces supportent des pH très acides (Delarras, 2007). Elles se développent dans une gamme de température allant de 0 à 40°C ou plus ; la plupart se développe bien aux températures comprises entre 20 et 25°C (Botton *et al.*, 1990). La majorité des champignons se développent bien en l'absence de lumière et tolèrent des teneurs en eaux très faibles (Delarras, 2007).

## **7. Les *Aspergillus***

Les *Aspergillus* sont des moisissures omniprésentes, largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissible par le courant d'air, de plus la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2010).

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

Elles peuvent présenter à la fois des formes sexuées (champignons parfaits) et des formes asexuées (champignons imparfaits).

Les *Aspergillus* sont des contaminants très communs, polyphages dont certaines souches pouvant être pathogènes pour l'Homme et pour les végétaux par la production de toxines (De Hoog, 1997), cependant, d'autres souches représentent un intérêt industriel pour la préparation d'aliments fermentés et pour la production d'enzymes et d'acides organiques (Ward *et al*, 2006).

### **7.1. Habitats**

Ces champignons sont trouvés dans les échantillons de sol, se développant sur les débris végétaux ou les récoltes agricoles en décomposition, et de très nombreuses spores de ce genre sont également présentes dans l'air ambiant. Ils se retrouvent couramment en tant que saprotrophes sur des substrats très divers (Botton *et al.*, 1990).

Bien que les *Aspergillus* soient considérés comme des espèces communément terrestres, ce genre fongique est tolérant à de fortes concentrations en sel et à une faible activité de l'eau (Tresner et Hayes, 1971). De nombreuses espèces de ce genre ont ainsi été isolées du milieu marin que ce soit d'échantillons de sédiments, d'eau de mer, d'algues ou d'invertébrés marins tels que les éponges (Cantrell *et al.*, 2006 ; Ruiz, 2007).

### **7.2. Taxonomie**

Les champignons sont classés en fonction de leur morphologie et la diversité des types de cycles de reproduction, en incluant la formation de spores sexuées différentes (Madigan et Martinko, 2007) ; mais il n'existe pas encore une classification universelle.

En effet, selon Botton *et al.* (1990) et Guiraud (1998), les *Aspergillus* sont classifiées comme suit :

Règne : **Fungi**

Division : **Eumycota**

Classe : **Deuteromycetes**

Ordre : **Moniliales**

Famille : **Moniliaceae**

Genre : *Aspergillus*

Cependant, Geiser et Lobuglio en 2001, donnent une autre classification où le genre *Aspergillus* appartient au phylum des Ascomycota, classe des Plectomycetes, de l'ordre des Eurotiales et de la famille des Trichomaceae (Webster et Weber, 2007).

### **7.3. Caractères morphologiques**

#### **7.3.1. Caractères macroscopiques**

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A. fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin, 1994).

Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

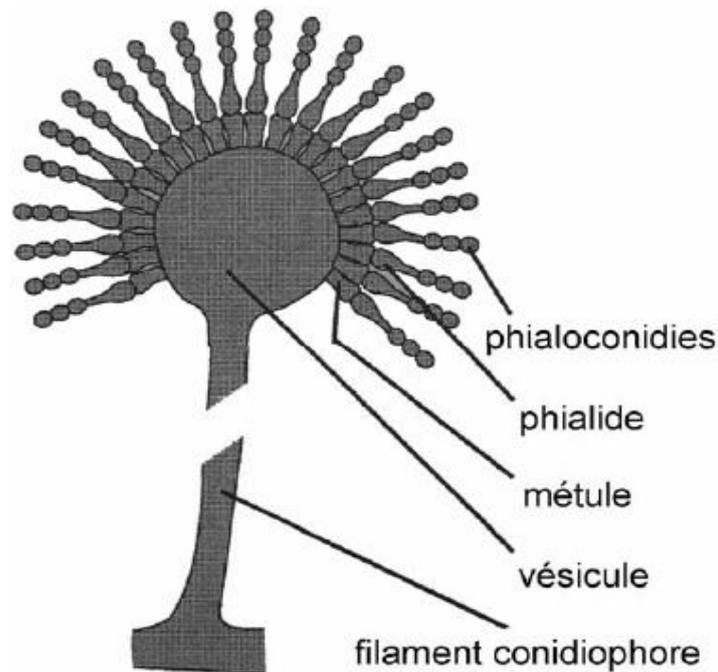
#### **7.3.2. Caractères microscopiques**

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou

phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petites structures insérées sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Figure 9) (Badillet *et al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir.

L'ensemble *vésicule* ± *métules* + *phialides* + *conidies* constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*.

Pour certaines espèces, des formations sexuées apparaissent parfois en culture. Il s'agit de cléistotèques qui contiennent des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores. Les « hülle cells » ou les cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée (Tabuc, 2007).



**Figure 9** : Schéma d'une tête aspergillaire (Chermette et Bussiéras, 1993).

#### 7.4. Identification moléculaire

Les méthodes d'identification basées sur des techniques de biologie moléculaire ont fait leurs preuves et se sont imposées par leur fiabilité. Ces techniques sont majoritairement basées sur l'ADN. L'amplification par PCR de régions spécifiques est une méthode puissante

pour l'analyse ciblée d'un type de champignon (Hsu *et al.*, 2003). Le polymorphisme d'amplification d'ADN aléatoire (Random Amplified Polymorphic DNA : RAPD) (Hadrys *et al.*, 1992) est une méthode consistant à amplifier à l'aide d'amorces dégénérées des cibles aléatoires. Le profil de bandes obtenu peut être caractéristique et permettre la distinction d'espèce de champignons (Carnegie *et al.*, 2001). Les méthodes basées sur l'analyse du polymorphisme de taille de fragments de restriction (Restriction Length Fragment Polymorphism : RFLP) (Botstein *et al.*, 1980) et la combinaison PCR et RFLP : analyse du polymorphisme de fragments amplifiés (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences : CAPS) sont également des méthodes robustes (Kamiya *et al.*, 2004).

Ces méthodes de biologie moléculaire reposent sur des séquences cibles spécifiques utilisées pour les identifications, on retrouve l'ADN ribosomique (ADNr), l'ADN mitochondrial et parfois des séquences répétées de type microsatellites. Actuellement près de 700 000 séquences d'ADNr fongiques sont disponibles dans Genbank. Pour l'identification des champignons filamenteux, la cible prépondérante est l'ADNr (Guarro *et al.*, 1999). L'unité minimale se compose de plusieurs parties, des séquences très conservées (18S, 5.8S et 28S) alternant avec des séquences beaucoup plus variables (ETS, ITS1 et 2 et IGS) (Figure 10).



**Figure 10 :** Représentation d'une unité d'ADN ribosomique. ETS: externally transcribed spacer, ITS: internally transcribed spacer et IGS: intergenic spacer.

## **7.5. Les *Aspergillus* : source d'une variété de métabolites secondaires**

### **7.5.1. Généralités**

Les métabolites secondaires sont des molécules produites par des organismes vivants, et ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme qui les produit, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction. Cependant, les mutants, ayant perdu la capacité de produire ces composés, peuvent toujours se développer (Perry *et al.*, 2004).

Les microorganismes ne produisent pas leurs métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase. En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe

(Tortora *et al.*, 2003 ; Perry *et al.*, 2004), qui se forme (le métabolite primaire) au moment où les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase (Tortora *et al.*, 2003). Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (Calvo *et al.*, 2002).

Des conditions environnementales spécifiques peuvent affecter la production de ces métabolites, telles que la composition du milieu de la culture, l'activité de l'eau, la valeur du pH, la température, la teneur en oxygène, et la présence d'organismes compétitifs (Davis, 2001; Johanning, *et al.*, 2002). Cependant, la voie de biosynthèse de ces produits est souvent longue, complexe, se faisant en plusieurs étapes et sous l'intervention de plusieurs enzymes (Dao, 2005).

En effet, si le métabolisme primaire est commun à toutes les espèces fongiques et se rapproche des voies métaboliques générales permettant la synthèse et le catabolisme des glucides, lipides et protéines, le métabolisme secondaire peut être en revanche spécifique ; les métabolites secondaires expriment l'individualité des espèces en terme chimique, d'autre part des espèces qui sont largement séparées peuvent produire la même classe des métabolites et par fois les mêmes métabolites secondaires (Taylor et Francis, 1998). Ce sont des molécules caractérisés par des structures chimiques très diversifiées, complexes, et inhabituelles. Ils sont souvent spécifiques aux organismes producteurs, parfois même à une seule espèce.

Génétiquement, les gènes responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires sont habituellement arrangés dans des faisceaux contenant également les gènes responsables de la résistance à l'action toxique et parfois, des gènes précurseurs de la biosynthèse d'antibiotiques (Martin, 1998).

Ce processus constitue chez les mycètes un régulateur global de métabolites secondaires appelé Lae A. En effet, ce facteur a été identifié chez *A. nidulans* et plus récemment chez *A. fumigatus*. Cette découverte a permis d'augmenter ou diminuer la production des métabolites secondaires chez un mycète en modulant l'expression de Lae A. Par exemple, l'overexpression du gène Lae A augmente considérablement la production de pénicilline chez *A. nidulans* et la production de lovastatine chez l'*A. terreus* et la suppression de Lae A chez *A. fumigatus* élimine la production de gliotoxine et d'autres métabolites secondaires et diminue la virulence de ce mycète pathogène (Woobok et Keller, 2004 ; Keller et Woobok, 2005).

Les métabolites secondaires peut avoir des activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressive et toxiques (mycotoxine et phytotoxine) (Keller et Woobok, 2005).

Les champignons sont des producteurs prolifiques de ces métabolites. Turner en 1971 a enregistré presque 1000 produits fongiques. En 1983, le chiffre avait plus que doublé (Turner et Aldridge, 1983). Non seulement les champignons peuvent montrer des productions impressionnantes mais leurs produits peuvent aussi avoir une grande importance commerciale. Les antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et la cyclosporine B (immunosuppressive) sont largement prescrites comme médicaments et sont classées dans les 5 % de vente des produits pharmaceutiques (Whalley, 1994).

### **7.5.2. Les différentes classes des métabolites secondaires**

À première vue, les structures des métabolites secondaires peuvent paraître diverses. Cependant, la majorité de ces composés appartient à une même famille, et ont des caractéristiques structurelles particulières, issues de leur voie de biosynthèse.

Les classes des métabolites secondaires sont:

- Les polykétides et les acides gras
- Les terpenoïdes et les stéroïdes
- Les propanoïdes phényles
- Les alcaloïdes
- Les acides aminés spécialisés et les peptides
- Les hydrates de carbone spécialisés (Awad, 2005 ; Youcef ali, 2014).

### **7.5.3. Métabolites secondaires rencontrés chez les *Aspergillus***

Les *Aspergillus* ont une grande importance économique, écologique et médicale. La production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces d'*Aspergillus* a été détectée chez *A. aculeatus*, *A. ochraceus* et *A. terreus*. Ces derniers, sont considérés comme les producteurs les plus élevés de métabolites secondaires extracellulaires, alors que les producteurs les plus faibles sont *A. tamarisii*, *A. rugulosus* en plus d'*A. oryzae*. Dans le cas des métabolites secondaires intracellulaires, les espèces les plus productrices étaient *A. flavus*, *A. nidulans* et *A. wentii*, tandis que les plus faibles étaient *A. clavatus*, *A. tamarisii* et *A. violaceus* (Abu - Seidah, 2003).

À titre d'exemple ; la souche d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a été décrite pour sa capacité à produire la melleine, le 4-hydroxymelleine (Moore *et al.*, 1972), l'acide pénicillique et la 5,6-

dihydro acide pénicillique (Obana *et al.*, 1995), l'asperlactone et l'isoasperlactone (Torres *et al.*, 1998), la xanthomegnine, la viomelleine et la vioxanthine (Frisvad et Thrane, 2002), mais aussi les ochratoxines (Taniwaki *et al.*, 2003).

Cependant, et parmi les métabolites secondaires les plus intéressants dans le domaine de l'industrie, les antibiotiques présentent une grande diversité dans leur structure et dans leur mode d'action. Le tableau 2 montre les différentes espèces du genre *Aspergillus* productrices des molécules à effet antibactérien.

**Tableau 2 :** Espèces du genre *Aspergillus* productrices d'antibiotiques (Pomini *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2008 ; Meenupriya et Thangaraj, 2011 ; Wang *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2011 ; Miao *et al.*, 2012 ; Cory *et al.*, 2013 ; Ola *et al.*, 2014 ; Xu *et al.*, 2015 ; Pillai *et al.*, 2016 ; Liu *et al.*, 2017 ; Phainuphong *et al.*, 2017).

<b>L'espèce productrice</b>	<b>L'antibiotique</b>
<i>A. ochraceus</i>	$\alpha$ -Campholène aldéhyde
<i>A. fumigatus</i>	3,4-dimethoxyphenol
<i>A. fumigatus</i>	1,3,5-trimethoxybenzene
<i>A. sclerotiorum</i>	Penicillic acid
<i>A. ochraceus</i>	Aspyrone
<i>A. Flavus</i>	Aspergillic acid
<i>A. sydowii</i>	Diorcinol
<i>A. sydowii</i>	Cordylol C
<i>A. pauamensis</i>	Gregatin B
<i>A. sydowii</i>	Violaceol II
<i>A. sydowii</i>	Violaceol I
<i>A. pauamensis</i>	Gregatin A
<i>A. flavus</i>	Phomaligol A
<i>A. pauamensis</i>	Gregatin D
<i>A.versicolor</i>	Brevianamide M
<i>A. terreus</i>	Sulochrin
<i>A. oryzae</i>	Aspirochlorine
<i>A. flavipes</i>	Flavipesin A
<i>A. terreus</i>	Terremide B
<i>A. terreus</i>	Terremide A
<i>A. versicolorstrain</i>	Kipukasin I
<i>A. flavus</i>	Aflatoxin B2b
<i>A. fumigatus</i>	Fumagilline
<i>A. flavipes</i>	Asperphenamate
<i>A. terreus</i>	Talaromycesone A
<i>A. fumigatiaffinis</i>	Neosartorin
<i>A. flavus.</i>	Flavuside B

# *Partie pratique*

## **Chapitre I : Isolement et identification des souches fongiques du genre *Aspergillus***

L'objectif de notre travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques du genre *Aspergillus* isolées à partir des sols prélevés d'écosystèmes particuliers.

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour l'isolement sélectif de ces moisissures. Elles reposent essentiellement sur le développement dans milieux appropriés et additionnés des substances inhibitrices (antibiotiques et fongicides) stoppant la croissance des germes envahisseurs (Liu *et al.*, 1993 ; Fernandes *et al.*, 2010).

Après l'identification morphologique (basée sur la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium aérien, la présence de spores et leur forme) des isolats fongiques, il est évident pour la suite de les identifier au niveau de l'espèce. Pour cela en utilisant des techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leur rapidité et efficacité (Bridge *et al.*, 1993 ; Dong *et al.*, 2007). Un des buts de cette détermination taxonomique est en fait de connaître le matériel fongique sur lequel nous travaillons et surtout de savoir si ce microorganisme est déjà décrit dans la littérature scientifique. Une telle situation nous permettra d'obtenir des informations supplémentaires sur les souches fongiques et produits actifs connus qu'ils synthétisent éventuellement. Ces renseignements pourront être d'un précieux recours lors de l'identification des substances actives produites par ces souches.

### **1. Matériel et méthodes**

#### **1.1. Prélèvements des échantillons**

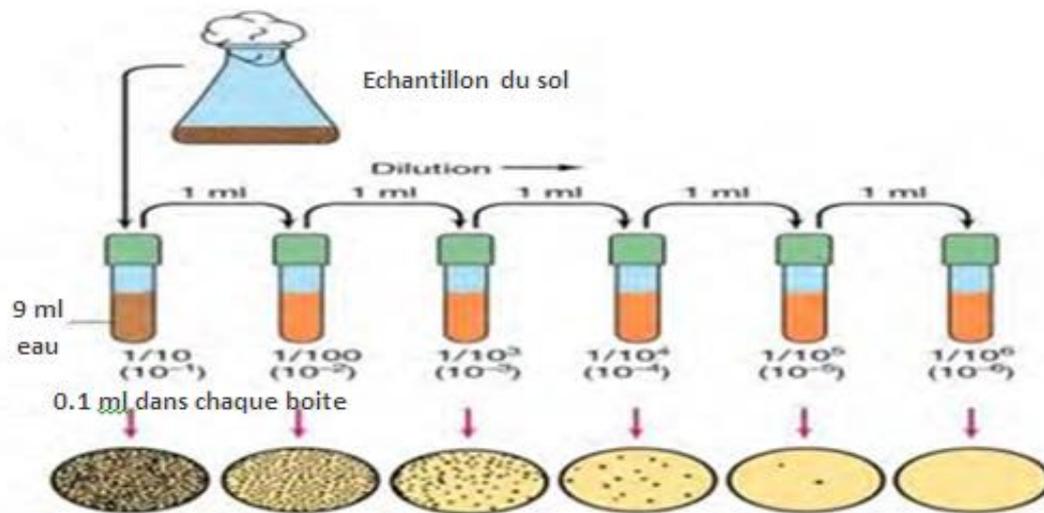
Les échantillons des sols utilisés pour ce travail proviennent de deux différentes régions Algériennes en l'occurrence :

- Station de source thermale (Hammam Safsaf) de la région de Teleghma : (commune dans la wilaya de Mila, située dans le nord-est algérien et se caractérise par un climat chaud et tempéré).
- La palmeraie d'oasis du nord de la région de Laghouat (située à 400 km au sud d'Alger à 750 m d'altitude et doté d'un climat désertique).

Pour ce faire, une quantité de 100 g de sol a été prélevée jusqu'à 20 cm de profondeur après avoir écarté les trois premiers centimètres de sol, puis déposée à l'aide d'une spatule dans des flacons en verre, dans des conditions d'asepsie rigoureuse, ensuite les échantillons sont transportés dans une glacière à 4°C jusqu'au laboratoire dans un délai ne dépassant pas les 24 h (Almi *et al.*, 2015).

## 1.2. Isolement

L'isolement a été réalisé selon la méthode de suspension-dilution (Davet, 1996 ; Davet et Rouxel, 1997). La préparation des dilutions consiste, tout d'abord à préparer la solution mère, en ajoutant 1g de sol à 9 mL d'eau distillée stérile suivie d'une agitation. Cette suspension a servi de préparer des dilutions décimales par l'ajout successif de 1 mL de la suspension à 9mL d'eau distillée stérile jusqu'à l'obtention de la dilution  $10^{-6}$ . Ensuite, 0.1 mL de chaque suspension est étalée sur la surface d'un milieu PDA (Potato Dextrose Agar), additionné de 5mg/mL de Streptomycine afin d'éviter la prolifération des bactéries, trois boites ont été préparées pour chaque dilution, puis les boites sont incubées à 28°C pendant 6 jours (Figure 11) (Botton *et al.*, 1990).



**Figure 11:** La méthode de suspension-dilution.

## 1.3. Purification

La purification a concerné principalement les colonies dont les caractères culturaux sont différents. Il s'agit donc de prélever quelques spores ou une petite bouture mycélienne à la marge du thalle et de l'ensemencer de manière aseptique dans des boîtes de Pétri contenant le

milieu PDA. Afin d'obtenir un développement typique du champignon, l'inoculation est réalisée en un seul point au centre de la boîte, puis l'incubation a été effectuée à 28°C pendant 6 jours (Botton *et al.*, 1990).

#### **1.4. Conservation des isolats**

Les isolats purs obtenus sont conservés selon deux méthodes : la méthode de gélose inclinée et la méthode de congélation ;

##### **➤ Conservation sur gélose inclinée**

Les isolats fongiques purifiés sont repiqués sur milieu PDA incliné. Après incubation à 28°C pendant 6 jours, ils sont stockés à 4°C et un repiquage est réalisé tous les deux mois (Takahashi *et al.*, 2008).

##### **➤ Conservation par congélation**

Les isolats fongiques sont ensemencés sur milieu PDA, puis incubés jusqu'à la sporulation, une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de culture puis conservée à -20°C dans un milieu liquide en présence du glycérol à 20 % (Isik *et al.*, 1999).

#### **1.5. Identification des isolats fongiques**

##### **1.5.1. Identification morphologique**

L'identification morphologique, fait appel aux caractères macro et microscopiques des moisissures isolées à l'état pure.

##### **1.5.1.1. Etude macroscopique**

Elle est effectuée par observation des caractères culturels sur les différents milieux de culture ; vitesse de croissance, couleurs des colonies et variation des couleurs au cours du temps, couleurs du revers des colonies, texture de la surface...etc. (Botton *et al.*, 1990).

##### **➤ Milieux d'identification**

Quatre milieux de culture sont utilisés pour l'identification des isolats en l'occurrence ; PDA, MEA (Malt Extract Agar), Sabouraud et Czapek-Dox Agar (Annexe 1).

Pour tous les milieux de culture, la prolifération des bactéries est inhibée en ajoutant un antibiotique, la Streptomycine, à raison de 5 mg/L (Botton *et al.*, 1990).

### **1.5.1.2. Etude microscopique**

Cette étude permet de détecter la structure du mycélium (siphonné, cloisonné, épais, coloré...), les éléments de la reproduction asexuée (spores : forme, cloisons, couleur, taille...) et sexuée, et sur les formes de résistances (chlamydo-spores solitaires, en paires ou en chaînes) (Hawkswarth, 1995; Gams *et al.*, 1998).

Les préparations microscopiques se font par la technique de scotch qui consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse *et al.*, 2002). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements ;  $\times 25$ ,  $\times 40$ , et  $\times 100$ .

### **1.5.2. Identification moléculaire**

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes et outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN). Dans le présent travail, l'identification des isolats fongiques a été effectuée au niveau du Laboratoire des Microorganismes et Biomolécules Actives (LMBA) en Tunisie, selon les étapes suivantes (Figure 12) :

#### **1.5.2.1. Préparation des cultures**

Pour obtenir du matériel frais, les isolats fongiques ont été réensemencés sur milieu PDA et les boîtes ont été incubées à 28°C pendant 6 jours.

#### **1.5.2.2. Extraction d'ADN génomique**

D'abord une quantité du mycélium a été broyé en présence de 500  $\mu$ L de solution de lyse (400 mM Tris HCl, 60 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 % SDS, 2 mL H<sub>2</sub>O ultra pure) dans un tube eppendorf de volume 1.5 mL, ensuite le broyat a été laissé reposer pour 10 min puis additionné de 150  $\mu$ L d'acétate de potassium (pH 4.8 ; solution préparée à partir de 60 mL d'une solution d'acétate de potassium 5M, 11.5 mL acide acétique glacial et 28.5 mL d'eau milliQ).

Le tube a été homogénéisé et centrifugé pour 10 min à 10000 rpm, puis le surnageant est transféré dans un autre tube de 1.5 mL sur lequel un volume égal d'isopropanol est ajouté. Ensuite le tube a été agité par inversion (environ 10 fois) et incubé à -20°C pendant toute la nuit.

Après l'incubation, une centrifugation a été effectuée à 10000 rpm pendant 10 min, puis le surnageant a été jeté et le culot d'ADN a été rincé deux fois avec 300 µL d'éthanol 70 %.

Après une étape de centrifugation à 10000 rpm pendant 10 min, le surnageant a été éliminé puis le tube est séché sous la hotte pendant 2 h.

En fin, l'ADN est dissout dans 50 µL de TE (Tris-EDTA) puis conservé à -20°C (El khoury, 2007).

### **1.5.2.3. Quantification de l'ADN**

Le dosage se fait par spectrophotomètre (Thermo Scientific NanoDrop 2000) à deux longueurs d'ondes différentes ; à 260 nm, la longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques et à 280 nm, la longueur d'onde d'absorption des protéines. Une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin.

La pureté des échantillons est donnée par le rapport des DO ( $DO_{260nm}/DO_{280nm}$ ). Si le rapport est inférieur à 1.6, il y a une contamination par des protéines et s'il est supérieur à 1.9, il y a une contamination par des ARN (Atoui, 2006 ; Smaoui, 2010).

### **1.5.2.4. Amplification de l'ADN par PCR**

La PCR (Polymerase Chain Reaction) consiste à amplifier sélectivement une séquence particulière d'ADN par action d'une ADN polymérase thermostable. L'amplification s'effectue sur un fragment d'ADN à partir de deux amorces oligonucleotidiques s'appariant spécifiquement aux extrémités des deux brins complémentaires qui délimitent la partie d'ADN à amplifier. Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude phylogénétique est le gène ribosomal 18S, très représenté dans les banques de données. Ce marqueur nous permettra d'affilier nos séquences avec celles d'organismes connus. Deux amorces universelles ont été utilisées (**ITS1 et ITS4**) (White et *al.*, 1990).

**ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG (T<sub>m</sub>= 58°C)**

**ITS4: TCCTCCGCTTATTGATATGC (T<sub>m</sub>=65°C)**

Protocole d'amplification

La réaction d'amplification a été réalisée dans un volume réactionnel de 25 µL contenant :

- 5 µL de tampon

- 1.5 µL MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 1 µL dNTP (20 mM)
- 2 µL de chacune des amorces (20 pmoles/µL)
- 0.25 µL de Taq DNA polymerase (5U/µL)
- 11.25 µL d' H<sub>2</sub>O bidistillée stérile

Le mélange ou mix a été réalisé pour le nombre total des isolats, puis réparti à raison de 23 µL/tube. 2 µL d'ADN (50 ng/µL) ont été ajoutés en dernier au mélange réactionnel.

La réaction d'amplification a été réalisée dans un thermocycleur (Biometra, Allemagne). Le programme de la PCR établi a été composé d'une pré-dénaturation à 95°C pendant 3 min, suivie par 35 cycles consécutifs d'une dénaturation à 98°C pendant 15 sec, d'une hybridation spécifique des amorces à 59°C pendant 60 sec et d'une élongation à 72°C pendant 2 min, et enfin une post-élongation à 72°C pendant 10 min (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008).

#### **1.5.2.5. Electrophorèse sur gel d'agarose**

Un gel d'agarose à 1,5 % a été préparé avec un tampon standard TBE 0,5 X (4,5 mM Tris, 4,5 mM d'acide borique et 1 mM EDTA, pH 8) contenant 0,5 mg/mL de bromure d'éthidium. 5µL de l'échantillon PCR a été mélangé avec 1µL de tampon de charge (Sucrose 50 %, EDTA 75 mM, Xylène cyanol 0.2 %, Bleu de Bromophénol 0.2%) sur une feuille de parafilm. Les échantillons et un marqueur de poids moléculaire (1Kb) ont été chargés séparément dans les puits du gel. L'électrophorèse a été effectuée à 100 V dans du tampon TBE 0,5 X pendant 40 min. Les produits d'amplification ont été visualisés sous lumière UV, grâce au bromure d'éthidium incorporé au part avant dans le gel (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008 ; Smaoui, 2010).

#### **1.5.2.6. Purification des fragments d'ADN**

Les produits d'amplification par PCR ne sont pas suffisamment purs pour être utilisés directement dans les réactions enzymatiques telles que le séquençage ou le clonage, et nécessitent une purification préalable. L'excès d'oligonucléotides et de dNTP non-incorporés a été éliminé par le Kit « QLAquick PCR Purification Kit » (QLAGENTM GmbH. Hilden. Germany).

#### **1.5.2.7. Séquençage**

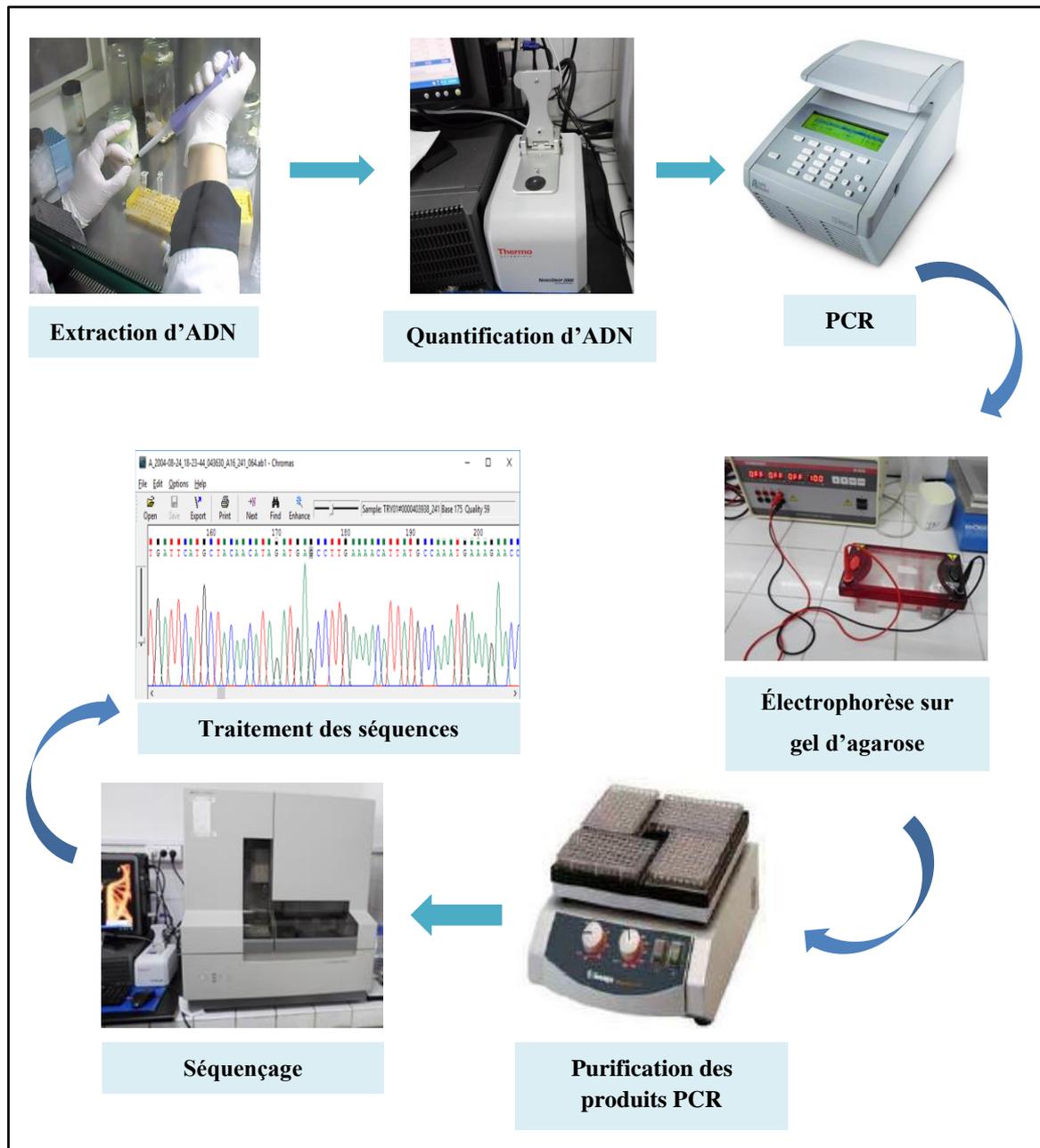
Le séquençage enzymatique des fragments d'ADN a été effectué selon la méthode d'incorporation de didésoxynucléotides terminateurs de chaîne, de sanger *et al.* (1977). Après

purification et quantification, une aliquote précise d'ADN a été utilisée comme matrice d'une réaction d'amplification enzymatique en présence de didésoxynucléotides (ddNTP) marqués au Big-Dye. La réaction s'est déroulée dans un volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contenant 4  $\mu\text{L}$  du mélange Big-Dye contenant l'AmpliTaq DNA polymérase FS, 4  $\mu\text{L}$  du tampon de réaction 2.5X (5 X : 400 mM TrisHCl [pH9], 10 mM  $\text{MgCl}_2$ ) et 3.2 pmol de l'amorce choisie. Les produits de marquage par la Big-Dye ont été ensuite précipités avec de l'isopropanol 75 %, séchés et repris dans 18  $\mu\text{L}$  du tampon TSR (template suppression reagent). Après dénaturation, les fragments d'ADN ont été résolus par séquenceur automatique "ABI Prism<sup>TM</sup> 310" et le programme "Sequence Analysis" (Perkin Elmer Applied Biosystems). Le programme de la réaction comporte 25 cycles : 10 sec de dénaturation à 95 °C, 0.5 sec d'hybridation à 50 °C, 4 min d'élongation à 60 °C.

Le résultat est présenté sous forme de courbe présentant la fluorescence détectée et par suite la séquence nucléotidique qui en résulte.

#### **1.5.2.8. Comparaison des séquences avec la banque bioinformatique**

La comparaison des séquences avec celles des bases de données a été réalisée via l'algorithme BLAST (Altschul *et al.*, 1997). Le traitement et le nettoyage des séquences nucléotidiques ont été réalisés grâce au logiciel Chromas (Larkin *et al.*, 2007).



**Figure 12:** Etapes de l'identification phylogénique des isolats fongiques.

## **2. Résultats**

### **2.1. Isolement des champignons du genre *Aspergillus***

L'isolement des espèces fongiques a été effectué à partir des échantillons de sol prélevés de deux différentes régions algériennes en l'occurrence; Teleghma (commune dans la wilaya de Mila, située dans le nord-est algérien) et Laghouat (située à 400 km au sud d'Alger à 750 m d'altitude).

Au bout de 6 jours d'incubation à 28°C, les champignons sont apparus et se développent rapidement. Ils ont été repérés d'après leurs aspects macroscopiques caractéristiques et purifiés afin d'obtenir des cultures pures.

### **2.2. Identification des isolats**

#### **2.2.1. Caractères morphologiques et cultureux**

Après l'étape de purification, un nombre de 32 isolats du genre *Aspergillus*, a été obtenu à partir de l'ensemble des prélèvements. Ils sont répartis comme suit : 22 isolats obtenus à partir du sol de Teleghma, et 10 isolats à partir du sol de Laghouat.

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés (PDA, MEA, Sabouraud et Czapeck-dox), Tous les isolats se développent sur tous les milieux utilisés avec différents degrés de croissance allant d'une moyenne à une croissance abondante.

Ils forment des colonies ; poudreuses, duveteuses, cotonneuses ou granuleuses. La couleur des colonies développant une teinte caractéristique ; brune, verte, jaune ou noire, selon les espèces et le milieu de culture utilisé. Le revers est en général incolore à jaune, beige ou marron.

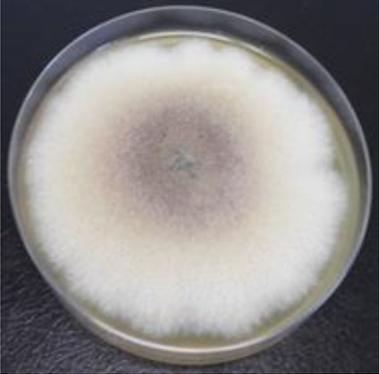
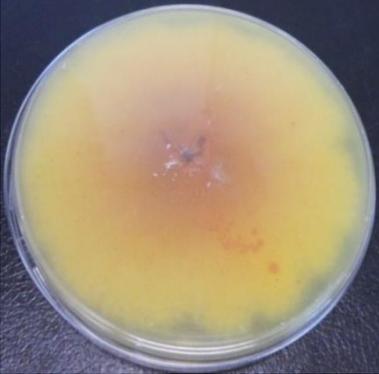
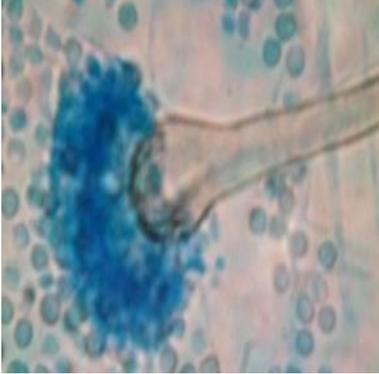
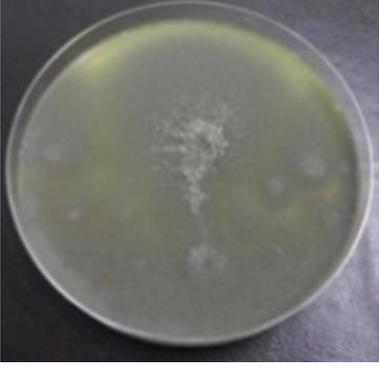
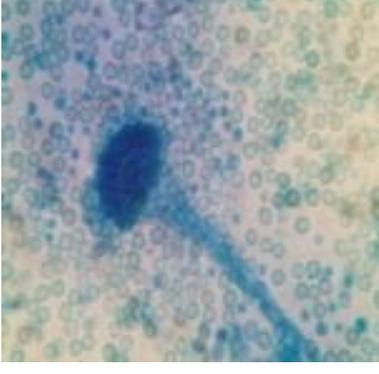
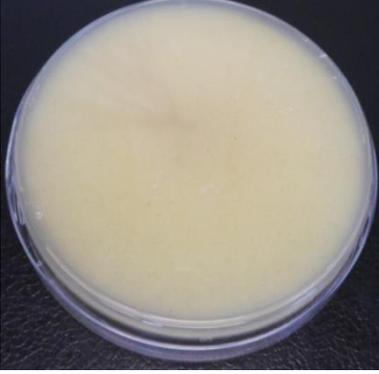
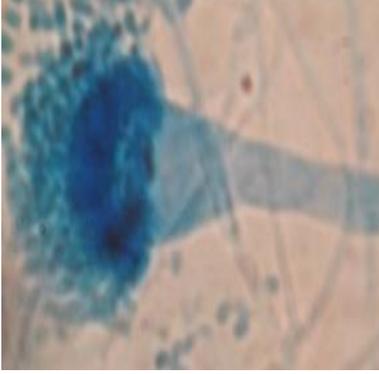
L'observation microscopique a révélé que les filaments mycéliens des 32 isolats sont septés et ramifiés. Sur ces filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable, sur laquelle, sont disposées les phialides. Ces dernières sont formées soit directement sur la vésicule soit portées sur des métules. Les spores sont lisses et globuleuses.

En se basant sur ces caractères morphologiques, la collection de 32 isolats du genre *Aspergillus* a été subdivisée en 10 groupes phénotypiques. Le tableau (3) récapitule les

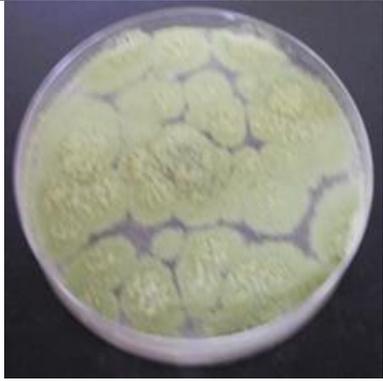
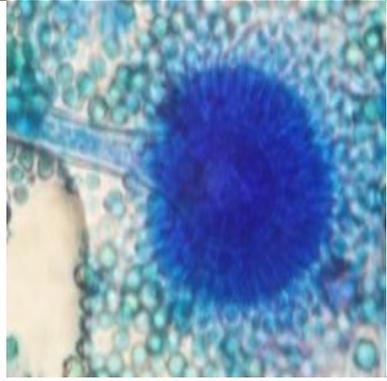
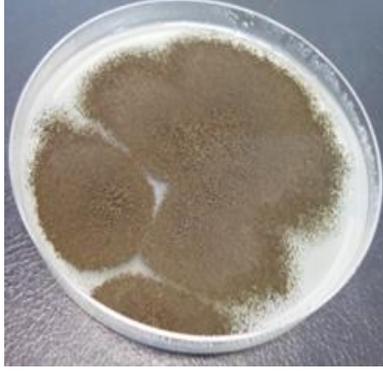
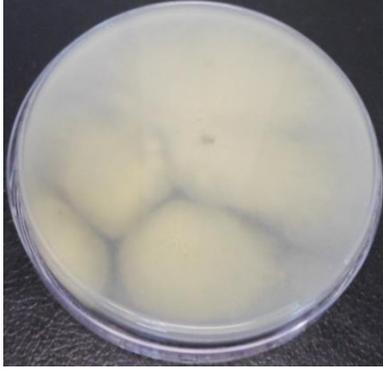
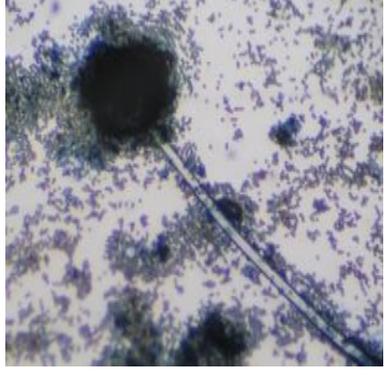
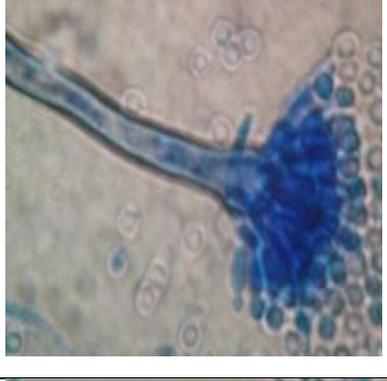
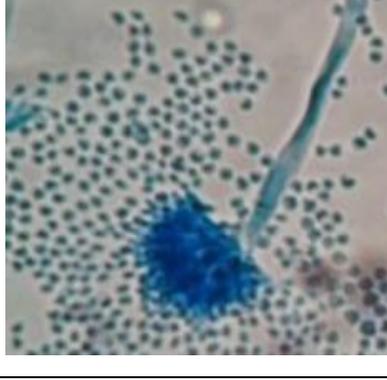
***Chapitre I: Isolement et identification des souches fongiques du genre Aspergillus***

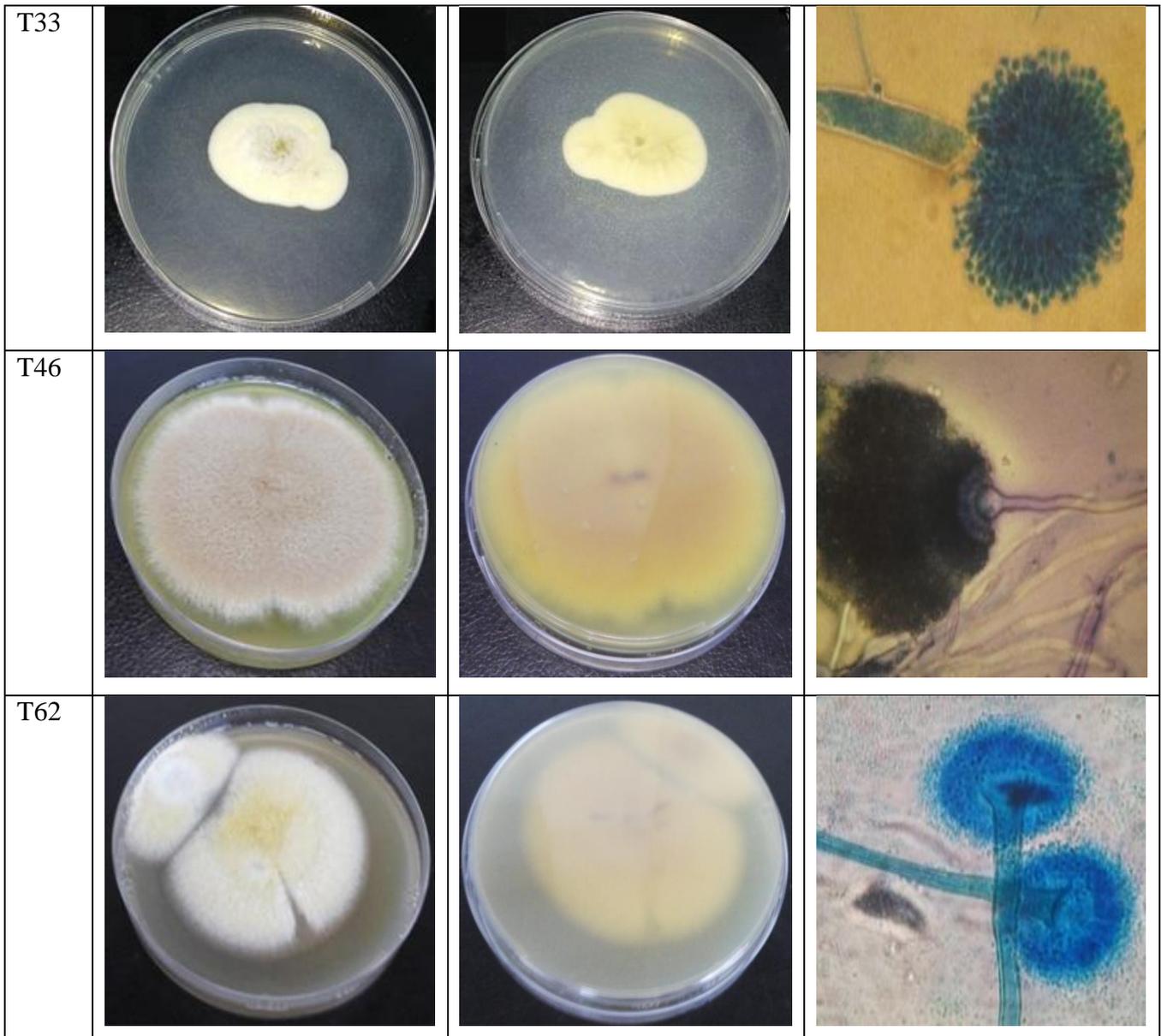
aspects macroscopiques sur milieu PDA, ainsi que les différents aspects microscopiques des isolats sélectionnés.

**Tableau 3 :** Aspects macroscopiques et microscopiques des isolats représentant les dix groupes phénotypiques d'*Aspergillus* sélectionnés ; (« L ») Laghouat, « T » Teleghma).

Code isolat	Aspect macroscopique		Aspect microscopique
L2			
L3			
L61			

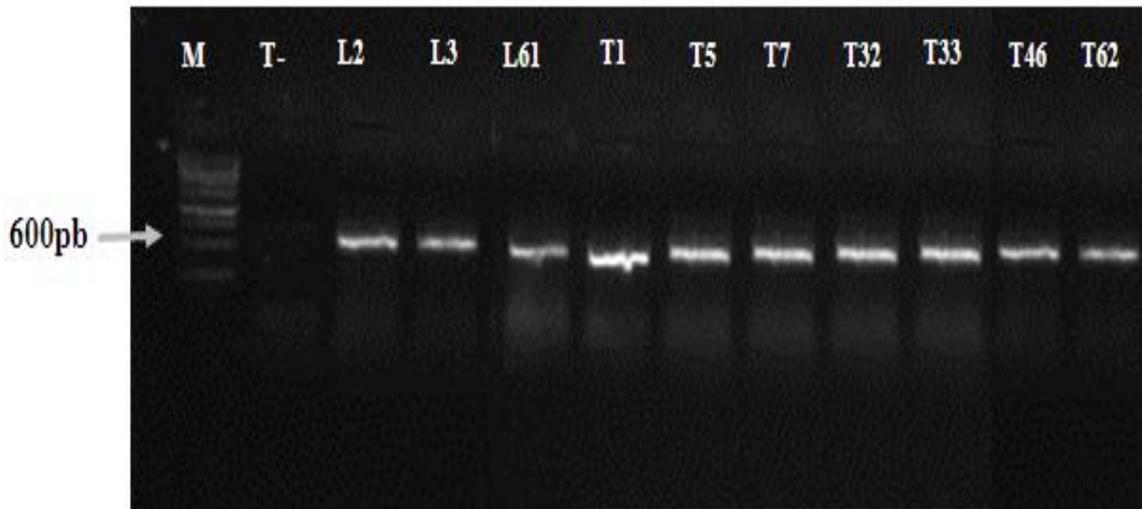
*Chapitre I: Isolement et identification des souches fongiques du genre Aspergillus*

T1			
T5			
T7			
T32			



### **2.2.3. Amplification et séquençages de l'ARNr 18S avec des amorces universelles**

L'ADN codant pour les ARN ribosomiaux 18S des dix isolats, extrait et amplifié par la technique de la PCR, est séparé par électrophorèse sur gel d'agarose. Les bandes d'ADN obtenues correspondent à celle de 600 paires de base du marqueur du poids moléculaire (Figure 13). Les produits PCR obtenus ont été séquencés, et les séquences obtenues (Annexe3) ont été comparées, par la suite, aux séquences, des autres microorganismes, enregistrées au niveau de la base de données Genbank.



**Figure 13** : Séparation sur gel d'agarose (1.5 %) des produits d'amplification par PCR des ADN des isolats d'*Aspergillus*. **M**: marqueur de poids moléculaire 1000 pb. **T<sup>-</sup>** : témoin négatif. **L2-T62** : isolats d'*Aspergillus*.

GenBank, via le programme Blastn, réalise un alignement (concordance de l'enchaînement des nucléotides entre les séquences de GenBank et celle proposée dans notre étude) et propose des séquences qui présentent les meilleurs bits scores et pourcentages d'identités avec la nôtre (Tableau 4).

La valeur du bit score mesure l'identité entre les deux séquences : celle de GenBank et la nôtre. Si la valeur de pourcentage d'identité, renvoyée par le programme Blastn, est supérieure ou égale à 97 %, cela indique que notre souche est identique à celle de GenBank et nous pouvons alors donner à notre souche le nom systématique proposé pour celle de GenBank (Stackebrandt et Goebel, 1994).

La valeur de E-value (ou Expect value) par contre, indique la probabilité de tomber sur une séquence autre que celle proposée par GenBank. Biologiquement, les bits scores significatifs doivent avoir des E-values très inférieures à 1,0 ; voire nulles (Khelili, 2015).

Les dix isolats alignés ont été identifiés comme suit : *A. quadrilineatus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. niveus*, *A. wentii*, *A. terreus*, et *A. sclerotiorum*.

**Les séquences obtenues des dix souches (L2, L3, L61, T1, T5, T7, T32, T33, T46 et T62) ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d'accension :**

MH109538, MH109539, MH109540, MH109541, MH109542, MH109543, MH109544, MH109545, MH109546, MH109547 respectivement.

**Tableau 4 :** Confrontation et correspondance biomoléculaire avec GenBank.

<b>Isolat</b>	<b>Souche proposée par GenBank</b>	<b>Numéro d'accension</b>	<b>Score</b>	<b>E-value</b>	<b>% d'identité</b>
L2	<i>Aspergillus</i>	KF938962.1	812	0.0	99%
	<i>quadrilineatus</i>	MG976236.1	865	0.0	99%
L3	<i>Aspergillus</i>	KR149637.1	977	0.0	100%
	<i>fumigatus</i>	MK424485.1	872	0.0	99%
L61	<i>Aspergillus</i>	KJ415570.1	835	0.0	99%
	<i>fumigatiaffinis</i>	KF417587.1	974	0.0	99%
T1	<i>Aspergillus</i>	KP278183.1	832	0.0	100%
	<i>flavus</i>	MK165707.1	878	0.0	100%
T5	<i>Aspergillus</i>	MG733716.1	948	0.0	100%
	<i>niger</i>	KX290301.1	979	0.0	100%
T7	<i>Aspergillus</i>	KP278196.1	788	0.0	99%
	<i>nidulans</i>	MH681806.1	826	0.0	99%
T32	<i>Aspergillus</i>	KP131610.1	872	0.0	100%
	<i>niveus</i>	MK053576.1	893	0.0	100%
T33	<i>Aspergillus</i>	KM820840.1	754	0.0	99%
	<i>wentii</i>	MH864330.1	833	0.0	99%
T46	<i>Aspergillus</i>	KR610363.1	877	0.0	100%
	<i>terreus</i>	MK418744.1	902	0.0	100%
T62	<i>Aspergillus</i>	GQ398087.1	821	0.0	99%
	<i>sclerotiorum</i>	KY963136.1	896	0.0	99%

### 3. Discussion

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à des nouvelles molécules antibactériennes. Bien que son rendement se soit réduit au cours des dernières années, néanmoins, il est pratiqué jusqu'à ce jour par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en mettant au point des méthodes de sélection qui favorisent des nouvelles espèces (Le Berre et Ramousse, 2001). En revanche, l'isolement de souches à partir d'écosystèmes rarement exploités permet éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production élevé ou inexploité des molécules bioactives (Boughachiche *et al.*, 2012).

Pour cet objectif, notre travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne de certaines souches du genre *Aspergillus* isolées à partir des sols prélevés de différents écosystèmes; station de source thermale (Hammam Safsaf) de la région de Teleghma, et palmeraie d'oasis du nord de la région de Laghouat.

En effet, le sol est un environnement complexe caractérisé par une grande diversité d'organismes (notamment les microorganismes) (Wild, 1993). En outre, les sols de ces zones, qui constituent des milieux pratiquement particuliers (peu exploités) semblent être des environnements promoteurs pour isoler des espèces producteurs des substances antibactériennes nouvelles.

Les échantillons d'analyse du sol ont été prélevés à partir du premier horizon (0 à 20 cm), dans laquelle l'essence de l'activité biologique est concentrée. Cet horizon est le plus exposé à l'air et il contient principalement des espèces aérobies (Almi *et al.*, 2015).

Le milieu de culture PDA a été choisi pour l'isolement des mycètes. Ce milieu est utilisé sous la forme gélosée afin d'obtenir des colonies distinctes les unes des autres (Davet et Rouxel, 1997). En effets, le milieu PDA est un milieu standard conçu pour l'isolement d'un large spectre de mycètes. Ce milieu est décrit par plusieurs auteurs (Moreau, 1991 ; Samson *et al.*, 2000 ; Leontopoulos *et al.*, 2002 ; Lund *et al.*, 2002), sa composition est simple et riche en matière glucidique (Chabasse *et al.*, 1999). En outre, l'isolement sélectif des champignons a été renforcé par l'addition des antibiotiques au milieu de culture qui permettent d'inhiber le développement des flores bactériennes (Benserradj, 2014).

Un nombre de 32 isolats du genre *Aspergillus* a été obtenu à partir des deux sites d'échantillonnage. Ils sont répartis comme suit : 22 isolats obtenus à partir du sol de

Teleghma, et 10 isolats à partir du sol de Laghouat. Le nombre élevé des *Aspergillus* dans le sol de la source thermale de Teleghma s'explique peut-être par le climat tempéré de cette région qui se caractérise par des précipitations annuelles moyennes de 477mm et une température moyenne de 14.8 °C. En effet, les moisissures ont besoin de l'eau pour absorber des nutriments et sont par conséquent, restreints à des environnements assez humides (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). Cependant, le pourcentage relativement faible dans le sol de Laghouat s'explique par le climat sec qui caractérise la région, et par conséquent la limite de la disponibilité en eau pour que les moisissures croissent (Raimbault, 1983 ; Guiraud, 1998).

Il est intéressant de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie, puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (Shirling et Gottlieb, 1966). Selon Botton *et al.* (1990) et Chabasse *et al.* (2002), les *Aspergillus* présentent une bonne croissance sur les milieux de culture classiques comme le milieu PDA, MEA, Sabouraud et Czapeck-Dox, et cela justifie l'utilisation de ces milieux de culture pour l'identification et la sélection des isolats de ce genre.

Les *Aspergillus* isolés, se forment des colonies poudreuses, duveteuses, cotonneuses ou granuleuses. La couleur des colonies développant une teinte caractéristique ; brune, verte, jaune ou noire, selon les espèces et le milieu de culture utilisé. Le revers en général est incolore à jaune, beige et marron. Ces observations sont en parfaite concordance avec celles constatées par Badillet *et al.* (1987) et Morin (1994).

L'observation microscopique a révélé que les filaments mycéliens des isolats sont septés et ramifiés. Sur ces filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable, sur laquelle, sont disposées les phialides. Ces dernières sont formées soit directement sur la vésicule soit portées sur des métules. Les spores sont lisses et globuleuses. Selon Guarro *et al.* (1999) et Chabasse *et al.* (2008), ces observations caractérisent exclusivement le genre *Aspergillus*.

En effet, la majorité des espèces fongiques qui appartiennent au même genre sont morphologiquement très semblables et difficiles à distinguer. Cependant, les méthodes moléculaires, basées sur le polymorphisme des séquences d'ADN et les amplifications par PCR, se sont montrées très utiles dans la caractérisation des isolats de ce genre, tant dans des études d'identification (Hjeljord et Tronsmo, 1998), que dans l'élaboration de classifications phylogénétiques (Kullnig-Gradinger *et al.*, 2002). En supplément, l'application des outils de

caractérisation moléculaire a montré qu'une identification strictement phénotypique pouvait conduire à des erreurs d'identification (Balajee *et al.*, 2006).

Ce travail a été basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr, y compris les séquences des espaceurs internes transcrits (ITS) (Driver *et al.*, 2000 ; Entz *et al.*, 2005). Ces derniers permettent de différencier les espèces à l'intérieur d'un genre ou parmi une population (Henson et French, 1993; White *et al.*, 1990). En outre, l'analyse des ITS de plusieurs espèces de champignons a permis de conclure à la validité ou non de l'emploi des critères morphologiques utilisés dans l'identification des espèces et la classification des champignons (Sadfi-Zouaoui *et al.*, 2008).

Pour cela, l'identification morphologique a été confirmée par des analyses moléculaires. En effet, la collection de 32 isolats du genre *Aspergillus* a été subdivisée en 10 groupes phénotypiques, en se basant sur les caractères morphologiques.

Les ADN des *Aspergillus* sélectionnés, codants pour les ARN ribosomiaux 18S (un gène chromosomique présent chez toutes les espèces fongiques « gène universel »), ont été d'abord extraits, puis amplifiés par la technique de la PCR. Les produits PCR obtenus ont été séquencés et comparés, par la suite, avec les séquences des microorganismes enregistrés au niveau de la base de données Genbank. L'analyse des séquences d'ARNr 18S des isolats fongiques a permis de les affilier et d'arriver à une identification au niveau de l'espèce.

En effet, les isolats appartiennent à dix espèces différentes à savoir ; *A. quadrilineatus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. niveus*, *A. wentii*, *A. terreus*, et *A. sclerotiorum*.

## **Chapitre II: Mise en évidence de l'activité antibactérienne**

Les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont connues par leur production de substances antibiotiques (Botton *et al.*, 1990 ; Taniwaki *et al.*, 2003). L'un des objectifs de notre étude est de rechercher de nouvelles molécules à effet antibactérien. En effet, les stratégies de recherche de nouveaux antibiotiques passent, en premier lieu, par la mise en évidence de cette activité antibactérienne et ceci se considère comme un criblage primaire (Boughachiche, 2012).

À ce titre, toutes les espèces du genre *Aspergillus* isolées ont été dépistées pour voir leur activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif et négatif et ceci par l'utilisation de différentes méthodes (technique des cylindres d'agar, technique des disques et technique des puits).

### **1. Matériel et méthodes**

#### **1.1. Souches bactériennes**

La collection bactérienne utilisée est composée de six souches bactériennes, quatre souches ATCC (American Type Culture Collection), qui ont été fournies par le laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne de Constantine, qui sont en l'occurrence :

- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)
- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Et deux souches cliniques, qui nous ont été fournies aimablement par les responsables du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalier Universitaire de Constantine (CHUC), à savoir :

- *Enterococcus sp.*
- *Klebsiella sp.*

La réactivation des bactéries est faite par ensemencement sur des milieux de culture convenables pour chaque bactérie (Tableau 5) (Annexe 1) selon la méthode des quadrants. L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24 h.

**Tableau 5 :** Les différentes bactéries tests et leurs milieux convenables.

Bactérie	Milieu de culture
<i>S. aureus</i>	Chapman
<i>B. subtilis</i>	Trypticase Soy Agar (TSA)
<i>Enterococcus sp.</i>	TSA
<i>E. coli</i>	Hecktoen
<i>P. aeruginosa</i>	Gélose au cétrimide
<i>Klebsiella sp.</i>	Hecktoen

### 1.1.1. Confirmation de la pureté des bactéries tests

La vérification de la pureté des souches tests a été réalisée par :

#### ➤ Observation macroscopique

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

#### ➤ Observation microscopique

Par ailleurs, l'examen microscopique des bactéries a englobé la technique de coloration de Gram décrite par Delarasse en 2007, qui permet l'observation de la forme, le mode de regroupement et le type de Gram des cellules bactériennes.

### 1.1.2. Identification des souches cliniques au niveau de l'espèce

L'identification des souches cliniques a été effectuée par la technique de MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization. Time Of Flight Mass Spectrometry). Son principe général est basé sur l'étude du déplacement d'entités ioniques dans des champs électromagnétiques, ce qui permet l'identification des bactéries grâce à l'analyse de leur contenu protéique (Claydon *et al.*, 1996).

Cette technique a été réalisée selon le protocole de Seng *et al.* (2009) et Bizzini *et al.* (2010) en suivant ces étapes :

- **Préparation de la matrice**

La solution extemporanée de matrice se compose de 200 à 500  $\mu\text{L}$  de 50 % (v/v) acétonitrile, 2.5 % (p/v) TFA (Trifluoroacetic Acid) dans laquelle quelques cristaux de  $\alpha$ -HCCA (d'alpha-cyano-4-hydroxycinnamic Acid) vont saturer la solution. Après avoir vortexé la solution pendant quelques minutes, elle est soniquée pendant 2 min (P : 30 W, F : 50/60Hz) à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une solution saturée, ensuite la solution est centrifugée pendant 1 min à 6000 g, puis le surnageant est transféré dans un tube propre.

- **Dépôt de l'échantillon**

Une colonie bactérienne bien isolée a été prélevée (à partir d'une culture fraîche sur gélose incubée pendant 24 h à 37°C), et déposée à l'aide d'une pointe de pipette (en deux exemplaires) dans les zones définies (cercles) de la cible MSP 96.

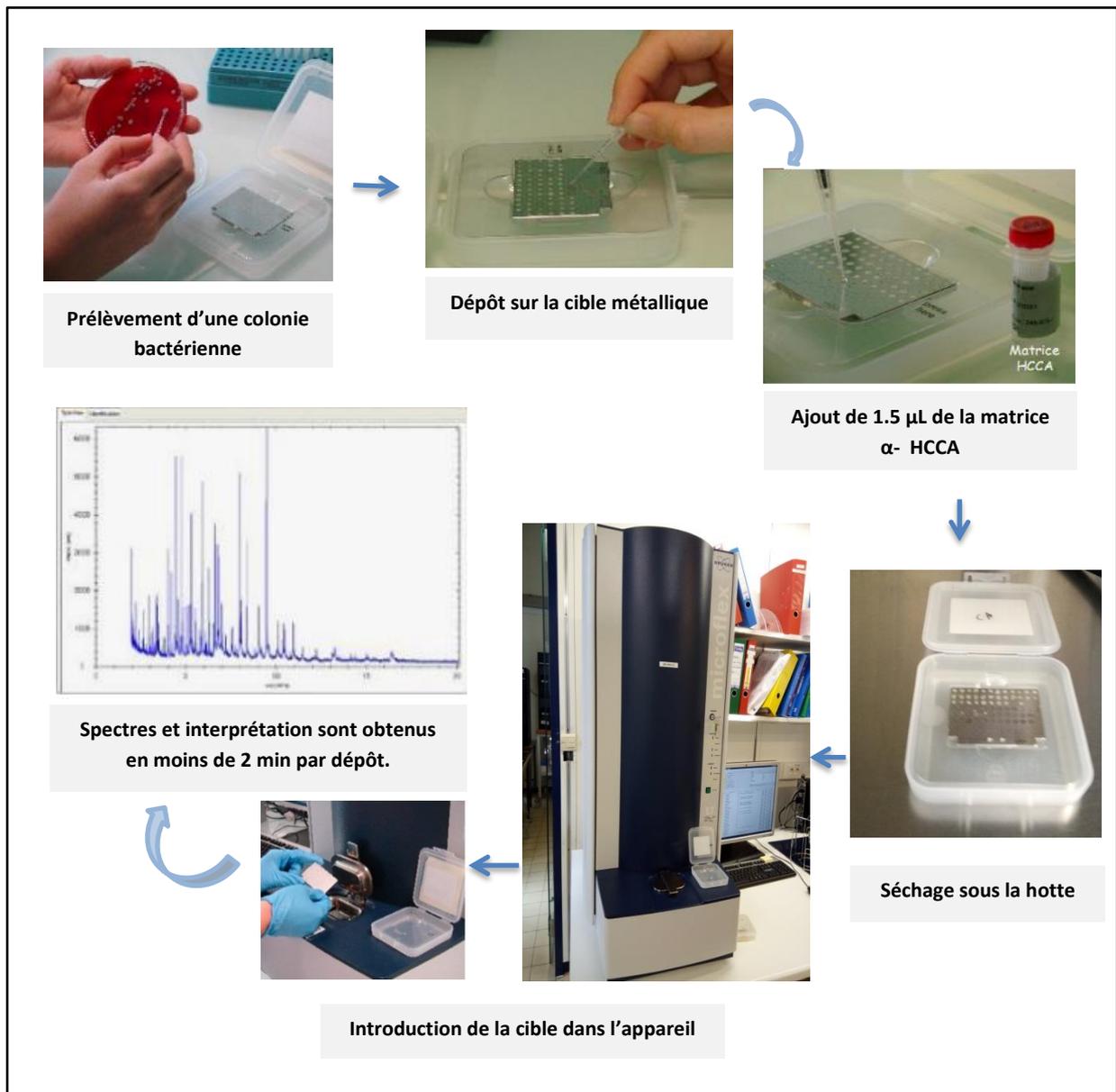
Une fois tous les dépôts effectués, 1.5  $\mu\text{L}$  de la matrice est déposé sur chaque spot, puis le tout est laissé à sécher pendant 5 min sous la hotte.

- **Détermination des masses**

L'identification des bactéries par MALDI TOF MS a été réalisée sur un Microflex LT, avec le logiciel FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics) pour l'acquisition automatique des spectres de masse en mode positif linéaires avec une gamme de 2 à 20 KDa. L'analyse automatisée des données spectrales brutes a été effectuée par le logiciel BioTyper<sup>TM</sup> 2.0 (Bruker Daltonics) ; il utilise une grande base de données contenant des spectres de références (plus de 3200 souches de références) (Nagy *et al.*, 2009). La concordance des spectres obtenus à partir des bactéries tests avec ceux des souches de référence est traduite par des scores (de 0 jusqu'à 3) qui indiquent le degré de confiance à accorder à l'identification (Tableau 6) (Lartigue *et al.*, 2009; Cherkaoui *et al.*, 2010). Le processus du test et de la technologie MALDI TOF MS sont présentés dans la figure (14).

**Tableau 6 :** Score de concordance des spectres obtenus à partir d'une bactérie d'intérêt avec ceux de la base de données Biotyper, reflétant le degré de confiance à accorder à l'identification.

Score	Description	Symbole
2.300 – 3.000	Forte probabilité d'identification à l'espèce	+++
2.000 – 2.299	Identification du genre sécurisée, identification à l'espèce probable	++
1.700 – 1.999	Identification au genre probable	+
0.000 – 1.699	Degré de confiance insuffisant pour l'identification	-



**Figure 14 :** Etapes d'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à partir d'une colonie bactérienne.

### **1.1.3. Conservation des souches bactériennes**

À partir des cultures bactériennes réalisées sur milieux gélosés, des colonies sont raclées et transférées dans des bouillons nutritifs additionnés de glycérol 20 % (v/v) et conservées à -20°C (kitouni, 2007).

### **1.1.4. Sensibilité aux antibiotiques**

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques en milieu Mueller Hinton selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (Meziani, 2012 ; Bousseboua, 2005). Les antibiotiques testés avec leurs diamètres critiques sont représentés dans le tableau (7).

- **Préparation des bactéries tests**

Des suspensions bactériennes ont été préparées à partir des cultures jeunes (de 18 à 24 h), la densité cellulaire de chaque suspension a été ajustée par dilution dans l'eau physiologique (0.9 % NaCl) stérile et en comparaison avec la solution 0.5 Mc Farland (une densité optique égale à 0.2 à 650 nm. Annexe 2) de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$  UFC/mL (Cavalla et Eberlin, 1994).

- **Disposition des disques d'antibiotiques**

Après l'ensemencement, les disques sont déposés sur la gélose à l'aide d'une pince flambée, en appuyant doucement sur chaque disque pour assurer un contact uniforme avec le milieu. Les boîtes sont ensuite laissées à la température ambiante pendant 30 min sur la pailasse pour permettre la diffusion de l'antibiotique dans la gélose, après les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 h.

- **Lecture interprétative**

Les diamètres d'inhibition autour des disques sont mesurés puis ils sont comparés aux diamètres critiques conformément aux normes CASFM. Il convient de noter toutefois, qu'une souche dont la sensibilité aux antibiotiques est ainsi évaluée peut être déclarée "sensible, intermédiaire ou résistante".

**Tableau 7:** Diamètres critiques pour l'appréciation de la Sensibilité/Résistance selon les recommandations du CASFM.

L'antibiotique	La dose (µg)	Diamètres critiques (mm)	
		Sensible (S)	Résistante (R)
Amoxicilline (AX)	25	> 21	< 14
Amoxicilline Augmentin (AMC)	30	> 21	< 14
Céfazoline (CZ)	30	> 18	< 12
Céfotaxime (CTX)	30	> 21	< 15
Céfoxitine (CFM)	05	> 22	< 15
Ticarcilline (TIM)	85	> 22	< 18
Piperacilline (PI)	100	> 20	< 12
Gentamicine (CN)	10	> 16	< 14
Amikacine (AK)	30	> 17	< 15
Acide nalidixique (NA)	30	> 20	< 15
Triméthoprime Sulfamide (SXT)	25	> 16	< 10
Colistine (CL)	10	> 11	< 09
Péfloxacine (PEF)	05	> 22	< 16
Ciprofloxacine (CIP)	05	> 30	< 15
Pénicilline (P)	10	> 29	< 08
Oxacilline (OX)	01	> 20	< 20
Pristinamycine (RP)	15	> 19	< 19
Rifamycine (RA)	05	> 19	< 14
Vancomycine (VA)	30	> 17	< 17
Erythromycine (E)	15	> 22	< 17
Tétracycline (TE)	30	> 19	< 17

## 1.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des dix souches fongiques étudiées est effectuée par trois techniques différentes ; la technique des cylindres d'agar (contacte directe

entre le champignon et la bactérie), la technique des disques et la technique des puits (en testant le filtrat brute de la fermentation).

Pour les trois méthodes, les suspensions bactériennes ont été préparées comme décrit ci-dessus (1.1.4).

### **1.2.1. Technique des cylindres d'agar**

Les souches fongiques ont été ensemencées sur milieu PDA. Après 14 jours d'incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été perforés à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencés par écouvillonnage selon la technique du NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) par les bactéries tests. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'agar sont placées à 4°C, pendant 4 h, pour permettre la diffusion des substances bioactives élaborées par les souches fongiques, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h (Gungi *et al.*, 1983 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Devaraju et Satish, 2011).

### **1.2.2. Techniques des disques et des puits**

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

#### **1.2.2.1. Fermentation**

La production des métabolites secondaires, par les souches fongiques, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971). Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est le PDB (Potatoes dextrose broth). Des flacons de 500 mL, contenant 100 mL du milieu de culture, ont été inoculés par huit disques de culture âgée de sept jours pour chaque souche, et incubées à 28°C pendant 14 jours.

Après fermentation, et afin de tester l'activité antibactérienne des surnageants des cultures, les contenus des flacons de fermentation ont été filtrés à travers du papier Whatman N°1, afin de séparer le mycélium du milieu de culture supposant contenir les molécules bioactives. Le filtrat, ainsi obtenu, a été filtré de nouveau à travers des filtres millipores stériles de 22 µm de diamètre pour le stériliser (Abdelaziz, 2006).

### **1.2.2.2. Technique des disques**

Le test de l'activité antibactérienne des filtrats obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes. Un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne a servi àensemencer uniformément toute la surface de la boîte contenant le milieu Mueller Hinton. Après séchage de la surface (environ 5 min), des disques de 6 mm de diamètre du papier Wattman sont imbibés avec 10 µL de filtrat à tester, puis séchés et déposés sur la surface des boîtes. Ces dernières, sont incubées à 4°C dans un réfrigérateur pendant 2 h pour permettre la diffusion des substances bioactives, par la suite placées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 h (Yamaç and Bilgili, 2006 ; Hazline *et al.*, 2009).

### **1.2.2.3. Technique des puits**

Cette technique consiste à perforer la gélose Mueller Hintonensemencée avec les bactéries tests à l'aide d'un perforateur de façon à obtenir des puits de 3 mm de diamètre. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 20 µL d'extrait, ensuite les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 30 min, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h (Tortorano *et al.*, 1979).

**NB :** Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, les diamètres des zones claires autour des cylindres d'agar, des disques et des puits révélant l'activité antibactérienne des souches fongiques ont été mesurés. Les tests ont été effectués en triplicata (Yamaç et Bilgili, 2006).

## 2. Résultats

### 2.1. Confirmation de la pureté des bactéries tests

Après 24 h d'incubation, les bactéries tests ont montré un bon développement sur leurs milieux convenables ou sélectifs. L'aspect des colonies dépend de la souche et du milieu de culture utilisé (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Description macroscopique des bactéries tests.

Bactérie	Description macroscopique
<i>S. aureus</i>	Des petites colonies rondes, régulières, brillantes, de couleur jaune orangée (mannitol +)
<i>B. subtilis</i>	Des grandes colonies, irrégulières, de couleur blanche crémeuse
<i>Enterococcus sp.</i>	Des petites colonies rondes, brillantes de couleur transparente, avec un bord régulier
<i>E. coli</i>	Des colonies orangées (lactose +), irrégulières, de de taille moyenne
<i>P. aeruginosa</i>	Des colonies irrégulières, pigmentées en vert pâle, de taille moyenne
<i>Klebsiella sp.</i>	Des colonies rondes, brillantes, de taille moyenne et de couleur orangée (lactose +)

Par ailleurs, l'examen microscopique des bactéries a été effectué par la technique de la coloration de Gram (englobe l'observation de la forme, le mode de regroupement et le type de Gram). Les résultats sont représentés dans le tableau 9.

**Tableau 9 :** Description microscopique des bactéries tests.

Bactérie	Description microscopique
<i>S. aureus</i>	cocci à coloration de Gram positif, en diplocoques et en chaînettes
<i>B. subtilis</i>	des bâtonnets à coloration de Gram positif en chaînette
<i>Enterococcus sp.</i>	des coques à coloration de Gram positif, isolés, arrangés en paires et en chaînettes
<i>E. coli</i>	des bacilles à coloration de Gram négatif, libres, arrangés en paires et en chaînettes
<i>P. aeruginosa</i>	des bâtonnets à coloration de Gram négatif, isolés et arrangés en paires
<i>Klebsiella sp.</i>	des bacilles à coloration de Gram négatif, arrangés en paires

En effet, cette étude phénotypique (macroscopique et microscopique) a confirmé la pureté des souches bactériennes fournies (Figures 15 et 16 de l'annexe 4).

## 2.2. Identification des souches cliniques au niveau de l'espèce

Les deux souches bactériennes ont été soumis à une analyse de cellule entière de type MALDI-TOF MS. Le traitement de données a été réalisé par le logiciel BioTyper™ 2.0 (Bruker Daltonics) qui peut utiliser différentes banques de données pour produire, à partir des spectres, des listes de pics ou des références de spectres. Le logiciel génère automatiquement les listes de pics à partir de tous les spectres et extrait les pics typiques qui sont présents dans les spectres répertoriés pour une espèce donnée.

L'identification par MALDI-TOF MS a donné un score valide supérieur à 2 pour les souches bactériennes permettant ainsi l'identification au niveau de l'espèce.

En effet, pour la première souche, l'analyse a donné un score de 2.26, correspondant à l'espèce *Enterococcus faecalis*. Cependant, l'analyse de la deuxième souche a donné un score de 2.06 correspondant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*.

Les scores avec les noms des espèces de références sont représentés dans le tableau 10.

**Tableau 10 :** Résultats d'identification des bactéries tests par MALDI-TOF MS.

Bactérie test	Profil de référence	Score	Classement (Qualité)
S1	<i>Enterococcus faecalis</i> 104575 LDW	<b>2.260</b>	++
S2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> 37585 PFM	<b>2.060</b>	++

## 2.3. Sensibilité des bactéries aux antibiotiques

La sensibilité des bactéries tests aux 21 antibiotiques utilisés a donné les résultats présentés dans le tableau 11. Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés et interprétés selon les indications de CASFM. L'interprétation des diamètres a permis de classer les bactéries tests en trois classes : bactérie sensible, bactérie intermédiaire et bactérie résistante.

En effet, la bactérie *S. aureus* a montré une sensibilité à tous les antibiotiques testés sauf le céfoxitine avec lequel elle a présenté le phénotype intermédiaire.

Cependant, les trois souches bactériennes ; *B. subtilis*, *E. faecalis* et *P. aeruginosa* ont montré des sensibilités différentes aux antibiotiques standards testés ;

- *B. subtilis* a présenté le phénotype sensible envers la Gentamicine, Amikacine, Péfloxacine, Pristinamycine, Rifamycine, Vancomycine et la Tétracycline, tandis qu'elle a montré une résistance aux  $\beta$ -lactamines testés (Amoxicilline, Amoxicilline + Augmentin, Céfoxitine, Pénicilline, et Oxacilline)
- *E. faecalis* a montré une certaine sensibilité vis-à-vis de l'Amoxicilline, Amoxicilline + Augmentin, Triméthoprim + Sulfamide, Pristinamycine, et la Vancomycine, en revanche elle a présenté le phénotype résistant envers la Gentamicine, Pénicilline, et la Tétracycline.
- *P. aeruginosa* a montré une sensibilité vis-à-vis de la Céfotaxime, Ticarcilline, Piperacilline, Gentamicine, Amikacine, Colistine, et la Ciprofloxacine, par contre elle est résistante à l'Amoxicilline, Amoxicilline + Augmentin, Céfazoline, Céfoxitine, Triméthoprim + Sulfamide et à l'Acide nalidixique.

En ce qui concerne la souche *E. coli*, elle a présenté le phénotype sensible avec tous les antibiotiques testés.

Par ailleurs, la souche bactérienne *K. pneumoniae* a montré une résistance remarquable, et ceci avec la majorité des antibiotiques utilisés (Amoxicilline, Amoxicilline + Augmentin, Céfazoline, Céfotaxime, Céfoxitine, Ticarcilline, Piperacilline, Gentamicine et Triméthoprim + Sulfamide).

**Tableau 11** : Sensibilité des bactéries tests aux antibiotiques. (S) sensible ; (I) intermédiaire ; (R) résistante ; (-) non testé.

<b>Souche</b> <b>Antibiotique</b>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Amoxicilline (AX)	-	R	S	S	R	R
Amoxicilline Augmentin (AMC)	-	R	S	S	R	R
Céfazoline (CZ)	-	-	-	S	R	R
Céfotaxime (CTX)	-	-	-	S	S	R
Céfoxitine (CFM)	I	R	-	S	R	R
Ticarcilline (TIM)	-	-	-	S	S	R
Piperacilline (PI)	-	-	-	S	S	R
Gentamicine (CN)	S	S	R	S	S	R
Amikacine (AK)	S	S	I	S	S	S
Acide nalidixique (NA)	-	-	-	S	R	I
Triméthoprine Sulfamide (SXT)	S	I	S	S	R	R
Colistine (CL)	-	-	-	S	S	S
Péfloxacine (PEF)	S	S	I	S	I	I
Ciprofloxacine (CIP)	-	-	-	S	S	I
Pénicilline (P)	S	R	R	-	-	-
Oxacilline (OX)	S	R	-	-	-	-
Pristinamycine (RP)	S	S	S	-	-	-
Rifamycine (RA)	S	S	-	-	-	-
Vancomycine (VA)	S	S	S	-	-	-
Erythromycine (E)	S	I	I	-	-	-
Tétracycline (TE)	S	S	R	-	-	-

## 2.4. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les dix espèces fongiques isolées ont été dépistées sur leur pouvoir antibactérien en utilisant trois techniques différentes : la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

### 2.4.1. Technique des cylindres d'agar

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

Pour cette technique, les résultats ont montré que presque toutes les souches fongiques testées ont la capacité à produire des molécules à effet antibactérien. Le tableau 12 présente les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus.

**Tableau 12 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des cylindres d'agar. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 6$  mm.

Souches	Zone d'inhibition (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>A. quadrilineatus</i>	33.67 ± 6.03	-	20.00 ± 2.00	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	34.33 ± 6.03	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatiaffinis</i>	30.67 ± 1.15	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	13.00 ± 2.00	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i>	16.67 ± 1.15	-	-	-	-	-
<i>A. niveus</i>	33.00 ± 2.65	-	-	-	-	-
<i>A. wentii</i>	31.33 ± 3.21	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i>	32.00 ± 2.00	-	-	-	-	-
<i>A. sclerotiorum</i>	30.67 ± 1.15	-	-	-	-	-

En effet, neuf espèces fongiques sur dix ont présenté une activité antibactérienne contre la bactérie *S. aureus* où les moyennes des diamètres des zones d'inhibition sont allées de 13 à 34,33 mm. Les zones d'inhibition les plus fortes ont été observées chez les espèces fongiques ; *A. fumigatus*, *A. quadrilineatus*, *A. niveus*, *A. terreus*, *A. wentii*, *A. fumigatiaffinis* et

*A. sclerotiorum*, avec des diamètres de 34.33, 33.67, 33, 32, 31.33, 30.67, 30.67 mm respectivement.

En revanche, la souche bactérienne *E. faecalis* a montré une sensibilité uniquement avec la souche fongique *A. quadrilineatus* avec un diamètre de 20 mm. Par ailleurs, aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les quatre souches testées *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, et *K. pneumoniae*.

#### **2.4.2. Techniques des disques et des puits**

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

- **Fermentation**

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

##### **2.4.2.1. Technique des disques**

Après la diffusion des composés antibactériens sur gélose, des zones d'inhibition apparues sur les boîtes. Le tableau 13 ci-dessous présente les différents diamètres.

**Tableau 13 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des disques. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 6$  mm.

Souches	Zone d'inhibition (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>A. quadrilineatus</i>	11.00 $\pm$ 2,00	-		-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatiaffinis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	7.00 $\pm$ 1.00	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. niveus</i>	-	9.00 $\pm$ 1.00	-	-	-	-
<i>A. wentii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i>	8.00 $\pm$ 1.00	7.00 $\pm$ 1.00	-	-	-	-
<i>A. sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-	-

Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par les filtrats de quatre souches fongiques à savoir ; la souche *A. quadrilineatus* et la souche *A. flavus* contre que la bactérie *S. aureus* avec des moyennes des diamètres des zones d'inhibition de 11 et 7 mm respectivement, la souche *A. niveus* contre seulement la bactérie *B. subtilis* avec une zone d'inhibition de 9 mm de diamètre, et la souche *A. terreus* contre les deux bactéries *S. aureus* et *B. subtilis* avec des diamètres des zones d'inhibition de 8 et 7 mm respectivement.

Concernant les filtrats des autres souches fongiques ; *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. wentii*, et *A. sclerotiorum*, aucun d'entre eux n'a montré une activité contre les souches bactériennes testées.

#### 2.4.2.2. Techniques des puits

Après 24h d'incubation, certaines souches fongiques ont montré une activité antibactérienne vis-à-vis les bactéries tests et ce, par l'apparition des zones d'inhibition autour des puits. Le tableau 14 montre les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus.

**Tableau 14 :** Mise en évidence de l'activité antibactérienne des souches fongiques par la technique des puits. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 3$  mm.

Souches	Zone d'inhibition (mm)					
	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>
<i>A. quadrilineatus</i>	10.00 ± 1,00	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. fumigatiaffinis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. flavus</i>	5.00±1.00	-	-	-	-	-
<i>A. niger</i>	6.00±1.00	-	-	-	-	-
<i>A. nidulans</i>	11.00±2.00	-	-	-	-	-
<i>A. niveus</i>	-	11.00 ± 1.00	-	-	-	-
<i>A. wentii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>A. terreus</i>	9.00±1.00	7.00±1.00	-	-	-	-
<i>A. sclerotiorum</i>	-	-	-	-	-	-

D'après les résultats mentionnés dans le tableau 14, seulement deux souches bactériennes, *S. aureus* et *B. subtilis* ont montré une sensibilité avec les filtrats fongiques, contrairement aux *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae* sur lesquelles les filtrats de toutes les espèces fongiques n'ont eu aucune activité.

En effet, les quatre souches fongiques ; *A. quadrilineatus*, *A. flavus*, *A. niger* et *A. nidulans* ont présenté une activité antibactérienne contre uniquement la bactérie *S. aureus* avec des diamètres des zones d'inhibition de 10, 5, 6 et 11 mm respectivement.

Cependant, la souche *A. niveus* a montré un effet antibactérien contre que la bactérie *B. subtilis* avec un diamètre de 11 mm. En revanche, l'effet inhibiteur de la souche *A. terreus* est manifesté contre les deux bactéries *S. aureus* et *B. subtilis* avec des diamètres des zones d'inhibition de 9 et 7 mm respectivement.

### 3. Discussion

L'objectif de ce présent travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques du genre *Aspergillus*.

La collection bactérienne utilisée est composée de six souches bactériennes, quatre souches ATCC ; *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), et deux souches cliniques ; *Enterococcus sp.* et *Klebsiella sp.*

La vérification de la pureté des souches tests a été réalisée par observation macroscopique (aspect des colonies sur milieu de culture solide) et microscopique (forme, mode de regroupement et type de Gram) (Guiraud, 1998 ; Delarasse, 2007). Après 24 h d'incubation, les résultats obtenus confirment la pureté des souches tests fournies, et cela en se basant sur les clés d'identification des bactéries (Beargie *et al.*, 1975 ; Singleton, 1999 ; Percival, 2004 ; Dworkin et Falkow, 2006 ; Prescott *et al.*, 2007 ; Schloissnig *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les deux souches cliniques, l'identification par MALDI-TOF MS a donné des scores valides pour les deux souches, permettant ainsi l'identification au niveau de l'espèce. En effet, l'analyse a donné un score de 2.26 pour la première souche, correspondant à l'espèce *Enterococcus faecalis*, et un score de 2.06 pour la deuxième souche correspondant à l'espèce *Klebsiella pneumoniae*. Cela montre que chaque espèce appartient au même genre préalablement identifié par la méthode phénotypique, ce qui implique l'existence d'une parfaite concordance entre les deux techniques. Cette concordance a été également observée chez d'autres auteurs où ils mettent en évidence les performances du MALDI-TOF comparés à certains systèmes d'identifications de référence (Khelili, 2015). En plus, au cours des dernières années, cette technique a été utilisée dans des études spécifiques qui ont essentiellement évalué sa capacité à identifier les différents genres bactériens chez les bactéries à Gram négatif telles que *E. coli* et d'autres membres de la famille des entérobactéries (Conway *et al.*, 2001 ; Camara et Hays, 2007), des cocci à Gram positif, telles que *S. aureus* et des streptocoques (Edwards-Jones *et al.*, 2000) et certains bacilles à Gram positif tels que *B. cereus* et *Listeria* (Ryzhov *et al.*, 2000 ; Barbuddhe *et al.*, 2008).

Chaque souche bactérienne a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité et la résistance aux différents antibiotiques. Les résultats montrent que les souches bactériennes présentent des phénotypes de sensibilités différents aux antibiotiques testés. En effet, l'utilisation de souches bactériennes sensibles aux antibiotiques comme germes cibles

(*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli*, et *P. aeruginosa*), vise la détection de toutes substances antibactériennes, alors que l'utilisation de germes résistants aux  $\beta$ -lactamines, aux sulfamides, et à la tétracycline (*K. pneumoniae*), vise la recherche d'antibiotiques à structures particulières pouvant détourner le mécanisme de résistance. En effet, la recherche d'antibiotiques actifs contre des germes multirésistants constitue une des meilleures stratégies dans la découverte de nouveaux antibiotiques (Ceylan *et al.*, 2008 ; Rajan et Kannabiran, 2010).

L'activité antibactérienne des souches fongiques a été mise en évidence par trois techniques différentes à savoir ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.

Ces méthodes de diffusion, nous ont permis de détecter l'effet inhibiteur des souches fongiques envers les bactéries tests utilisées (Tortorano *et al.*, 1979). La croissance de la bactérie test ensemencée sur la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible (Loucif, 2011).

Les souches fongiques ont été ensemencées sur milieu PDA, la performance de ce milieu, très utilisé dans la mise en évidence de l'activité antimicrobienne, s'explique par la présence de l'amidon, cette source de carbone lentement métabolisable, s'avère souvent bonne pour la production d'antibiotique (Awad, 2005).

Le choix du milieu Mueller Hinton pour le test de l'effet antibactérien a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries tests et offrant des résultats claires grâce à sa limpidité.

La faible concentration de l'inoculum bactérien reconnue aussi comme un des facteurs intervenant dans l'augmentation de la sensibilité de la technique. Elle a été fixée à une densité optique qui ne dépasse pas 0.2 à une longueur d'onde de 650 nm (Brooks *et al.*, 1995 ; Madigan *et al.*, 1997).

Dans le but d'accroître encore la sensibilité de la détection, une pré-diffusion des molécules actives dans la gélose ensemencée, a été favorisée par un séjour à 4°C pendant 2 à 4 h avant l'incubation comme le préconise (Tortorano *et al.*, 1979).

Les résultats de la mise en évidence montrent que toutes les souches fongiques testées ont la capacité de produire des molécules à effet antibactérien. Ces métabolites secondaires biologiquement actifs, sont synthétisés en fin de croissances (Attalah et Kacem chaouche, 1992). En effet, les espèces du genre *Aspergillus* se révèlent de véritables usines métaboliques responsables de la synthèse de pléthore de composés chimiques (Olivier, 2007), dont les substances à effet antibactérien (Maria *et al.*, 2005 ; Madki *et al.*, 2010). Et cela a été prouvé par plusieurs chercheurs dont Irobi *et al.* (2000), qui ont travaillé sur l'espèce fongique *A. quadrilineatus* et ils ont trouvé que cette dernière ayant une activité antimicrobienne remarquable contre *S. aureus* et *B. subtilis*. Niede *et al.* (2002), qui ont montré que l'*A. fumigatus* ayant une activité antimicrobienne remarquable contre *S. aureus*, *Candida albicans* et *Micrococcus luteus*. Ainsi que Barakat et Gohar (2012), qui ont montré que l'*A. terreus* ayant une activité antibactérienne considérable par rapport à certains antibiotiques classiques. En 2013, Al-Shaibani *et al.*, ont travaillé aussi sur l'activité antibactérienne de l'espèce fongique *A. niger*, les résultats ont révélé que cette espèce possède un effet inhibiteur contre *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus sp.* Ola *et al.* (2014), ont trouvé que la néosartorine qui a été isolée d'*A. fumigati*affinis présente une activité antibactérienne importante contre un large spectre d'espèces bactériennes à Gram positif, y compris les staphylocoques, les streptocoques, les entérocoques et *B. subtilis*. En supplément, Phainuphong *et al.* (2017), ont trouvé que l'acide pénicillique isolée d'*A. sclerotiorum* a une activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli* avec des valeurs de CMI de 128 mg / mL.

L'utilisation de diverses méthodes pour la mise en évidence montre qu'il existe une différence entre les résultats obtenus par les trois techniques, soit de point de vue quantitatif lorsque on compare les diamètres des zones d'inhibition obtenus par les mêmes filtrats (techniques des disques et puits) sur les mêmes bactéries tests. Cela peut être expliqué par la faible concentration utilisée dans la méthode des disques (10 µL) par rapport à celle utilisée dans la méthode des puits (20 µL). Soit de point de vue qualitatif, lorsqu'on compare la sensibilité des bactéries tests aux cylindres d'agar avec la sensibilité aux filtrats, ce qui peut être due à la différence de nature des molécules sécrétées dans milieu solide et un milieu liquide. En effet, selon Omoto *et al.* (1979) ; Shomura *et al.* (1979), et Kuroya *et al.* (1949), il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide. Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes fragmentent ce qui diminue leur capacité de

produire des antibiotiques (Stocks et Thomas, 2001) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (Olson et Ratzkin, 1999), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus par la technique des cylindres d'agar et qui ne sont pas retrouvés dans les filtrats des souches testés par la technique des disques et la technique des puits (Bussari *et al.*, 2008).

## **Chapitre III : Etude préliminaire de l'activité antibactérienne**

Le test de la mise en évidence de l'activité antibactérienne nous a permis de sélectionner trois espèces fongiques qui présentent un effet antibactérien considérable, et qui sont en l'occurrence ; *A. quadrilineatus*, *A. niveus* et *A. wentii*.

Le choix de ces espèces pour la suite de notre travail est donc, largement justifié d'autant plus que ces espèces ne sont pas bien développées par les chercheurs sur le volet des métabolites secondaires à activité antibactérienne.

En effet, dans la troisième partie de ce travail, différentes analyses sont effectuées pour obtenir des informations sur les propriétés des molécules à activité antibactérienne des souches étudiées, afin d'appréhender les problèmes posés par l'extraction et la purification de composés inconnus. Ces tests appliqués à des extraits de fermentations, constituent le criblage secondaire dans la stratégie de recherche de nouveaux antibiotiques. Les résultats obtenus nous permettront de choisir les méthodes appropriées pour la purification et la caractérisation des molécules bioactives produites par ces trois souches.

### **1. Matériel et méthodes**

#### **1.1. Choix du solvant optimum pour l'extraction des molécules bioactives**

Cinq solvants de polarités différentes ont été testés séparément; le chloroforme, l'hexane, le méthanol, le butanol et l'acétate d'éthyle, pour extraire les substances bioactives (Loucif, 2011 ; Boughachiche, 2012).

- **Préparation des extraits**

Les *Aspergillus* sélectionnés sont réensemencés dans le milieu PDB. Après 14 jours d'incubation à 28°C, un volume identique du solvant testé (100 mL) est ajouté dans chaque flacon contenant la culture fongique, le tout est broyé à l'aide de l'ultraturrax, puis filtré sur papier Whatman N°1. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décantation, cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 mL du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.

Cependant la phase organique obtenue a été concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un Rotavapor (Gengan *et al.*, 1999 ; Zerroug, 2011 ; Ghorri, 2015). Chaque extrait fongique

a été dissous dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de façon à obtenir une concentration de 100 mg/mL.

La figure 17 résume les différentes étapes d'extraction des métabolites secondaires des souches fongiques.

- **Activité antibactérienne des extraits organiques**

L'évaluation de l'effet antibactérien des extraits organiques a été effectuée par la technique des disques comme décrit ci-dessus (1.2.2.2. chapitre 2). Après 18 à 24 h d'incubation à 37°C la lecture des résultats est faite, et toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

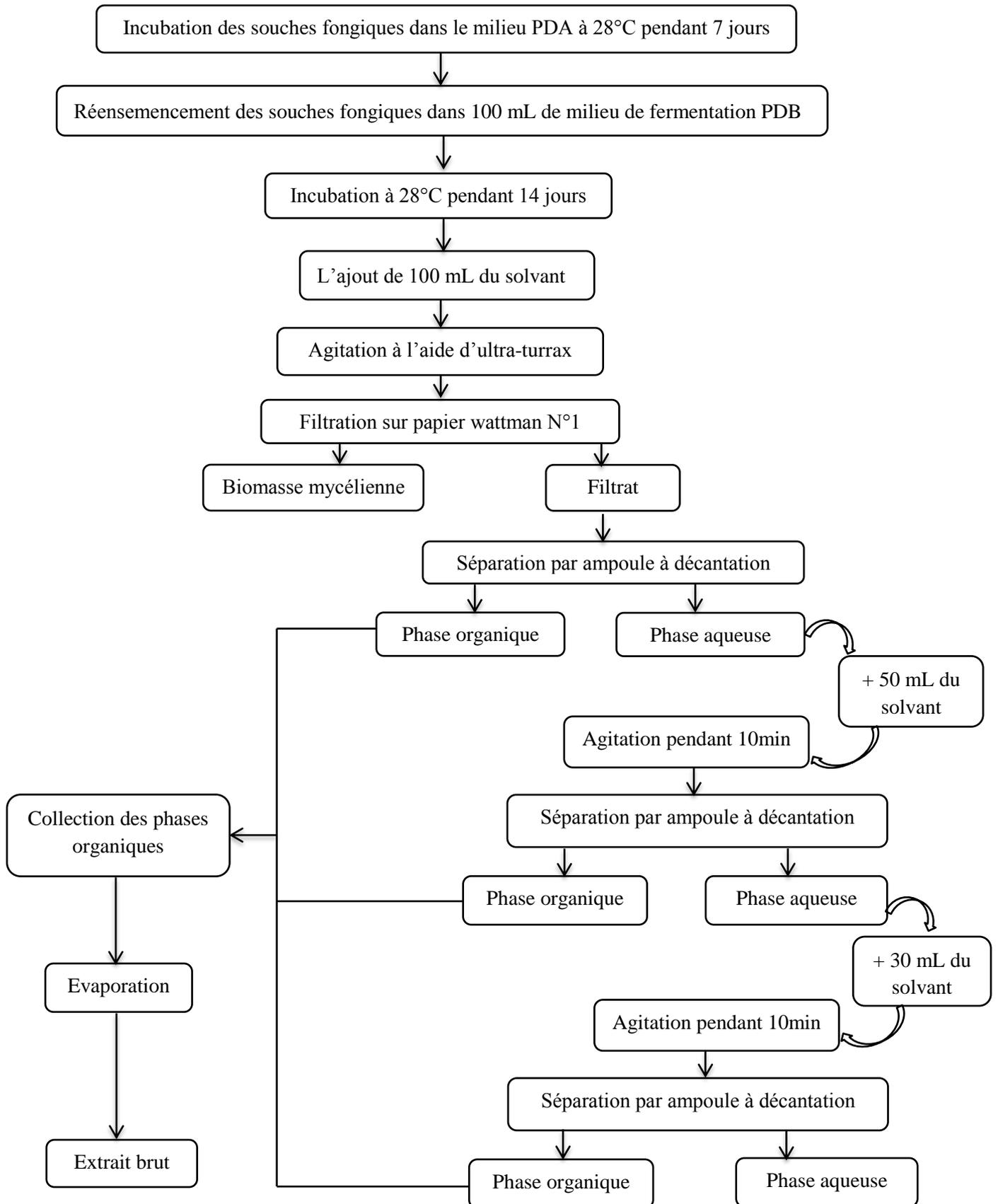


Figure 17 : Procédé d'extraction des métabolites secondaires des souches fongiques.

## **1.2. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne**

Des aliquots de 500 µL des extraits organiques actifs ont été préparés et exposés séparément ; à la lumière et à l'obscurité pendant 3 semaines à température ambiante, et à différents degrés de température (50, 70 et 100°C) pendant 30 min. Ensuite ils ont été testés par la technique des disques et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits sans traitement (Kitouni, 2007 ; Boughachiche, 2012).

## **1.3. Choix du milieu optimum pour la production des substances bioactives**

Quatre milieux de culture liquides de composition différente ; PDB, Sabouraud, Czapek dox additionnée de 2.5 g/L d'extrait de levure et MEB (Malt Extract Broth), préconisés pour la production de métabolites secondaires ont été testés, afin de déterminer le milieu le plus adéquat a la production des molécules bioactives.

Après une fermentation de 14 jours, une extraction à l'aide du chloroforme a été réalisée et le test de l'activité antibactérienne a été effectué par la méthode des disques (Mathan *et al.*, 2013).

**Nb :** Trois répétitions ont été effectuées pour chaque test. Et les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre.

## **1.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits organiques par le système des micro-cultures (Biolog).**

Le Biolog est une technologie prometteuse, elle se base sur des ensembles de plaques de microtitrage à 96 puits. Chaque puits, contenant un milieu de culture de cellule différent, est conçu pour tester une fonction unique (activité enzymatique, activité protéique, effet antagoniste, etc.) ou de phénotype cellulaire (identification biochimique, tolérance aux différentes sources de carbone, de sucre, d'azote ou autre, tolérance aux différents pH ou salinité, etc.) (Ghorri, 2015).

De ce fait, nous avons utilisé cette technologie pour rechercher l'activité antibactérienne des extraits organiques des souches fongiques, en surveillant la réponse des cellules bactériennes dans chaque puits de la plaque par colorimétrie.

La chimie de cette technologie utilise le colorant tétrazolium violet, pour détecter colorimétriquement la respiration des cellules. La réduction, essentiellement irréversible, de

ce colorant a pour résultat la formation d'une couleur pourpre qui s'accumule dans les puits au cours d'une période de quelques heures amplifiant ainsi le signal et intégrant la quantité de la respiration au cours du temps. Cela offre plusieurs avantages majeurs : (1) Le changement de la couleur est facile à suivre, (2) le changement de la couleur est facile à quantifier, (3) le changement de la couleur est très sensible et hautement reproductible. Dans le cadre de cette technologie, l'appareil OmniLog a été développé dans le but de lire et d'enregistrer le changement de couleur dans les puits. Les microplaques sont placées en face d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device), capable de lire 50 microplaques chaque 15 min et fournit des informations quantitatives et cinétiques sur la réponse des cellules dans les puits. Les données sont stockées directement dans des fichiers informatiques et peuvent être récupérées et comparées à d'autres données à tout moment (Bochner *et al.*, 2001 ; Benslama, 2014).

➤ **Le test d'antagonisme sur des microplaques**

À partir d'une concentration mère de 100 mg/mL (100 mg d'extrait dans 1mL du solvant DMSO), des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de concentrations allant de 100 à 1.56 mg/mL (Harrar, 2012).

Les suspensions bactériennes sont préparées dans le bouillon Mueller Hinton à partir des cultures âgées de 18 à 24 h, et sont calibrées à l'aide d'un turbidimètre de Biolog pour atteindre une turbidité finale de 85 % T, ensuite un volume de 220 µL de bouillon Mueller Hinton stérile (additionné de 1 % de « Biolog Redox Dye Mix F » pour les bactéries à Gram+ et de « Biolog Redox Dye Mix A » pour les bactéries à Gram -), un volume de 15 µL d'une dilution de l'extrait et un volume de 15 µL de la suspension bactérienne sont introduits dans chaque puits de la microplaque.

Des contrôles négatifs sont réalisés en utilisant le solvant DMSO. Les microplaques sont placées dans un incubateur-lecteur Omnilog en aérobiose réglé à 37°C et contrôlé automatiquement toutes les 15 min pour les changements de couleur dans les puits. Les lectures sont enregistrées pendant 24 h, et les données sont analysées par le logiciel Omnilog (version 2.3), qui génère des courbes de temps en fonction de la couleur du mix. Chaque concentration a été analysée en triplicata (Al-Bayati, 2008 ; Benslama, 2014 ; Ghorri, 2015).

➤ **Le test d'antagonisme sur boîtes**

Le test d'antagonisme par Biolog a été confirmé par la technique des disques sur gélose Mueller Hinton (1.2.2.2. chapitre 2), et les disques sont imprégnés avec 15 µL de chaque extrait.

### **1.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide**

La détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide des métabolites secondaires est réalisée par deux méthodes ;

- dans la première, un échantillon de 5  $\mu\text{L}$  de chaque puits (ne présentant pas de croissance) va être transféré dans des boîtes de Pétri contenant du milieu de culture (Halla, 2010).
- pour la 2<sup>ème</sup> méthode, on procède à un repiquage des zones d'inhibition formées et ne présentant aucune croissance bactérienne visible à l'œil nu sur milieu de culture solide (Hellal, 2011).

Après une incubation de 18-24 h à 37°C ;

- S'il y a une croissance bactérienne, les métabolites bioactifs ont un effet bactériostatique sur la souche bactérienne testée.
- Au contraire s'il y a une absence de croissance bactérienne, les métabolites bioactifs présentent un effet bactéricide vis-à-vis de cette souche bactérienne.

## **2. Résultats**

### **2.1. Choix du solvant optimum pour l'extraction des molécules bioactives**

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, cinq solvants de polarité différente ont été testés à savoir ; le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le butanol, le méthanol et l'hexane.

Après l'extraction, l'effet antibactérien des extraits organiques obtenus a été testé par la technique des disques. Les résultats ont montré que tous les extraits organiques ont présenté une activité antibactérienne sur, au moins, une des bactéries test, à l'exception de l'extrait d'hexane de la souche *A. quadrilineatus*, et que l'effet le plus considérable a été obtenu par les extraits du chloroforme surtout, suivis par l'acétate d'éthyle, le butanol, le méthanol et l'hexane (Figures 18, 19 et 20).

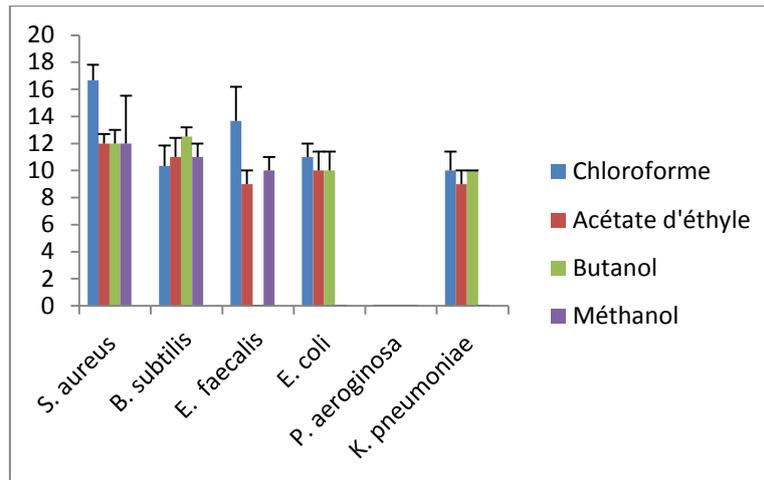
Concernant les extraits chloroformiques, des zones d'inhibition considérables ont été observée avec l'extrait de la souche *A. niveus* contre les bactéries tests ; *B. subtilis* et *S. aureus* avec des diamètres de 25 et 18.33 mm respectivement, et l'extrait de la souche *A. quadrilineatus* contre la bactérie *S. aureus* avec 16.67 mm de diamètre.

Les mêmes résultats ont été observés avec les extraits de l'acétate d'éthyle et du butanol de la souche fongique *A. niveus*, où les moyennes des diamètres des zones d'inhibition sont allées de 15 à 20 mm et ce, contre les mêmes souches bactériennes.

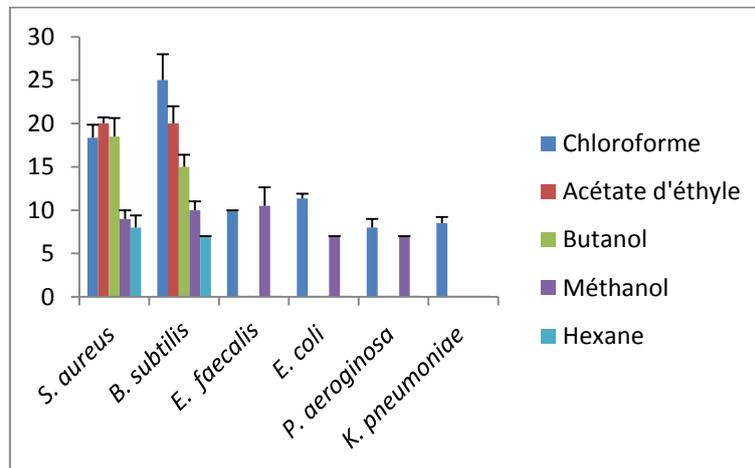
Concernant le méthanol, la zone d'inhibition la plus significative a été observée avec l'extrait d'*A. quadrilineatus* où le diamètre de la zone d'inhibition est atteint 12 mm contre *S. aureus*.

En revanche, l'effet antibactérien le plus faible a été observé par les extraits de l'hexane, et ceci avec toutes les bactéries tests.

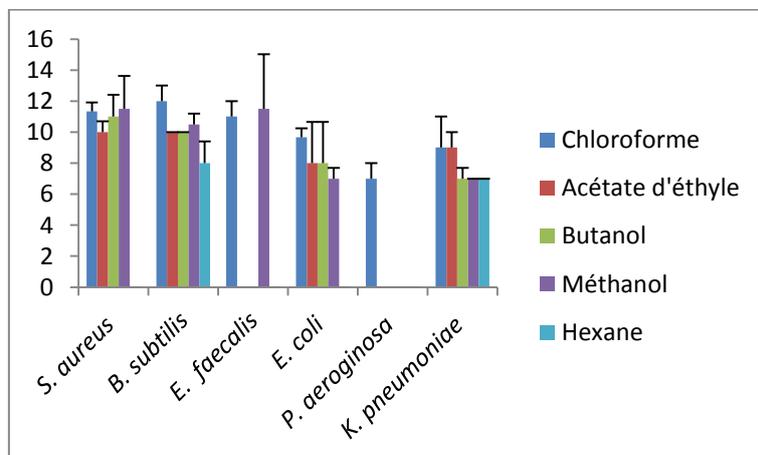
Ces résultats font ressortir le Chloroforme comme le meilleur solvant pour l'extraction des métabolites fongiques à effet antibactérien suivi par l'Acétate d'éthyle.



**Figure 18 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique *A. quadrilineatus*.



**Figure 19 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique *A. niveus*.



**Figure 20 :** Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche fongique *A. wentii*.

2.2. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne

Des aliquots des extraits organiques actifs ont été préparés et exposés séparément ; à la lumière et à l'obscurité pendant 3 semaines à température ambiante, et à différents degrés de température (50, 70 et 100°C) pendant 30 min. Ensuite ils ont été testés par la technique des disques et les résultats de l'activité ont été comparés à celle obtenus avec les extraits sans traitement.

- Pour la souche fongique *A. quadrilineatus*, les molécules antibactériennes de tous les extraits actifs ont gardé leur activité après le traitement, sauf l'extrait d'acétate d'éthyle qui a perdu son activité envers la bactérie *K. pneumoniae*, après l'exposition à la lumière et le traitement thermique à 100°C (Figures 21, 22, 23, et 24).

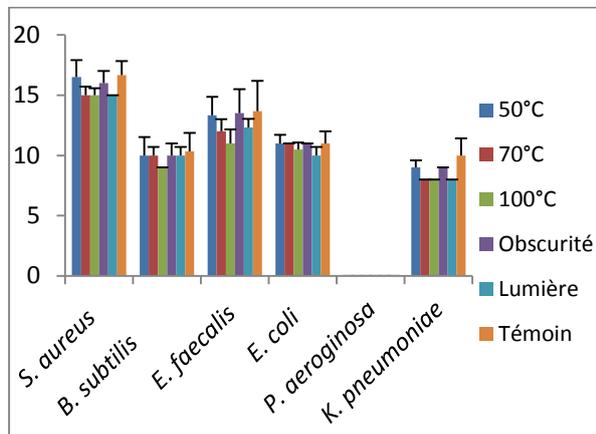


Figure 21: Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. quadrilineatus* après le traitement.

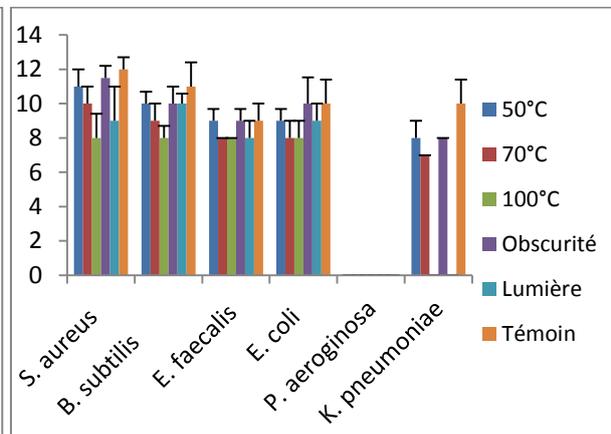


Figure 22: Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche *A. quadrilineatus* après le traitement.

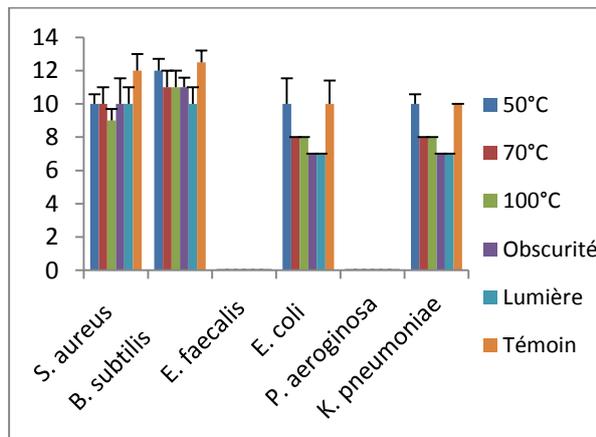


Figure 23: Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche *A. quadrilineatus* après le traitement.

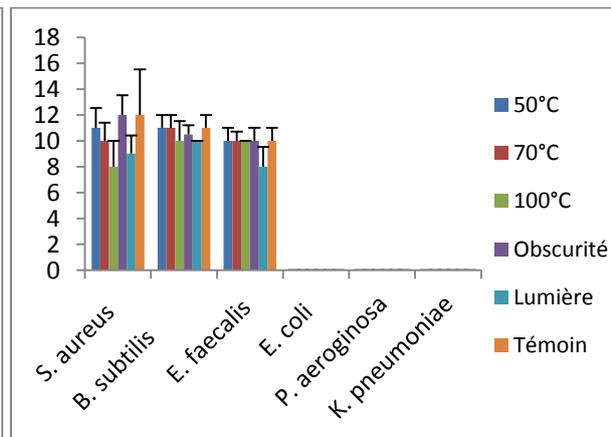
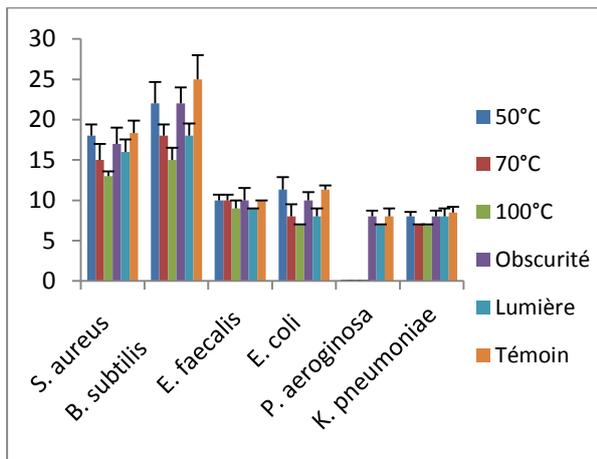


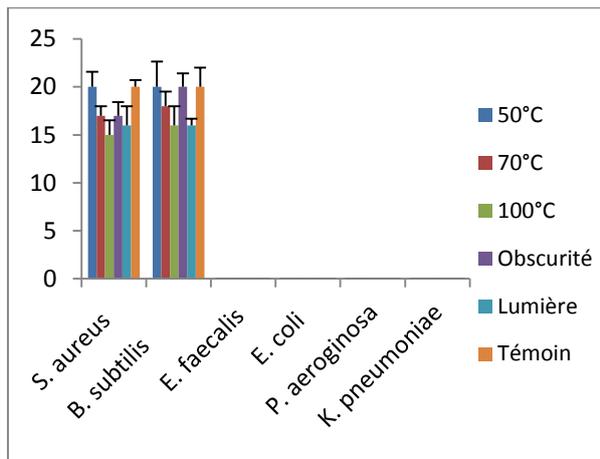
Figure 24: Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche *A. quadrilineatus* après le traitement.

- Concernant la souche fongique *A. niveus*, tous les extraits organiques ayant une activité antibactérienne ont conservé leur activité après le traitement, à l'exception de l'extrait chloroformique qui a perdu son activité envers la bactérie *P. aeruginosa* et l'extrait méthanolique envers les deux bactéries *E. coli* et *P. aeruginosa*.

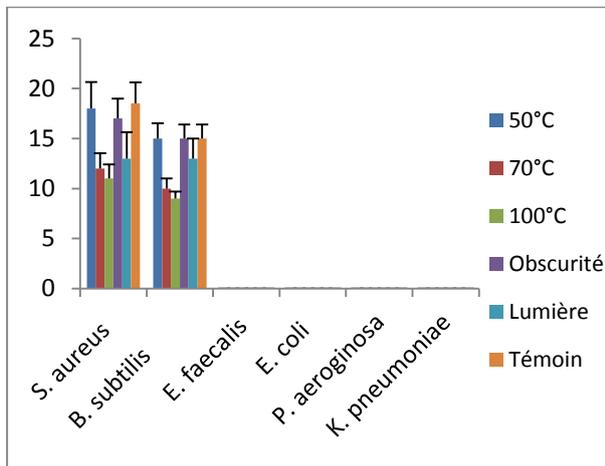
En effet, la majorité des valeurs de diamètres d'inhibition, sont voisines et ceci pour toutes les bactéries tests et presque équivalentes à celles des extraits sans traitement (Figures 25, 26, 27, 28, et 29).



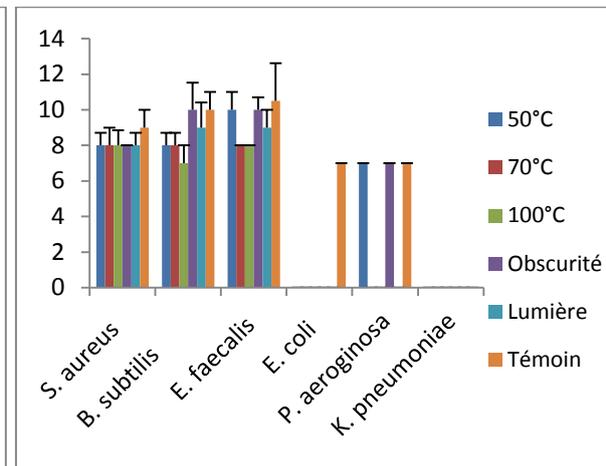
**Figure 25:** Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. niveus* après le traitement.



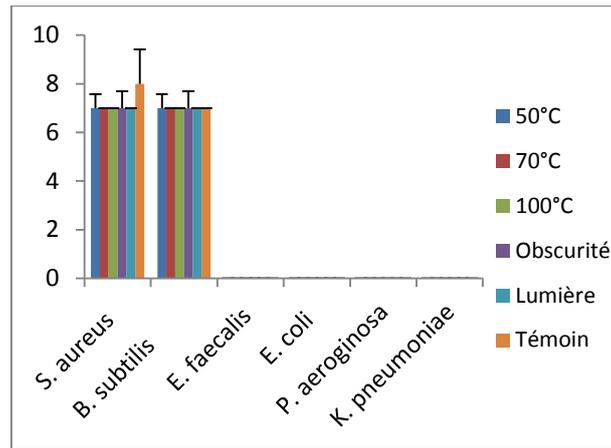
**Figure 26:** Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche *A. niveus* après le traitement.



**Figure 27:** Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche *A. niveus* après le traitement.



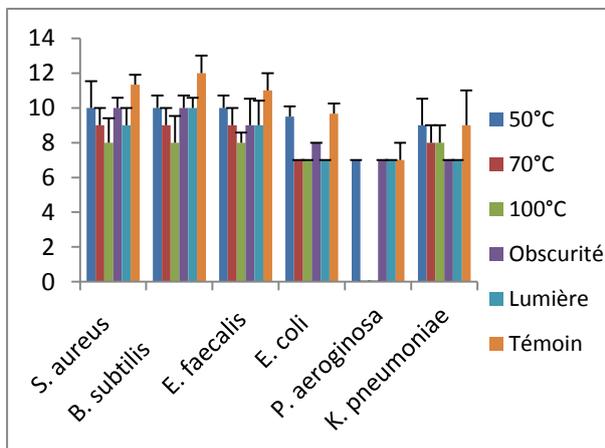
**Figure 28:** Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche *A. niveus* après le traitement.



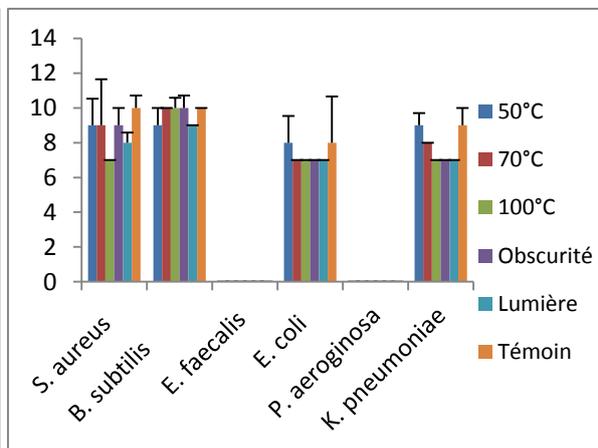
**Figure 29 :** Effet antibactérien de l'extrait d'hexane de la souche *A. niveus* après le traitement.

- Par ailleurs, tous les extraits organiques de la souche fongique *A. wentii* ont préservé leur activité après le traitement, sauf l'extrait chloroformique qui a perdu son activité contre la bactérie *P. aeruginosa*, l'extrait butanolique contre la bactérie *E. coli* et l'extrait méthanolique contre les deux bactéries *E. coli* et *K. pneumoniae*.

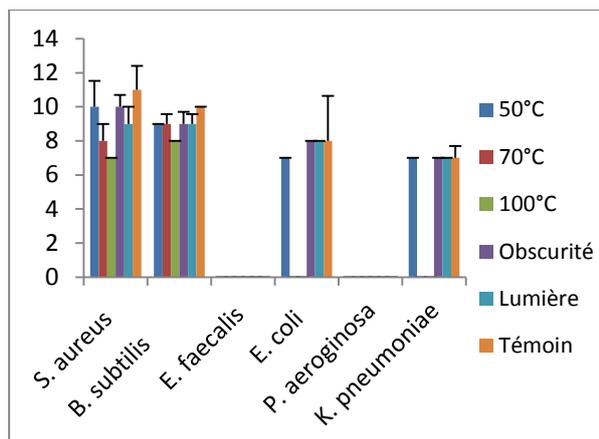
La plupart des extraits actifs ont présenté une résistance aux différents traitements, où les diamètres des zones d'inhibition enregistrés sont très proches par rapport à celles obtenus par les extraits témoins (sans traitement) (Figures 30, 31, 32, 33, et 34).



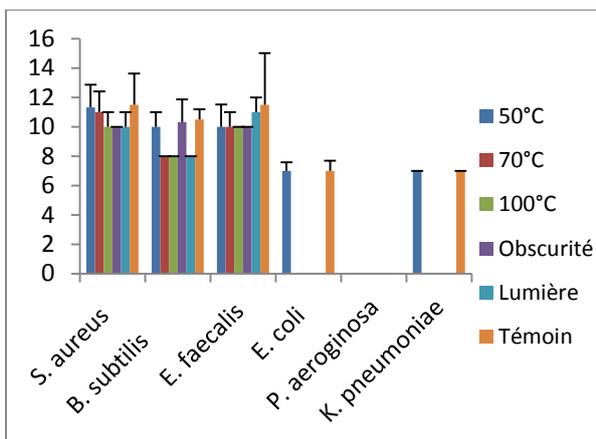
**Figure 30:** Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. wentii* après le traitement.



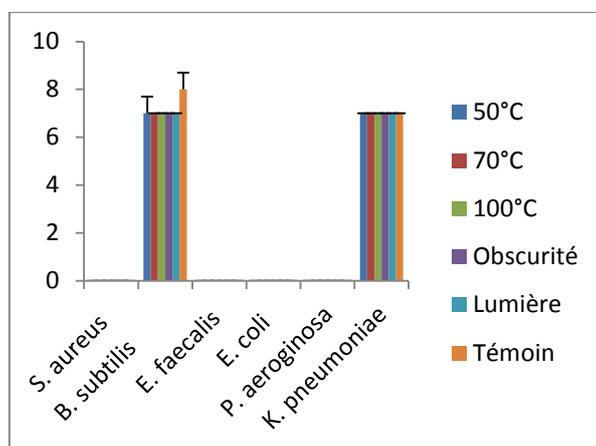
**Figure 31:** Effet antibactérien de l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche *A. wentii* après le traitement.



**Figure 32** : Effet antibactérien de l'extrait butanolique de la souche *A. wentii* après le traitement.



**Figure 33** : Effet antibactérien de l'extrait méthanolique de la souche *A. wentii* après le traitement.



**Figure 34** : Effet antibactérien de l'extrait d'hexane de la souche *A. wentii* après le traitement.

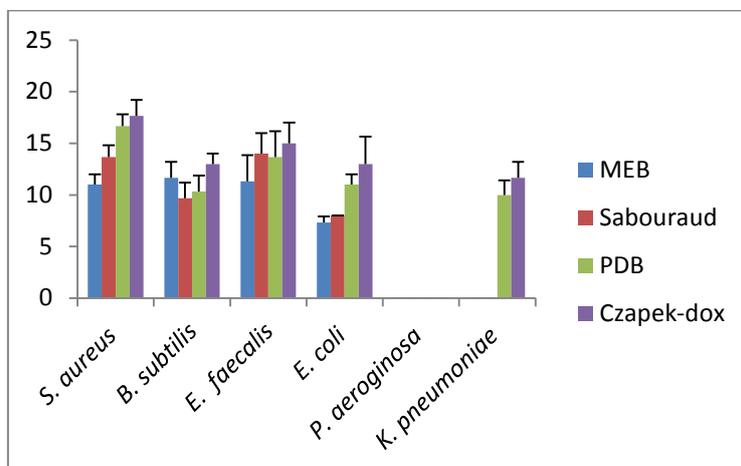
### 2.3. Choix du milieu optimum pour la production des substances bioactives

Quatre milieux de cultures liquides : PDB, Sabouraud, Czapek-dox additionné d'extrait de levure et MEB, préconisés pour la production de métabolites secondaires, ont été utilisés afin de déterminer le milieu le plus adéquat à la production des molécules bioactives. Le test de l'activité antibactérienne a été réalisé par la technique des disques.

Les résultats ont montré que pour chaque souche fongique, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et d'une bactérie test à une autre.

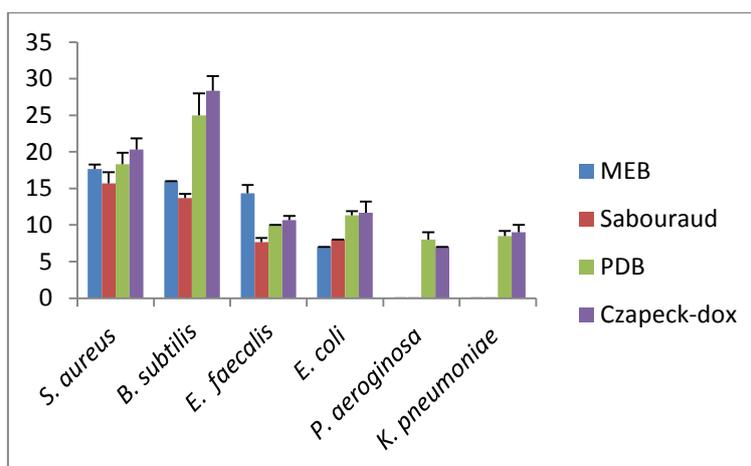
Pour la souche fongique *A. quadrilineatus*, les résultats représentés dans la figure 35 montrent que les zones d'inhibition les plus importantes sont obtenues avec les disques imprégnés des molécules provenant du milieu Czapek-dox, avec des diamètres de 17.67 mm

contre la bactérie *S. aureus* et de 15 mm contre la bactérie *E. faecalis*, suivi du milieu PDB avec des diamètres de 16.67 et 13.67 mm contre les mêmes bactéries *S. aureus* et *E. faecalis* respectivement.



**Figure 35 :** Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique *A. quadrilineatus*.

Concernant la souche fongique *A. niveus*, les résultats présentés dans la figure 36, font ressortir le milieu Czapek-dox comme étant le milieu le plus convenable pour la production des métabolites antibactériens, dont les zones d'inhibition les plus considérables sont observés contre la bactérie *B. subtilis* avec un diamètre de 28.33 mm et la bactérie *S. aureus* avec un diamètre de 20.33 mm, suivi du milieu PDB et du milieu MEB, dont les diamètres les plus importants sont observés avec les mêmes souches bactériennes.

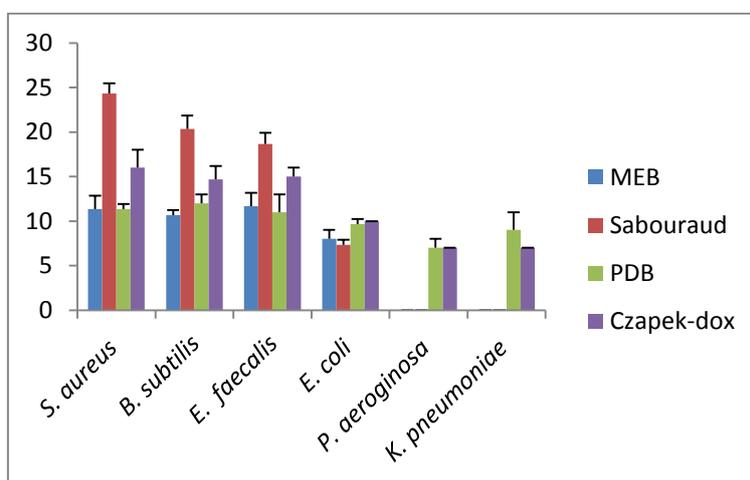


**Figure 36 :** Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique *A. niveus*.

D'un point de vue quantitatif et qualitatif, le milieu Czapek-dox semble être le plus adéquat pour la production des métabolites secondaires à effet antibactérien pour les deux souches fongiques *A. quadrilineatus* et *A. niveus*.

Cependant, l'extrait de la souche fongique *A. wentii*, provenant du milieu Sabouraud a réagi différemment par rapport aux autres milieux, donnant des résultats plus distincts. En effet, des zones d'inhibition considérables de 24.33, 20.33 et 18.67 mm de diamètre ont été observés avec les souches bactériennes *S. aureus*, *B. subtilis* et *E. faecalis* respectivement. Suivi du milieu Czapek-dox avec des zones de 16, 14.67 et 15 mm de diamètre et ceci avec les mêmes bactéries tests respectivement (Figure 37).

De ce fait, le meilleur milieu pour la production des métabolites à effet antibactérien pour la souche *A. wentii* est le milieu Sabouraud.



**Figure 37** : Effet de différents milieux de culture sur l'activité antibactérienne de la souche fongique *A. wentii*.

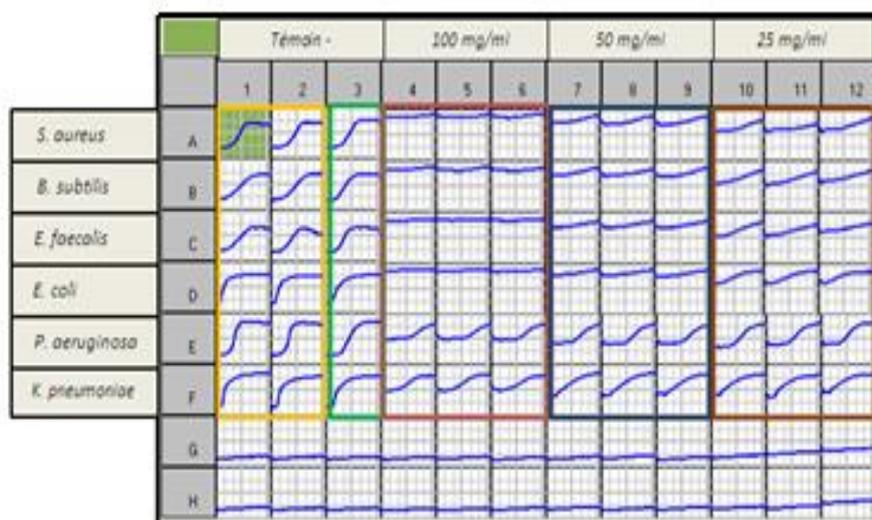
#### 2.4. Etude de l'activité antibactérienne des extraits organiques par le système des micro-cultures (Biolog).

L'étude de l'effet antibactérien par le système des micro-cultures Biolog a été effectuée pour une gamme de concentrations (allant de 100 à 1.56 mg/mL) des extraits organiques.

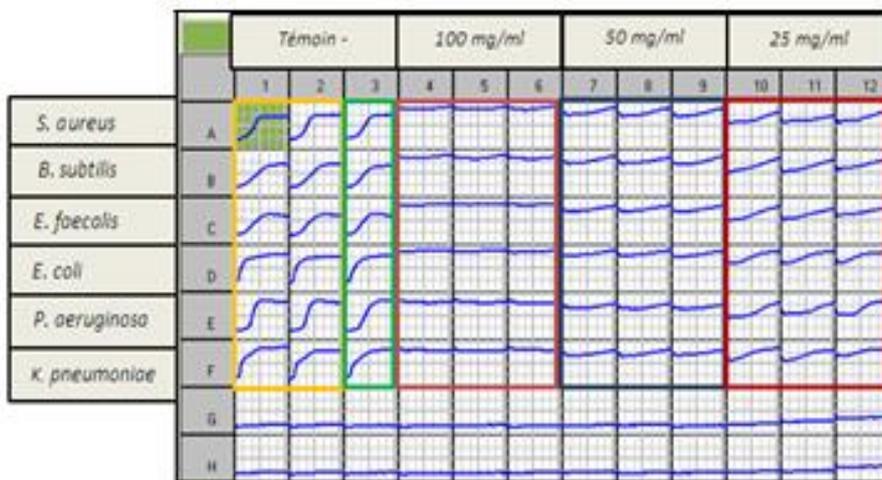
Le suivie de la réaction, réalisé à l'aide du système Omnilog, interprète les résultats sous forme de cinétique de développement pour chaque souche bactérienne dans chaque puits. Les résultats obtenus pour les extraits des trois souches fongiques sont représentés dans les figures ci-dessous.

Cette technique a révélé que les extraits des trois souches fongiques ont présenté une activité remarquable avec les différentes concentrations et ce, contre toutes les souches bactériennes testées.

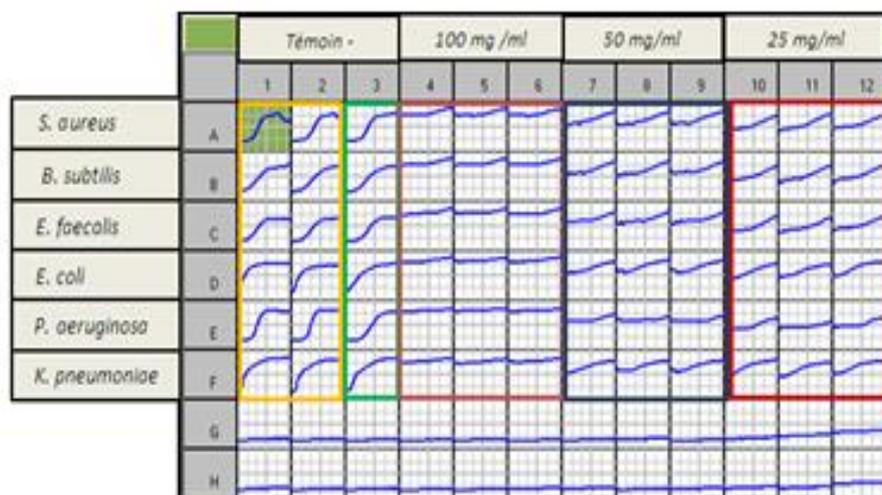
En effet les résultats représentés dans les figures ; 38, 39 et 40, montrent que les extraits chloroformiques solubilisés dans le DMSO avec les concentrations 100, 50, et 25 mg/mL ont pu inhiber presque le développement total des cellules bactériennes testées où les cinétiques de croissance des souches bactériennes étaient nulles (aucun développement après leur ensemencement avec les extraits chloroformiques), sauf l'extrait de la souche *A. quadrilineatus* qui a inhibé un peu le développement des deux bactéries tests ; *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*. Contrairement aux témoins (bactéries) et au contrôle négatif (bactéries + DMSO) qui ont présenté un bon développement dans les puits.



**Figure 38 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. quadrilineatus* avec différentes concentrations, de **1** à **2** la bactérie test (**2** répétition), **3** la bactérie avec le DMSO, de **4** à **12** les différentes concentrations (de 100 à 25 mg/mL), de **A** à **F** les différentes souches bactériennes.

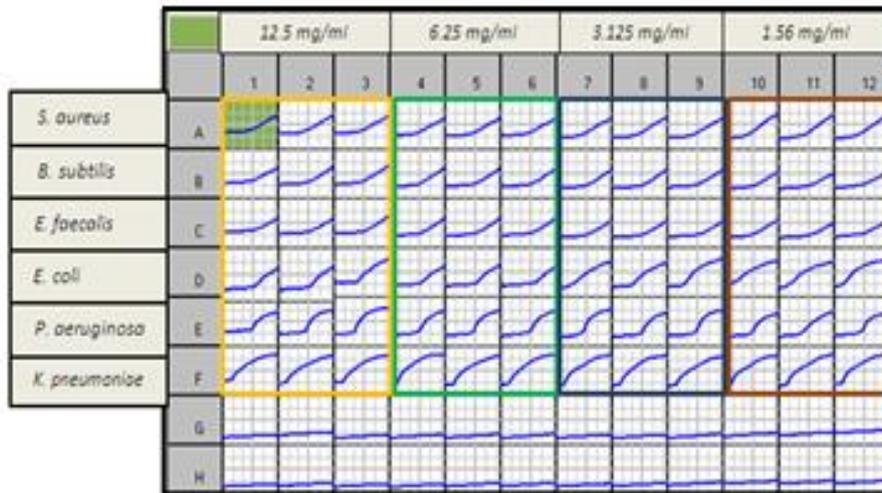


**Figure 39 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. niveus* avec différentes concentrations, de 1 à 2 la bactérie test (2 répétition), 3 la bactérie avec le DMSO, de 4 à 12 les différentes concentrations (de 100 à 25mg/mL), de A à F les différentes souches bactériennes.

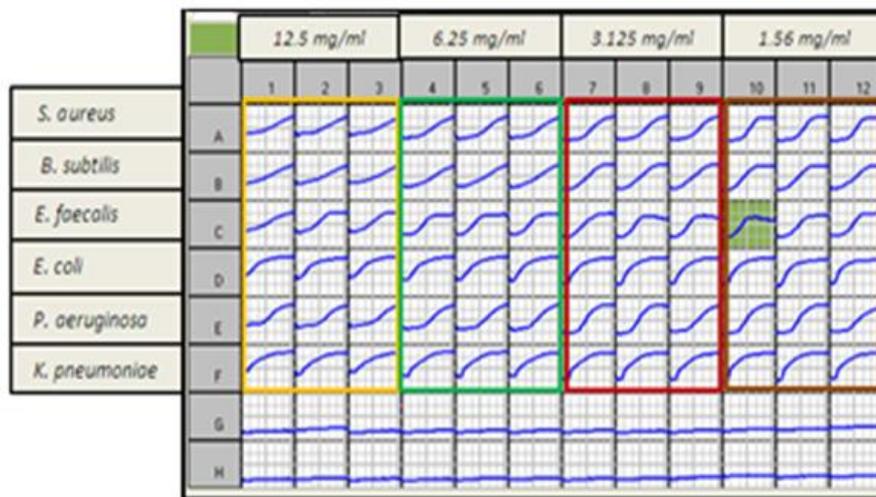


**Figure 40 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. wentii* avec différentes concentrations, de 1 à 2 la bactérie test (2 répétition), 3 la bactérie avec le DMSO, de 4 à 12 les différentes concentrations (de 100 à 25mg/mL), de A à F les différentes souches bactériennes.

Par ailleurs les résultats représentés dans les figures ; 41, 42 et 43 correspondant aux concentrations des extraits allaient de 12.5 à 1.56 mg/mL montrent une diminution de l'effet antibactérien au cours de la baisse des concentrations des extraits et cela avec toutes les bactéries tests.



**Figure 41 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. quadrilineatus*, de 1 à 12 les différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/mL), de A à F les différentes souches bactériennes.



**Figure 42 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. niveus*, de 1 à 12 les différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/mL), de A à F les différentes souches bactériennes.



**Figure 43 :** Cinétique de développement des cellules bactérienne. Effet antibactérien de l'extrait chloroformique de la souche *A. wentii*, de 1 à 12 les différentes concentrations (de 12.5 à 1.56mg/mL), de A à F les différentes souches bactériennes.

- **Test par la technique des disques**

Les résultats du test d'antagonisme effectué par les disques imbibés avec les extraits fongiques, ont confirmé les résultats obtenus par le test de Biolog. Les effets inhibiteurs de la croissance des germes sont manifestés par les trois extraits chloroformiques où les diamètres des zones d'inhibition sont en fonction des doses déposées sur les disques (Tableaux 15,16 et 17).

Pour toutes les souches bactériennes, les diamètres des zones d'inhibition les plus importants sont observés avec les concentrations 100, 50, et 25 mg/mL. Cependant, les trois extraits ont préservé leur effet antibactérien même avec les faibles concentrations (de 12.5 à 1.56 mg/mL), et cela envers la majorité des bactéries tests.

En ce qui concerne les germes tests, les résultats de tous les tests ont révélé qu'une différence de sensibilité des espèces bactériennes a été enregistrée pour les extraits des trois souches fongiques étudiées. Cette différence suggère la sensibilité des différentes bactéries aux divers composants actifs étudiés.

Par ailleurs, les bactéries à Gram positif apparaissent les plus sensibles aux molécules bioactives en comparaison avec les bactéries à Gram négatif.

### *Chapitre III : Etude préliminaire de l'activité antibactérienne*

**Tableau 15 :** Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique *A. quadrilineatus* sur les bactéries tests. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 6$ mm

	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12.5mg/mL	6.25mg/mL	3.125mg/mL	1.56mg/mL
<i>S. aureus</i>	17.00±1.41	14.00±0.00	12.50±0.71	10.50±0.71	9.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00
<i>B. subtilis</i>	14.00±1.41	12.50±0.71	11.33±0.58	11.00±0.00	10.00±0.00	9.50±0.71	8.00±0.00
<i>E. faecalis</i>	14.50±2.12	12.50±0.71	12.00±0.00	11.50±0.71	11.00±0.00	10.00±0.00	9.33±0.58
<i>E. coli</i>	15.50±0.71	15.00±0.00	13.50±0.71	13.00±1.41	10.00±0.00	9.33±0.58	8.50±0.71
<i>P. aeruginosa</i>	9.50±0.71	8.33±0.58	7.00±0.00	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	10.00±1.41	9.50±0.71	9.33±0.58	8.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	7.00±0.00

**Tableau 16 :** Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique *A. niveus* sur les bactéries tests. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 6$  mm.

	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12.5mg/mL	6.25mg/mL	3.125mg/mL	1.56mg/mL
<i>S. aureus</i>	19.00±1.41	14.00±1.41	12.50±0.71	8.50±0.71	8.00±0.00	7.50±0.71	7.00±0.00
<i>B. subtilis</i>	26.50±2.12	17.50±0.71	14.00±1.41	10.50±0.71	9.50±0.71	8.00±0.00	7.50±0.71
<i>E. faecalis</i>	16.50±0.71	13.50±0.71	12.00±0.00	11.00±0.00	9.33±0.58	9.00±0.00	8.00±0.00
<i>E. coli</i>	13.00±1.41	12.50±0.71	11.00±0.00	10.00±0.00	9.00±0.00	8.50±0.71	7.00±0.00
<i>P. aeruginosa</i>	10.00±0.00	9.50±0.71	8.00±0.00	7.00±0.00	7.00±0.00	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	11.33±0.58	10.00±0.00	9.50±0.71	9.00±0.00	7.50±0.71	7.00±0.00	7.00±0.00

**Tableau 17 :** Effet de différentes concentrations de l'extrait chloroformique de la souche fongique *A. wentii* sur les bactéries tests. (-) : Diamètre de la zone d'inhibition  $\leq 6$  mm.

	100mg/mL	50mg/mL	25mg/mL	12.5mg/mL	6.25mg/mL	3.125mg/mL	1.56mg/mL
<i>S. aureus</i>	14.00±1.41	12.50±0.71	12.33±0.58	11.00±0.00	11.00±0.00	9.50±0.71	7.50±0.71
<i>B. subtilis</i>	14.50±2.12	13.00±1.41	11.50±0.71	11.00±1.41	10.00±0.00	8.50±0.71	7.00±0.00
<i>E. faecalis</i>	16.50±0.71	14.00±0.00	13.33±0.58	11.50±0.71	8.00±0.00	7.00±0.00	7.00±0.00
<i>E. coli</i>	13.00±1.41	11.50±0.71	11.00±0.00	11.00±0.00	10.00±0.00	8.33±0.58	8.00±0.00
<i>P. aeruginosa</i>	10.00±0.00	9.33±0.58	8.00±1.41	8.00±0.00	7.00±0.00	-	-
<i>K. pneumoniae</i>	13.00±1.41	10.00±0.00	9.33±0.58	9.00±0.00	9.00±0.00	8.00±0.00	7.50±0.71

## **2.5. Détermination de l'effet bactériostatique ou bactéricide**

Les trois extraits fongiques, avec différentes concentrations, ont été évalués afin de déterminer l'effet bactériostatique ou bactéricide de leurs métabolites bioactifs. Chaque prélèvement est déposé en strie sur milieu TSA. Après incubation à 37°C pendant 24 h, les résultats ont montré que les six souches bactériennes ont pu croître sur leur milieu de culture. Ce qui signifie que les substances bioactives des trois souches fongiques possèdent un effet bactériostatique et non bactéricide, donc ils inhibent juste la multiplication des bactéries sans les tuer, et cela avec toutes les concentrations testées (de 1.56 mg/mL jusqu'à 100 mg/mL).

### **3. Discussion**

Dans le but d'obtenir des informations sur les propriétés des molécules bioactives des souches fongiques sélectionnées, une fermentation sur milieu liquide a été effectuée.

Le choix des solvants d'extraction utilisés conditionnera le type de métabolites obtenus, en effet, l'utilisation des solvants de polarité différente permettra d'accéder à une plus large gamme de métabolites (Kerzaon, 2009). Pour cela, et afin d'optimiser les conditions d'extraction des molécules bioactives, cinq solvants de polarité distincte ont été testés. Les résultats montrent que la majorité des extraits organiques présentent une activité antibactérienne sur, au moins, une des bactéries test.

En effet, l'apparition de l'activité antibactérienne dans un solvant polaire (méthanol et butanol), un solvant de polarité intermédiaire (chloroforme et acétate d'éthyle) et un autre apolaire (hexane), suppose qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien une ou plusieurs molécules solubles dans des solvants variés. Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon Guernet et Hamon (1981), les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères polaires et apolaires entraînant une affinité pour des solvants très divers.

Les résultats de l'analyse des différents diamètres obtenus, font ressortir le chloroforme comme meilleur solvant pour l'extraction des métabolites fongiques à effet antibactérien. Ce résultat s'accorde avec ceux de Kitouni (2007) et Loucif (2011), qui ont trouvé que le chloroforme est parmi les meilleurs solvants utilisés pour l'extraction des molécules bioactives. En outre ce solvant est souvent utilisé pour l'extraction des métabolites secondaires (Abdelaziz, 2006 ; Praveena et Padmini, 2011).

L'étude de la stabilité des molécules bioactives révèle que la majorité des extraits actifs gardent leur activité après le traitement thermique (jusqu'à 100°C) et l'exposition à la lumière pendant trois semaines. Qui se traduit par la présence de molécules thermostables dans les extraits bruts des souches étudiées. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par Singh *et al.* (2010), qui ont travaillé sur la thermostabilité d'un métabolite d'*A. terricola*, et ont trouvé que ce dernier n'a pas été affecté lors de l'incubation à 70 °C pendant 2,5 h. De même Gasparetti *et al.* (2010), qui ont travaillé sur un métabolite d'*A. Oryzae*, ont montré que ce dernier possède une bonne thermostabilité jusqu'à 60 °C.

L'ensemble des facteurs nutritionnels et environnementaux qui influent sur la production des antibiotiques permettent de mettre en évidence certains traits majeurs, avec cependant de nombreuses exceptions (Iwai et Omura, 1982). En effet le nombre de souches productrices est trop diversifié et les voies de biosynthèse trop multiples pour pouvoir dégager des règles uniques. D'une façon générale, les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance et varient avec la souche utilisée et le métabolite secondaire synthétisé. Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et pendant la phase de production des métabolites secondaires, des milieux offrant un bon compromis ont dû être développés. Dans cette optique nous avons testé les milieux ; PDB, Sabouraud, Czapek dox additionné d'extrait de levure et MEB, pour choisir parmi ces derniers ceux qui donnent une meilleure production des antibactériens par les trois souches fongiques.

Les résultats montrent que l'activité antibactérienne diffère d'une souche fongique à l'autre et d'autre part que pour la même souche fongique et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une souche fongique peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (Boughachiche *et al.*, 2005).

Plusieurs travaux montrent que la nature et la concentration des composants du milieu de culture (en source de carbone, d'azote, et source minérale) influence énormément la capacité de production des métabolites secondaires chez les microorganismes (Aharonowitz et Demain, 1978 ; Omura et Tanaka, 1986 ; Cheng *et al.*, 1995 ; Sanchez et Demain, 2002 ; Gesheva *et al.*, 2005). Ainsi, selon Elias *et al.* (2006), de très petits changements dans les conditions de culture peuvent engendrer des modifications du profil métabolique d'une souche. En outre, Boussaber *et al.* (2012), ont montré que l'activité antibactérienne des souches d'actinomycète dépend en grande partie des bactéries tests et de la composition des milieux de culture.

Pour les deux souches fongiques *A. quadrilineatus* et *A. niveus* les zones d'inhibition les plus importantes sont obtenues avec les disques imprégnés des molécules provenant du milieu Czapek-dox. En effet, le milieu Czapek-dox liquide additionné d'extrait de levure a été choisi

comme un milieu spécifique pour une production optimale des métabolites secondaires (Pamel *et al.*, 2010). En outre ce milieu renferme l'extrait de levure et le nitrate de sodium qui représentent de bonnes sources d'azote adéquates pour la production des antibiotiques, il renferme également du saccharose comme source de carbone ainsi que des sels minéraux (Pandey *et al.*, 2005).

Cependant, l'extrait de la souche fongique *A. wentii*, provenant du milieu Sabouraud réagit différemment par rapport aux autres milieux, donnant des résultats plus distincts. Le meilleur rendement du milieu Sabouraud par rapport aux autres milieux peut être expliqué par la présence de la peptone qui est une source difficilement métabolisable et donc favorise la production d'antibiotiques (Voelker et Altaba, 2001).

L'étude de l'effet antibactérien des extraits organiques par le système des micro-cultures Biolog révèle que les extraits des trois souches fongiques présentent une activité remarquable avec différentes concentrations et ce, contre toutes les souches bactériennes testées.

En ce qui concerne les germes tests, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des trois souches fongiques en comparaison avec les bactéries à Gram négatif, ceci a été également constaté par Hasavada *et al.* (2006), Atta *et al.* (2009) et Prabavathy et Nachiyar (2012).

Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de microorganismes diffèrent morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composants structurels lipopolysaccharides, ceci rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles seront plus sensibles car elles ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure qui n'est pas une barrière de perméabilité effective (Kumara *et al.*, 2010).

## **Chapitre IV : Etude préliminaire des molécules bioactives**

Pour analyser les métabolites bioactifs, habituellement présents à l'état de traces dans les extraits bruts, il existe toute une panoplie de méthodes fondées essentiellement sur le principe de la séparation chromatographique des molécules puis de leur détection par spectrométrie ou fluorimétrie (Lamrani, 2009).

Les travaux présentés dans ce chapitre concernent l'utilisation des méthodes chromatographiques séparées et couplées avec des techniques de détection, dans le but de purifier et analyser les molécules bioactives des extraits organiques.

### **1. Matériel et méthodes**

#### **1.1. Préparation des échantillons**

La production des métabolites secondaires des trois souches fongiques a été faite en utilisant le milieu Czapek dox liquide additionné de 2.5 g/L d'extrait de levure pour les deux souches *A. quadrilineatus* et *A. niveus*, et le milieu Sabouraud liquide pour la souche *A. wentii*. Après 14 jours d'incubation à 28°C, l'extraction des molécules bioactives a été effectuée comme décrit précédemment (chapitre III). Cependant après l'évaporation, l'extrait est remis en suspension dans 500 µL de chloroforme et placé dans un flacon en verre parafilmé pour des analyses ultérieurs (Gengan *et al.*, 1999 ; Kosalec *et al.*, 2005).

#### **1.2. Fractionnement sur colonne**

Dans la présente étude nous avons utilisé une chromatographie sur colonne d'adsorption pour une première séparation des métabolites secondaires. Ce genre de chromatographie consiste à séparer les différentes molécules selon leurs polarités (Smaoui, 2010).

La colonne utilisée mesurait 22 X 400 mm préparée selon le procédé suivant : le tube est muni à l'extrémité inférieure d'une grille et de coton, ensuite rempli à deux tiers par le chloroforme puis par 5 g de sulfate de sodium (anhydre granulé). Après avoir vérifié que la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium est inondée, une quantité de 10 g de gel de silice 60 est rajoutée en remuant avec précaution après chaque addition pour éliminer les bulles d'air. La préparation est laissée reposer durant 1 h, ensuite 15 g de sulfate de sodium sont rajoutés avec précaution formant ainsi la couche supérieure de la colonne. L'excès du chloroforme est éliminé par la voie de tube inférieur placé pour cet objectif.

50 mL d'extrait chloroformique sont additionnés à 100 mL d'hexane, le mélange est ensuite, transvasé quantitativement dans la colonne en éliminant le liquide écoulé. Après, un volume de 100 mL d'éther diéthylique est rajouté et laissé à nouveau descendre jusqu'à la surface supérieure de la couche de sulfate de sodium. Ensuite, l'élution a été effectuée par 150 mL de mélange (chloroforme – méthanol : 97/3 V/V) (Zinedine, 2004 ; Abdelaziz, 2006).

### **1.3. Chromatographie sur couche mince**

Après le fractionnement sur colonne, les molécules bioactives ont été encore séparées en utilisant la technique chromatographique sur couche mince (CCM) qui repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant (Smaoui, 2010). Dans notre cas, cette chromatographie est réalisée sur des plaques de gel de silice << 60F254 >> sur support d'aluminium, prêtes à l'emploi. Un volume près de 200 µL de chaque fraction est déposé progressivement, à l'aide de capillaire sous forme de spots à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque avec séchage entre chaque application. L'atmosphère de la cuve est saturée préalablement par une phase mobile constituée de trois solvants (Toluène/ Acétate d'éthyle/ Acide formique ; 50/40/10) (Siddiqui, 2004 ; Awad, 2005).

Après la migration, les plaques sont séchées puis visualisées sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et 365 nm) (Bejaoui, 2005).

Généralement, pour aboutir à des biomolécules pures, il est indispensable d'utiliser toutes ces différentes techniques chromatographiques, et à chaque étape il faut tester l'activité biologique des fractions. Pour cela, les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hintonensemencée avec la bactérie test la plus sensible pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Après, les boîtes sont placées à 4°C, pendant 4 h, pour permettre la diffusion des substances bioactives, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 h. (Boughachich, 2012).

### **1.4. Analyse par (LC/MS) et (LC/MS/MS)**

Pour évaluer qualitativement les molécules présentes dans la fraction bioactive nous avons combiné la technique chromatographique de séparation UPLC (Ultra Performance Liquid

Chromatography) à un système de détection MS (spectrométrie de masse) et MS/MS (spectrométrie de masse en tandem), car non seulement c'est un mode de détection souvent rencontré pour l'analyse des métabolites secondaires mais surtout il fournit des informations structurales sur les analyses étudiées.

#### **1.4.1. Préparation de l'échantillon**

La fraction active est repérée, grattée, suspendue dans 3 mL du chloroforme et soumise dans un mélangeur rotatif pendant 1 h. Après une centrifugation à 15000g pendant 5 min, le surnageant a été récupéré et évaporé à sec à l'aide d'une rampe à vide. Ensuite la fraction a été resuspendus dans 500 µL de mélange eau /méthanol (97.5 % ; 2.5 %), puis filtrée sur une membrane millipore de 0.45 µm pour qu'on puisse l'analyser.

#### **1.4.2. Chromatographie Liquide Ultra Performance**

L'UPLC c'est une technique instrumentale basée sur les mêmes principes que ceux de la chromatographie classique sur colonne. Elle permet de séparer les mélanges liquides en fonction de leur différence de solubilité entre la phase mobile et la phase stationnaire.

Le système chromatographique utilisé se compose d'un système de pompe binaire afin de générer un gradient, deux colonnes (une colonne de pré-concentration et une colonne analytique) et d'un injecteur. Les différents éléments sont reliés à un ordinateur permet de piloter automatiquement les différents composants du système chromatographique.

4 µL d'extrait filtré a été injecté automatiquement sur l'appareil ; classe Acquity M-Class UPLC (Waters, Milford, MA, USA) connecté à un Q Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne). L'échantillon a été chargé sur une colonne piège (Symmetry C18 5 µm, 180 µm x 20 mm, Waters) dans 100 % du solvant A (Eau avec 0,1 % d'acide formique) pendant 3 min et ensuite séparé sur la colonne d'analyse (HSS T3 C18 1,8 µm. 75 µm x 250 mm, Waters) avec un débit de 600 nL / min.

Un système de gradient de solvant a été appliqué afin de séparer les métabolites secondaires de la fraction utilisée. La phase mobile est composée de deux solvants : le solvant A (comme décrit précédemment) et le solvant B (Acétonitrile avec 0,1 % d'acide formique). Le tableau 18 représente le programme du gradient linéaire utilisé. La durée totale était de 180 min.

**Tableau 18:** Programme de gradient utilisé pour l'analyse et la séparation du métabolite.

Temps (min)/Solvant	A	B
0 min	98 %	2 %
5 min	93 %	7 %
135 min	70 %	30 %
150 min	60 %	40 %
154 min	10 %	90 %
162 min	98 %	2 %
180 min	98 %	2 %

### 1.4.3. Spectrométrie de masse

#### 1.4.3.1. Principe

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse structurale, elle présente l'originalité de s'adresser à des substances analysées en phase gazeuse et non en phase liquide condensée. Toutes les techniques de spectrométrie de masse font appel non aux espèces moléculaires en tant que telles mais aux entités ioniques qui en proviennent. Les procédés de spectrométrie de masse reposent en effet sur les déplacements de particules chargées dans un champ électrique et/ou magnétique. Cela nécessite donc, pour que l'analyse d'une substance organique soit réalisable, une étape préalable d'ionisation de l'échantillon (Smaoui, 2010). Fondamentalement, un spectromètre de masse est composé des éléments suivants :

\* **Source d'ionisation** : Elle permet de vaporiser et d'ioniser la molécule à étudier en la transformant en ion par perte ou gain de charge. Il existe plusieurs types de sources. Dans ce présent travail, nous avons utilisé l'ionisation par électrospray (électronébulisation). Ce type d'ionisation douce, permettant une faible fragmentation de l'ion moléculaire et donnant ainsi accès à la masse moléculaire des analytes.

L'électrospray (ESI) est produit par application à pression atmosphérique d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel de 2 à 6 kV entre ce capillaire et la contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de

leur taille jusqu'au moment où les forces coulombiennes vont approcher le niveau des forces de cohésions des gouttelettes et provoquer leur explosion.

Une cascade de fissions conduit à des gouttelettes de plus en plus petites, jusqu'au moment où le champ électrique à leur surface devient suffisant pour provoquer la désorption d'agrégats chargés. Les agrégats chargés ainsi produits sont accélérés pour être désolvatés au cône alors que les molécules non chargées sont éliminées (Figure 44) (Boudih, 2011 ; Barbier, 2012 ; Becker, 2014).

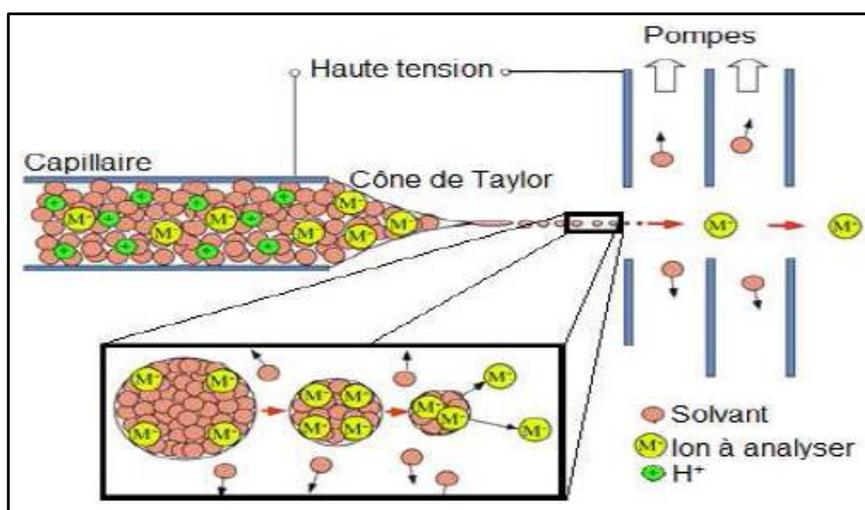


Figure 44: Source d'ionisation par électronébulisation (Barbier, 2012)

\* **Analyseur** : il sépare les ions en fonction de leur rapport  $m/z$ . Cependant, il est possible de coupler plusieurs analyseurs (spectrométrie de masse en tandem ou MS/MS) ou d'associer plusieurs types d'ionisation afin de réaliser de la spectrométrie de masse à plusieurs dimensions, en utilisant successivement le pouvoir séparateur de chaque analyseur. Ce procédé permet d'obtenir les fragments de l'ion analysé dans le premier analyseur et permet ainsi d'avoir des données conduisant à des informations structurales (Boudih, 2011).

Il existe différents analyseurs : magnétique, quadripolaire, temps de vol, trappe d'ions, quadripôle associé à un Orbitrap (Q-exactive). Ce dernier est celui utilisé au cours de ce travail. Après l'ionisation, la lentille de la source filtre les ions de composés non chargés et les impuretés. Par la suite, le quadripôle peut être activé pour filtrer un seul ion d'intérêt spécifique jusqu'à une large gamme d'ions transférés au C-trap. Ici, les ions peuvent être envoyés à l'analyseur de masse Orbitrap avec ou sans fragmentation par collision élevée dans la cellule HCD (Higher-energy Collisional Dissociation), en fonction des demandes des

utilisateurs. Dans l'Orbitrap, les valeurs  $m/z$  des ions entrants sont déterminées avec précision à une résolution en masse élevée, basée sur la transformation de Fourier de la fréquence d'oscillation des ions dépendante de la masse (Figure 45) (De Vos, 2014).

\* **Détecteur** : il mesure en fonction des différentes valeurs de  $m/z$ , l'intensité de signal (I) qui leurs correspond (Barbier, 2012).

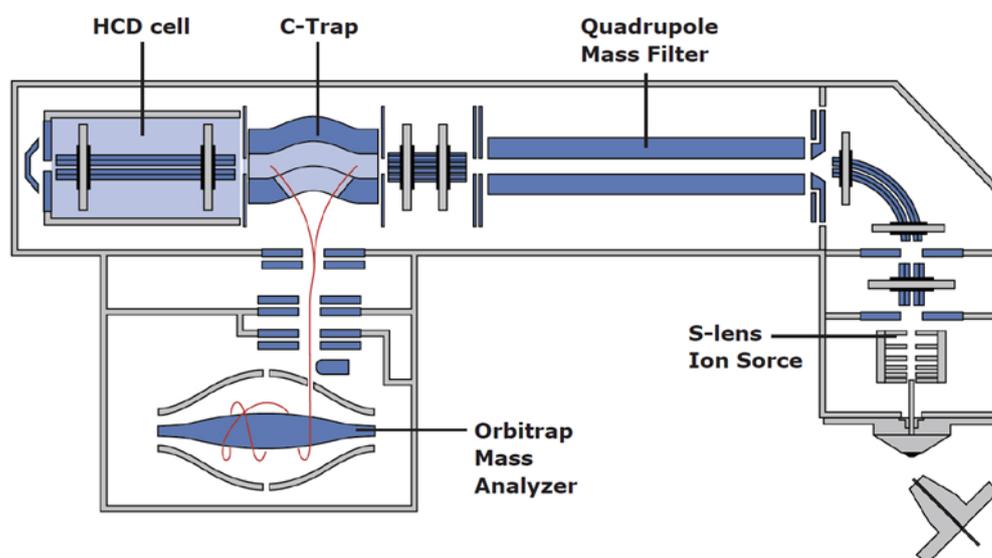


Figure 45 : Construction de spectromètre de masse Q-exacte (Michalski *et al.*, 2011).

#### 1.4.3.2. Conditions opératoires des paramètres d'ionisation (LC-ESI-MS et LC/MS/MS)

Afin d'analyser la fraction active, nous avons utilisé un appareil d'UPLC couplée à un Q Exactive (Thermo Scientific, Bremen, Allemagne) (Figure 46), en mode ions positif à la nano-électrospray-MS avec un analyseur de type Orbitrap. Le système était contrôlé par le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific). Les données enregistrées d'un rapport  $m/z$  de 80 à 1200 ont ensuite été analysées en utilisant le mode de balayage complet MS. Les valeurs des paramètres pour obtenir un rapport signal/bruit optimal, en mode positif, sont les suivantes :

- Une tension de capillaire de  $\pm 3.5$  kV
- Une température de capillaire de  $320^{\circ}\text{C}$
- Un débit de gaz de cône de 6 L/min
- Une valeur cible du contrôle de gain automatique (AGC « Automatic gain control ») égale à  $3 \times 10^6$  charges.
- Un temps d'injection maximum de 200 ms.

- Une résolution égale à 70 000

Les données ont été acquises en mode profil. Afin de permettre l'identification des métabolites, des acquisitions MS supplémentaires utilisant la dissociation induite par collision ont été réalisées.

Sur l'Exactive Orbitrap, les données ont été acquises à l'aide de la méthode DDMS<sup>2</sup> (Data Dependent Acquisition) (TOP 10), et les valeurs des paramètres ont été réglées comme suivant :

- Une énergie de collision «HCD» égale à 27
- Une résolution égale à 17 500
- Une valeur cible du contrôle de gain automatique (AGC « Automatic gain control ») égale à  $1 \times 10^5$  charges.
- Un temps d'injection maximum de 200 ms.
- Une fenêtre d'isolation égale à 2 m/z
- Le nombre de d'acquisition MS/MS a été réglé à 10 pour un spectre MS (Top 10)
- L'exclusion Dynamique a été fixée à 10.0 S
- Lock mass égale à 445.12003
- Une précision en masse égale à 5 ppm.



**Figure 46 :** (A) : Système UPLC couplé à la spectrométrie de masse, (B) source d'ionisation électrospray (ESI) (*Laboratoire de Spectrométrie de Masse (LSM), l'institut de Chimie, Université de Liège, Belgique*).

## **2. Résultats**

### **2.1. Séparation chromatographique**

Après le fractionnement sur colonne, les molécules bioactives ont été encore séparées en utilisant la technique chromatographique sur couche mince. Cette dernière a permis de séparer plusieurs métabolites, apparus sous formes de taches. Après révélation sous lumière UV pour la caractérisation et la purification, le résultat a montré que les composés avaient plusieurs points fluorescents et sombres avec des valeurs Rf différentes.

Les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Mueller Hintonensemencée avec la bactérie test *B. subtilis* (la plus sensible) pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Après, les boîtes sont incubées à 4°C pendant 4 h (diffusion des métabolites), puis à 37°C pendant 18 à 24 h.

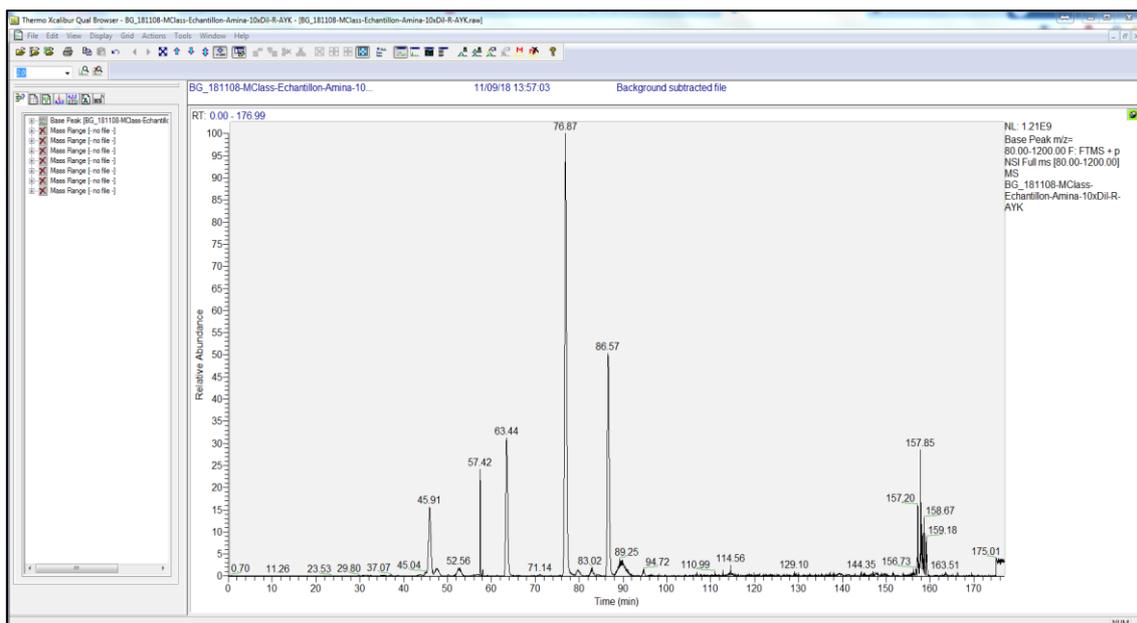
Les résultats montrent que seulement une fraction de la souche *A. quadrilineatus* a présenté une activité contre la souche bactérienne testée. Contrairement aux autres souches fongiques ; *A. niveus* et *A. wentii*, où toutes leurs fractions ne présentent aucune activité.

Cette fraction active montre un Rf égale à 0.526, et une couleur jaune à la lumière visible ainsi que sous les deux longueurs d'ondes 254 nm et 365 nm.

### **2.2. Analyse par (LC/MS) et (LC/MS/MS)**

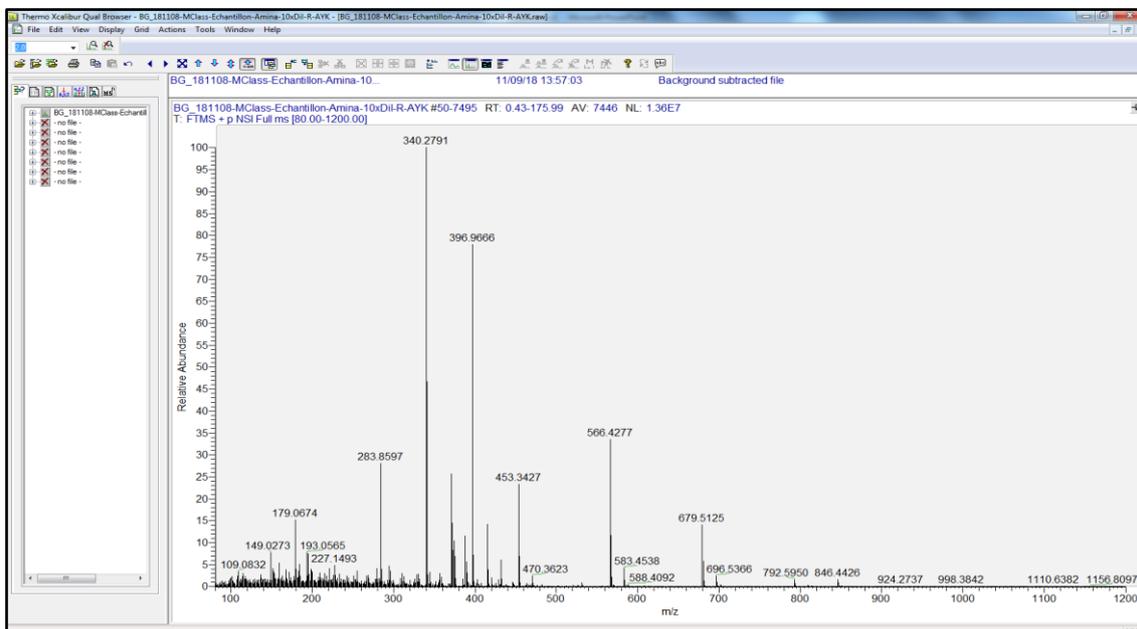
Dans le but d'obtenir une séparation satisfaisante des métabolites secondaires. Le système UPLC a été effectué en gradient d'élution linéaire de 180 min.

La figure 47 montre le profil chromatographique obtenu par analyse en UPLC de la fraction active de la souche *A. quadrilineatus*. Il a été observé que les métabolites secondaires recherchés dans la fraction active couvrent une large gamme de polarité et que 180 minutes sont nécessaires pour séparer l'ensemble de ces molécules.



**Figure 47** : Chromatogramme UPLC de la fraction active de la souche *A. quadrilineatus*.

Le chromatogramme a révélé la présence de différentes molécules et ce, en se basant sur leur temps de rétention. Pour identifier ces molécules, nous avons combiné l'UPLC à un système de détection MS. Les différents pics obtenus sont représentés dans la figure 48.



**Figure 48** : Somme des spectres de masse obtenus par ESI-MS en mode positif pour la fraction active de la souche *A. quadrilineatus*.

En spectrométrie de masse, la molécule est analysée sous une forme ionisée et pour la quantifier, le détecteur enregistre l'intensité du signal associé à cette espèce (de rapport m/z)

en fonction du temps. L'analyse par le logiciel Xcalibur 2.2 (Thermo Fisher Scientific) des pics chromatographiques et des spectres MS révèle la présence de 24 pics différents correspondent à 24 molécules, dont les majoritaires (pics très intenses) sont celles à temps d'élution 46.05, 63.30, 76.93, 86.61, 137.90, 157.18, 157.20, 157.77, et 158.01 min.

Les différents composés détectés avec leurs rapports m/z, leurs formules (les formules proposées sont compatibles avec les exigences imposées au spectromètre mais ce sont des candidats à vérifier), leurs temps de rétention ainsi que leurs intensités sont représentés dans le tableau 19.

**Tableau 19:** Les différents composés détectés dans la fraction active par analyse UPLC-SM.

Composé	Temps de rétention	Rapport m/z	Type d'ion	Formule brute	Intensité
<b>1</b>	<b>46.05</b>	<b>453.3429</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>24</sub>H<sub>45</sub>O<sub>4</sub>N<sub>4</sub></b>	<b>1.59×10<sup>8</sup></b>
<b>2</b>	<b>63.30</b>	<b>566.4278</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>30</sub>H<sub>56</sub>O<sub>5</sub>N<sub>5</sub></b>	<b>2.73×10<sup>8</sup></b>
<b>3</b>	<b>76.93</b>	<b>679.5119</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>28</sub>H<sub>59</sub>O<sub>9</sub>N<sub>10</sub></b>	<b>1.14×10<sup>9</sup></b>
<b>4</b>	<b>86.61</b>	<b>792.5946</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>38</sub>H<sub>74</sub>O<sub>5</sub>N<sub>13</sub></b>	<b>6.39×10<sup>8</sup></b>
<b>5</b>	<b>137.90</b>	<b>177.0546</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>4.87×10<sup>8</sup></b>
6	154.21	191.1430	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> O	1.20×10 <sup>7</sup>
7	155.53	161.0961	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> O	2.41×10 <sup>7</sup>
8	155.79	221.1172	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub>	1.61×10 <sup>7</sup>
9	156.16	242.2841	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>16</sub> H <sub>36</sub> N	1.62×10 <sup>7</sup>
10	156.26	312.2532	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub> N	1.52×10 <sup>7</sup>
11	156.56	197.1536	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> O <sub>2</sub>	3.44×10 <sup>7</sup>
<b>12</b>	<b>157.18</b>	<b>195.1015</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>1.67×10<sup>8</sup></b>
<b>13</b>	<b>157.20</b>	<b>167.0703</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>1.09×10<sup>8</sup></b>
14	157.25	227.1639	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> O <sub>3</sub>	7.50×10 <sup>7</sup>
15	157.36	385.0920	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> O <sub>8</sub>	3.21×10 <sup>7</sup>
16	157.39	402.1179	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>4</sub> H <sub>20</sub> O <sub>13</sub> N <sub>9</sub>	3.25×10 <sup>7</sup>
17	157.41	231.1590	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> O <sub>4</sub>	2.26×10 <sup>7</sup>
<b>18</b>	<b>157.77</b>	<b>199.1692</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>1.06×10<sup>8</sup></b>
19	157.97	253.1798	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> O <sub>3</sub>	6.83×10 <sup>7</sup>
<b>20</b>	<b>158.01</b>	<b>415.2114</b>	[M+H] <sup>+</sup>	<b>C<sub>9</sub>H<sub>27</sub>O<sub>7</sub>N<sub>12</sub></b>	<b>1.51×10<sup>8</sup></b>
21	158.23	251.1492	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> O <sub>6</sub>	1.21×10 <sup>7</sup>
22	158.69	215.1277	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> O <sub>4</sub>	1.01×10 <sup>7</sup>
23	159.18	294.2062	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>3</sub> N	7.53×10 <sup>7</sup>
24	159.22	221.1172	[M+H] <sup>+</sup>	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub>	4.54×10 <sup>7</sup>

Afin d'identifier les métabolites bioactifs, des acquisitions MS supplémentaires utilisant la dissociation induite par collision ont été réalisées. Les masses des différents fragments obtenus sont représentés dans le tableau 20.

**Tableau 20:** Les différents composés détectés avec leurs fragments MS/MS.

<b>composé</b>	<b>Fragments MS/MS</b>
1	435.3324, 417.0467, 340.2583, 322.2482, 284.1721, 209.1645, 114.0914, 96.0809, 69.0699
2	548.4172, 453.3443, 435.3332, 341.2424, 322.2491, 228.1596, 209.1650, 114.0906, 96.0813
3	661.5021, 566.4319, 548.4182, 452.3597, 435.3335, 341.2438, 322.2492, 228.1594, 209.1652, 114.0919, 96.0813
4	774.5840, 679.5123, 661.4995, 548.4176, 452.3607, 435.3329, 341.2442, 322.2490, 228.1590, 209.1650, 114.0915, 96.0810
5	149.0233, 121.0285
6	149.0961, 135.0805, 121.0651, 107.0495
7	146.0727, 133.1012, 105.0703
8	179.1067, 161.0961
9	181.1222, 155.0702, 130.1590, 87.0810, 71.0862, 57.0706
10	295.2267, 277.2162, 259.2054, 165.1274, 113.0964, 85.1017
11	179.1432, 151.1483, 141.0911, 123.0807, 95.0860, 57.0707
12	167.0703, 149.0598, 123.0807, 95.0496
13	149.0598, 139.0390, 121.0286, 95.0496
14	209.1533, 177.1273, 149.1325, 135.1169, 107.0859, 97.0651, 93.0703, 79.0548
15	359.0761, 341.0658, 237.0760, 193.0497, 149.0234
16	385.0914, 359.0753, 341.0649, 237.0760, 193.0493
17	171.1017, 147.0653, 129.0548, 111.0444, 101.0601
18	181.1590, 163.1482, 153.1640, 111.1172, 107.0859, 97.1017, 83.0861, 69.0706, 55.0550
19	197.1174, 179.1066, 141.0547, 123.0442, 97.0290, 57.0707
20	135.0805, 119.0858
21	211.0816, 193.0710, 171.0139, 153.0033
22	71.0499
23	221.1172, 203.1066, 175.1117, 165.0546, 161.0960, 57.0706
24	203.1079, 193.1233, 179.1075, 175.1125, 165.0554, 161.0968, 137.0603, 57.0709

Afin de parvenir à l'identification et à la détermination de la nature des métabolites bioactifs. Les résultats obtenus par l'analyse chromatographique UPLC couplée à la spectrométrie de masse (UPLC-MS et UPLC-MS2) sont comparés, à ceux décrits dans la littérature (la base de données ChemSpider ; <http://www.chemspider.com>), et cela, en se basant sur les rapports masse/charge, les formules brutes et les ions pseudo-moléculaires de chaque composé. En effet, ChemSpider, nous a proposé pour chaque composé, une variété de métabolites qui présentent les mêmes formules et les mêmes masses à ceux obtenues dans notre fraction.

A titre d'exemple ; la base de données a proposé cinq différents métabolites (peptides cycliques) pour le deuxième composé (Tr : 63.30). La confirmation de l'identification de ces métabolites nécessite donc : soit l'utilisation des standards (molécules pures), qui doivent présenter une similarité dans les temps de rétention, les masses moléculaires et les masses moléculaires des fragments, avec nos composés obtenus, soit l'utilisation des autres techniques d'identification complémentaires.

### **3. Discussion**

Afin d'étudier les substances naturelles d'origine fongique, différentes méthodes de chimie analytique, visant à détecter des molécules au sein de mélanges complexes, sont utilisées suivant le type de composés et de matrices étudiés, impliquant souvent des techniques chromatographiques séparées ou couplées à différents systèmes de détection (Cigic et Prosen, 2009).

A ce titre, les extraits bruts des souches fongiques, ont été fractionnés à l'aide d'une chromatographie sur colonne. Après, les molécules sont encore séparées en utilisant la technique chromatographique sur couche mince. Généralement, pour aboutir à des biomolécules pures, il est indispensable d'utiliser toutes ces différentes techniques chromatographiques, et à chaque étape il faut tester l'activité biologique des fractions. Pour cela, les spots qui apparaissent sont grattés et testés envers la bactérie la plus sensible (Boughachiche, 2012).

Pour la souche fongique *A. quadrilineatus*, les résultats révèlent que seulement la fraction 6 présente une activité antibactérienne. Cette fraction minoritaire représente presque la totalité de l'activité de l'extrait brut, ce qui confirme nos résultats sur les autres fractions non actives. Cela prouve que les étapes appliquées pour la séparation des molécules bioactives ont permis d'obtenir une fraction convenablement séparée et par conséquent, concentrer le principe actif de la souche fongique *A. quadrilineatus*. En effet, plusieurs travaux consultés ont mentionné que la chromatographie sur couche mince est appliquée dans la plupart des cas de purification de métabolites secondaires des mycètes (Bétina, 1985 ; Neilson, 2000).

Concernant les deux souches fongiques *A. niveus* et *A. wentii*, aucune fraction n'a montré une activité antibactérienne après la séparation chromatographique. Cela peut être due soit à la faible concentration des fractions par rapport à l'extrait brut, résultante de la diffusion des molécules bioactives dans le gel (Boughachiche, 2012), soit à la présence d'une synergie entre un nombre de composants, qui, lorsqu'ils sont séparés deviennent inactifs individuellement (Essawi et Srour, 2000 ; Sarker *et al.*, 2005).

Afin d'identifier et de caractériser les molécules bioactives présentes dans la fraction, considérée comme pure, nous avons utilisé la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie simple (LC/MS) et en mode tandem (LC/MS/MS).

En effet ces techniques sont largement utilisées car non seulement ce sont des méthodes de détection souvent rencontrées pour l'analyse des métabolites secondaires, mais surtout elles fournissent des informations structurales sur les analyses étudiées (Ayer et Pena-Rodriguez, 1987 ; Bains et Tewani, 1987 ; Gupta *et al.*, 1989).

L'analyse des résultats par le logiciel Xcalibur 2.2 révèle, dans une première étape, la présence de 24 molécules, et ce, en se basant sur les temps de rétention des pics obtenus dans le chromatogramme. Après, les rapports m/z, les formules, ainsi que les intensités des différents composés détectés sont déterminés.

Afin de parvenir à l'identification et à la détermination de la nature des métabolites bioactifs. Les résultats obtenus sont comparés, à ceux décrits dans la littérature (la base de données ChemSpider), et cela, en se basant sur les rapports masse/charge, les formules brutes et les ions pseudo-moléculaires de chaque composé. En effet, ChemSpider, nous a proposé pour chaque composé, une variété de métabolites qui présentent les mêmes formules et les mêmes masses à ceux obtenues dans notre fraction.

La confirmation de l'identification de ces métabolites nécessite donc : soit l'utilisation des standards (molécules pures), par comparaison des chromatogrammes et des spectres de masses de ces derniers à ceux obtenus dans notre fraction, soit en employant d'autres techniques d'identification spectrométriques telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN du proton et du carbone 13) qui étudie l'évolution d'un système de spins propre à chaque noyau soumis à un champ magnétique (Silverstein *et al.*, 2007). Cette technique sera complémentaire des résultats déjà obtenus et peut aider dans la détermination de la structure.

En effet, les métabolites secondaires d'origine naturelle (végétale, marine, fongique ou bactérienne), possèdent des caractéristiques rendant leur étude un peu difficile telles que ; la très faible quantité du principe actif, avec souvent des mélanges de molécules de structures proches rendant les étapes d'extraction et de purification longues et pouvant également conduire à des effets antagonistes ou synergiques entre les molécules (Garneau *et al.*, 2002).

*Conclusion générale  
et perspectives*

L'objectif de ce présent travail porte sur l'étude de l'activité antibactérienne de certaines souches du genre *Aspergillus* isolées à partir des sols prélevés de différents écosystèmes ; station de source thermale (Hammam Safsaf) de la région de Teleghma, et palmeraie d'oasis du nord de la région de Laghouat. En effet, les sols de ces zones, qui constituent des milieux pratiquement particuliers (peu exploités) semblent être des environnements promoteurs pour isoler des espèces productrices des substances antibactériennes nouvelles.

32 isolats fongiques du genre *Aspergillus*, ont été isolés à partir de l'ensemble des prélèvements. En se basant sur l'aspect morphologique, cette collection est subdivisée en dix groupes phénotypiques. L'identification a été confirmée par des analyses moléculaires, en utilisant un marqueur moléculaire du genre ribosomal 18S. D'après les résultats d'affiliation, les dix isolats sont identifiés comme suit: *A. quadrilineatus*, *A. fumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. niveus*, *A. wentii*, *A. terreus*, et *A. sclerotiorum*. Les séquences ont été enregistrées au niveau de Genbank sous les numéros d'accèsion : MH109538, MH109539, MH109540, MH109541, MH109542, MH109543, MH109544, MH109545, MH109546, MH109547 respectivement.

Les tests de la mise en évidence de l'activité antibactérienne sont effectués contre six bactéries tests dont trois à Gram+ (*S. aureus*, *B. subtilis*, et *E. faecalis*) et trois à Gram- (*E. coli*, *P. aeruginosa* et *K. pneumoniae*), suivant trois techniques différentes ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits. Les résultats montrent que les dix espèces fongiques présentent une activité contre au moins une bactérie test, et que les bactéries à Gram + ont été les plus affectées.

Les résultats du dépistage primaire nous ont permis de sélectionner pour la suite de notre travail trois espèces fongiques : *A. quadrilineatus*, *A. niveus* et *A. wentii*. Ces souches présentent un effet antibactérien considérable, et ne sont pas bien développées par les chercheurs sur le volet des métabolites secondaires à activité antibactérienne.

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, cinq solvants de polarité différente ont été testés. Les résultats montrent que la majorité des extraits organiques présentent une activité antibactérienne, et que l'effet le plus considérable est obtenu par les extraits du chloroforme surtout, suivis par l'acétate d'éthyle et le butanol. Ce qui permet de supposer qu'il s'agit soit de plusieurs molécules de polarité différente (soluble chacune dans un solvant différent) ou bien une ou plusieurs molécules solubles dans des solvants variés.

Par ailleurs, l'étude de la stabilité des molécules bioactives révèle que la majorité des extraits actifs gardent leur activité après le traitement thermique (jusqu'à 100°C) et l'exposition à la lumière pendant trois semaines. Qui se traduit par la présence de molécules thermostables dans les extraits bruts des souches étudiées.

En revanche, afin de déterminer le milieu le plus adéquat à la production des molécules bioactives, quatre milieux de culture liquides de composition différente, préconisés pour la production de métabolites secondaires ont été testés. Les résultats montrent que pour les deux souches fongiques *A. quadrilineatus* et *A. niveus* le milieu le plus adéquat était le milieu Czapek-dox suivi du milieu PDB. Cependant, pour la souche *A. wentii*, l'extrait provenant du milieu Sabouraud réagit différemment, en donnant des résultats plus distincts. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une souche fongique peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend de la composition et la concentration des composants du milieu de culture.

En outre, une étude de l'activité antibactérienne des extraits organiques par le système des micro-cultures Biolog a été réalisée en utilisant une gamme de concentrations (de 100 à 1.56 mg/mL). Les résultats obtenus révèlent que les extraits des trois souches fongiques présentent un effet remarquable avec différentes concentrations et ce, contre toutes les souches bactériennes testées dont les résistantes. On enregistre que la technique de Biolog a été effectuée pour la première fois pour étudier l'activité antibactérienne des espèces fongiques.

Pour analyser les métabolites bioactifs, habituellement présents à l'état de traces dans les extraits bruts; une séparation des molécules par des techniques chromatographiques a été utilisée. Le test de l'effet antibactérien des différents spots a prouvé l'activité d'une fraction. Après l'analyse de cette dernière par UPLC-MS, 24 pics correspondant à 24 molécules ont été révélés avec détermination de leurs caractéristiques chimiques : rapports m/z, formules, temps de rétention et intensités.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant ; la purification et l'identification des métabolites bioactifs produits par ces souches fongiques, et dans le cas où ces molécules s'avéreraient nouvelles, des études complémentaires devraient être envisagées, comme :

## *Conclusion générale et perspectives*

---

- L'étude de la toxicité *in vivo*, et la détermination du mécanisme d'action de ces substances.
- L'optimisation de la biosynthèse des molécules bioactives à des fins médicales.
- La production des substances antibactériennes à l'échelle industrielle.

*Références  
bibliographiques*

1. Abdelaziz W. (2006). Isolement des mycètes producteurs des substances antibactériennes à partir des sols sahsriens. UFMC.
2. Abu-Seidah A.A. (2003). Secondary metabolites as comarkers in the taxonomy of *Aspergilli*. *Acta.Microbiologica.Polonica*. 52 : 15-23.
3. Aharonowitz Y. and Demain A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 14: 159-164.
4. Al-Bayati F.A. (2008). Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts, *Journal of Ethnopharmacology* ; 116: 403-406.
5. Alekshun M.N. and Levy S.B. (2007). Molecular mechanism of antibacterial multidrug resistance *Cell*. 128: 1037-1050.
6. Almi H., Dehimat L. and Kacem chaouche N. (2015). The pattern of pathogen diversity and abundance in Lentil (*Lens culinaris*) fields in Constantine region, Algeria. *African Journal of Agricultural Research*, Vol.10 (13). pp.1536-1542,26.
7. Al-Shaibani A. B. A., Al-Shakarchi F.I., and Ameen R. S. (2013). Extraction and Characterization of Antibacterial Compound from *Aspergillus niger*. *Journal of Al-Nahrain University* Vol.16 (4), pp.167-174.
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database searchprograms. *Nucleic Acids Res*. 25: 3389-3402.
9. Archambaud M. (2009). Laboratoire Bactériologie-Hygiène CHU Rangueil Toulouse.
10. Atoui A. (2006). Approche de la mycotoxinogenese chez *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus carbonarius*: études moléculaire et physiologique. INP. Toulouse.
11. Atta H. M., Dabour S. M., and Desoukey S. G. (2009). Sparsomycin antibiotic production by *Streptomyces sp.* AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences* 5(3): 368-377.
12. Attalah M. and Kacem Chaouche N. (1992). Production of ochratoxin A in a semisynthetic: « in the second Regional Mycoligical Conf. RMC 2 ». Cairo. Egypt.

- 13.** Awad G. (2005). ; Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. INP. Toulouse.
- 14.** Ayer W.A. and Pena-Rodriguez M. (1987). Metabolites Produced by *Alternaria brassicae*. The Black Spot Pathogen of Canola, Part I, the Phytotoxic Components. *J. Natural Prod.* 50: 400-408.
- 15.** Azoun S. (2016). Le, p. e. s. p. épidémiologie de la résistance bactérienne aux antibiotiques au chu de Marrakech.
- 16.** Badillet G., De Briève C. et Guého E. (1987). Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.
- 17.** Bains P.S. and Tewari J.P. (1987). Purification, chemical characterization and hostspecificity of the toxin produced by *Alternaria brassicae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30 : 259–271.
- 18.** Balajee, S. A., D. Nickle, J. Varga, and K. A. Marr. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705-12.
- 19.** Barakat K.M. and Gohar Y. M. (2012). Antimicrobial Agents Produced by Marine *Aspergillus terreus* var. africanus Against Some Virulent Fish Pathogens. *Indian J Microbiol.*; 52(3): 366–372.
- 20.** Barbier S. H. P. (2012). Etude expérimentale du métabolisme du Coumatetralyl chez le rat. Implications dans les mécanismes de résistance aux anticoagulants. Université Claude-Bernard – Lyon.
- 21.** Barbuddhe, S.B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. and Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption–ionization time of flightmass spectrometry. *Applied Environmental Microbiology.* 74:5402–5407.
- 22.** Beargie R., Lynd P., Tucker E. and Duhring J. (1975). Perinatal infection and vaginal flora. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 122; 31–33.

23. Becker L. (2014). Identification et suivi par Spectrométrie de Masse de composés impliqués dans la défense des feuilles de vigne caractérisées par leur niveau de résistance au mildiou. Université De Lorraine.
24. Bejaoui H. (2005). Champignons ochratoxinogènes et ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. INP. Toulouse.
25. Benbrinis S. (2012). Evaluation des activités antioxydante et antibactérienne des extraits de *Santolina chamaecyparissus*. UFAS.
26. Bennett J. (2010). An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi (ed.), *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics.
27. Benserradj O. (2014). Evaluation de *Metarhizium anisopliae* à titre d'agent de lutte biologique contre les larves de moustiques. UPMC.
28. Benslama O. (2014). Isolement et caractérisation des bactéries capables de dégrader l'herbicide Glyphosate et optimisation des conditions de culture pour une dégradation plus efficace. UPMC.
29. Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 :1-26.
30. Berger Savin M. C. E. (2014). La phagothérapie : historique et potentielle utilisation contre les infections à bactéries multirésistantes. Faculté de médecine. Créteil.
31. Biskri L. and Mazel D. (2003). Erythromycin esterase gene ere (A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 3326-3331.
32. Betina V. (1985). Thin layer chromatography of mycotoxine. *J.Chromatograph.* 334(3): 211-276.
33. Bizzini A., Durussel C., Bille J., Greub G., and Prodrom G. (2010). Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 48:1549–1554.
34. Bochner B. R., Gadzinski P. and Panomitros E. (2001). Phenotype microarrays for high through put phenotypic testing and assay of gene function. *Genome Research.* 11: 1246-1255.

- 35.** Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P: 13-69.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *American Journal of Human Genetics*, Volume 32, Issue 3, Pages 314-331.
- 36.** Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. et Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- 37.** Boras A., Bozinovic D., Tenover FC. and Popovic T. (2001). First report of *Neisseria meningitidis* intermediately resistant to penicillin in Croatia. *J. Clin. Microbiol.* 39: 823.
- 38.** Boudih S. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Université Paris EST.
- 39.** Bouhairi S. (2017). *Bacillus subtilis* : Caractères et applications. Université Mohammed-V de Rabat.
- 40.** Boughachiche F. (2012). Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh. UFMC.
- 41.** Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. et Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkh de Ain Mlila. *Sciences et Technologie.* 23 : 5-10.
- 42.** Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer S. and Boulahrouf A. (2012). Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Ann. Biol. Clin.* 70(2):169-174
- 43.** Boussaber E., Kadmiri I. M, Hilali L. et Hilali A. (2012). Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *Science Library Editions Mersenne* 4: 1-21.
- 44.** Bousseboua H. (2005). Élément de microbiologie. Constantine.
- 45.** Bradford P. A. (2001). Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) in the 21st .century: Characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews.* 48: 933-951.
- 46.** Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. et Vobis G. (1989). Organismes producteurs : Biologie, taxonomie et écologie. In Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P. et Sanglier J.J. pp32-61 ; Masson. Paris.

47. Bridge P.D., William M.A.J., Prior C and Paterson R.R.M. (1993). Morphological, biochemical and molecular characteristics of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. *J Gen Microb.* 139 :1163-1169.
48. Brooks G.F., Butel G.S. and Auruston L.N. (1995). Medical Microbiology. *Printice Hall International Inc USA*: 137-149.
49. Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. and Singhal R.S. (2008). Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.
50. Butaye P., Cloeckaert A. and Schwarz S. (2003). Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 22: 205-210.
51. Calamita H. G. and Doyle R. J. (2002). Regulation of autolysins in teichuronic acid containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.* 44,601-606.
52. Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W. and Keller N.P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* 66:447-459.
53. Camara, J.E. and Hays, F.A. (2007). Discrimination between wild-type and ampicillin-resistant *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 389: 1633–1638.
54. Cano V. (2009). *Klebsiella pneumoniae* triggers a cytotoxic effect on airway epithelial cells. *BMC Microbiology.*
55. Cantrell, S, A., Casillas-Martinez, L, and Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar sattems using morphological and molecular techniques, *Mycological Research*, 110, 962-970.
56. Carnegie A.J., Ades P.K., Ford R. (2001). The use of RAPD-PCR analysis for the differentiation of *Mycosphaerella* species from *Eucalyptus* in Australia, *Mycologica Research*, Volume 105, Issue 11, Pages 1313-1320.
57. Carter A.P., Clemon W.M., Brodersen D.E., Morgan-Worren R.J., Winberly B.T. and Ramakrishnan V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosome subunit and its interaction with antibiotics. *Nature.* 407: 340-348.

- 58.** Cavalla M. et Eberlin Berlin T. (1994). Isolement des streptomycètes du sol. *L'opéron* 19:13-17.
- 59.** Ceylan O., Okmen G. and Ugur A. (2008). Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *Eur Asia J BioSci.* 2: 73-82.
- 60.** Chabasse D., Bouchara J.P., Gentile L., Brun S., Cimon B. et Penn P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. (edn) Bioforma. Paris. 160p.
- 61.** Chabasse D., Contet-audonneau N., Bouchara J. P. et Basile A.M. (2008). Moisissures dermatophytes levures du prélèvement au diagnostic. Biomérieux.
- 62.** Chabasse D., Guiguen C. et Contet-Audonneau N. (1999). Mycologie médicale. Masson. Paris.
- 63.** Cheng J. R., Fang A. and Demain A. L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 43: 1096-1098.
- 64.** Cherkaoui, A. Hibbs, J. Emonet, S. Tangomo, M. Girard, M. Francois, P. and Schrenzel, J. (2010). Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level. *J. Clin. Microbiol.* 48: 1169–1175.
- 65.** Chermette R. and Bussieras J. (1993). Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.
- 66.** Chow JW. and Shlaes DM. (1991). Imipenem resistance associated with the loss of a 40kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 28: 499-504.
- 67.** Cigic I.K. and Prosen H. (2009). An overview of conventional and emerging analytical methods for the determination of mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences,* 10, 62-115.
- 68.** Claydon M.A., Davey S.N., Edwards-Jones V. and Gordon D.B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* 14 (11): 1584-1586.
- 69.** Conton R. and Coque T. M. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology.* 9: 466-475.

- 70.** Conway, G.C., Smole, S.C., Sarracino, D.A., Arbeit, R.D. and Leopold, P.E. (2001). Phyloproteomics: species identification of Enterobacteriaceae using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 3:103–112.
- 71.** Cory A.L., Stacy D.B. and Russell HJ. (2013). Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity. *Int J Microbiol*. 901697.
- 72.** Cosgrove S.E., Qi Y., Kaye K.S., Harbarth S., Karchmer AW. And Carmeli Y. (2005). The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 26: 166-174.
- 73.** Courvalin P., Leclercq R. and Bingen E. 2006. AntibioGramme. ESKA ; PARIS.
- 74.** Cronan JE., Gennis RB. and Maloy SM. (1987). Cytoplasmic membrane. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *American Society for Microbiology: Washington, DC*, p 31-55.
- 75.** Davis, P.J. (2001). Molds, Toxic Molds, and Indoor Air Quality. [www.library.ca.gov/crb/01/notes/v8n1.pdf](http://www.library.ca.gov/crb/01/notes/v8n1.pdf)
- 76.** Dao H.P. (2005). Caractérisation de certains gènes polycétones synthases chez *Aspergillus ochraceus* Nr1 3174 producteur d'ochratoxine A et d'acide penicillique. INP. Toulouse.
- 77.** Davet P. (1996). Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) INRA.Paris.
- 78.** Davet P. et Rouxel F. (1997). Détection et isolation des champignons du sol. (edn) INRA. Paris.
- 79.** De Hoog G.C. (1997). Significance of fungal evolution for the understanding of their pathogenicity, illustrated with agents of phaeohyphomycosis. *Mycosis*. 40: 5-8.
- 80.** De Vos R. C.H. (2014). Q Exactive Plus Orbitrap LC-MS/MS. *Wageningen University & Research*.
- 81.** Dellaras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire, d'analyse ou de contrôle sanitaire. Paris : Edition Lavoisier. ISBN : 978-2-7430-0945-8.

- 82.** Devaraju R. and Satish S. (2011). Endophytic mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and studies on antimicrobial activity of its endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Experimental Sciences*; 2: 75-79.
- 83.** Dong C., Zhang J., Chen W., Huang H. and Hu Y. (2007). Characterization of a newly discovered China variety of *Metarhizium anisopliae* (*M. anisopliae* var. *dcjhyium*) for virulence to termites, isoenzyme and phylogenetic analysis. *Microbiol.Res.* 162 :53–61.
- 84.** Driver F., Milner R.J. and Trueman J.W.H. (2000). A taxonomic revision of *Metarhizium* based on a phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycol Res* .104 :134– 150
- 85.** Dworkin MM. and Falkow S. (2006). Proteobacteria: Gamma subclass. *Ed. Springer, New York, NY*, p. 1248.
- 86.** Edwards-Jones, V., Claydon, M.A., Evason, D.J., Walker, J., Fox, A.J. and Gordon, D.B. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by intact cell mass spectrometry. *Journal of Medical Microbiology*. 49:295–300.
- 87.** El amri *et al.* (2014). Étude de l'activité antibactérienne des huiles essentielles de *Teucrium capitatum* L et l'extrait de *Silène vulgaris* sur différentes souches testées.
- 88.** Elias B.C., Said S., de Albuquerque S. and Pupo M.T. (2006). The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological Research*, 161, 273-280.
- 89.** El khoury A. (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais: Occurrence et Origine. INP. Toulouse.
- 90.** Entz S.C., Johnson D.L and Kawchuk L.M. (2005). Development of a PCR-based diagnostic assay for the specific detection of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* var. *acidum*. *Mycol Res.* 109:1302–1312
- 91.** Essawi T. and Srour M. (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.*; 70: 343-349.
- 92.** Falconner SB. and Brown ED. (2009). New screens and targets in antibacterial drug discovery. *Curr. Opinion Microbiol.* 12: 497-504.

- 93.** Fernandes E.K.K., Keyser C.A., Rangel D.E.N., Foster R.N and Roberts D.W. (2010). CTC medium: A novel iodine-free selective medium for isolating entomopathogenic fungi, especially *Metarhizium acridum*, from soil. *Biol. Control*. 54 (6): 197-200.
- 94.** Frisvad J.C., Bridge P.D. and Arora D.K. (1998). Chemical Fungal Taxonomy. *Marcel Dekker Inc. New York*, 398 p.
- 95.** Gams W. and Bissett j. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma sp.* *Trichoderma & Gliocladium*, Vol. 1: *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Londres: Kubicek C.P.; Harman G.E. & Ondik K.L. *CRC Press*, 1998, PP.3-34, 300 P.
- 96.** Garneau S., Martin N.I. and Vederas J.C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- 97.** Gasparetti C., Faccio G., Arvas M., Buchert J., Saloheimo M. and Kruus K. (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 86(1):213–226.
- 98.** Gaudy C. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutiques. *Elsevier. Amsterdam*. 269 p.
- 99.** Geiser D.M. and LoBuglio K.F. (2001). The monophyletic Plectomycetes: Ascosphaerales, Onygenales, Eurotiales. In the mycota VIIA: Systematics and evolution, ed. D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: Springer-Verlag, pp. 201–19
- 100.** Gengan RM., Chuturgoon AA., Mulholland DA. and Dutton MF. (1999). Synthesis of sterigmatocystin derivatives and their biotransformation to aflatoxins by a blocked mutant of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 144:115-122.
- 101.** Gesheva V., Ivanova V. and Gesheva R. (2005). Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiol. Res.* 160: 243-248.
- 102.** Ghorri S. (2015). Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. UFMC.
- 103.** Goossens H., Guillemot D., Ferech M., Schlemmer B., Costers M., van Breda M., Baker LJ., Cars O. and Davey PG. (2006). National campaigns to improve antibiotic use. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 62: 373-379.

- 104.** Guarro J., Gené J and Stchigel A.M. (1999). Developments in fungal taxonomy. *Clinic and Microbiol Rev.* 12 (3): 454–500.
- 105.** Guernet M. et Hamon M. (1981). Abrégé de chimie analytique (tome 1). Masson Edition Paris: 8-12.
- 106.** Guinoiseau E. (2010). Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles: séparation, identification et mode d'action. UCPPP.
- 107.** Guiraud J.P. (1998). Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.
- 108.** Gungi S., Arima K. and Beppy T. (1983). Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agric. Biol. Chem.* 47:2061-2069.
- 109.** Gupta S., Roberts D.W and Renwick J.A.A. (1989). Insecticidal cyclodepsipeptides from *Metarhizium anisopliae*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1:* 2347-2357.
- 110.** Halla N. (2010). Evaluation de l'activité antifongique et antibactérienne et de la cytotoxicité de quatre conservateurs : Imidazolidinyl urée, Diazolidinyl urée, Germaben II et Bromure de N-cétyl-N, N, N-triméthylammonium. UABT.
- 111.** Harrar A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. UFAS.
- 112.** Hasavada S. H., Thumar J. T., and Singh S. P. (2006). Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. *Current Science* : 91(10): 1393-1397.
- 113.** Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B.C. and Pegler D.N. (1994). Ainsworth and Bysby's dictionary of the fungi, 8 th ed. *International Mycological Institute Egham.*
- 114.** Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. and Pegler D.N. (1995). Dictionnaire of the fungi, 8<sup>th</sup> ed. CAB. *International Walling Ford. United Kingdom.*
- 115.** Hazalin NA., Ramasamy K., Lim SM., Wahab IA., Cole AL. and Abdul Majeed AB. (2009). Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complement. Altern. Med.* 9:46.
- 116.** Helander IM., Kilpelainen I. and Vaara M. (1994). Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a 31P-NMR study. *Mol. Microbiol.* 11: 481-487.

- 117.** Hellal Z. (2011). Contribution à l'étude des propriétés antibactériennes et antioxydantes de certaines huiles essentielles extraites des Citrus. Application sur sardine (*Sardina pilchardus*). UMM. Tizi-Ouzou.
- 118.** Henson J.M. and French. R. (1993). The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology* : 31:81-109.
- 119.** Hjeljord L. and Tronsmo A. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In *Trichoderma and Gliocladium. Enzymes, biological control and commercial applications*, pp. 131-151. *Taylor and Francis Ltd, London, UK*.
- 120.** Irobi ON., Gbodi TA., Moo-Young M. and Anderson WA. (2000). Antibiotic activity of *Aspergillus quadrilineatus* extracts isolated from a Nigerian cereal. *Pharm. Biol.* 38(1):57-60.
- 121.** Isik K., Chun J., Hah Y.C. and Goodfellow M. (1999). *Nocardia Salmocida*: a fish pathogen. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* 49: 833-837.
- 122.** Johanning E., Gareis M., Nielsen K., Dietrich R. and Martlbauer E. (2002). Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis.
- 123.** Kahan, F. M., Kahan, J. S., Cassidy, P. J. and Kropp, H. (1974). The mechanism of action of fosfomycin. *Ann. New York Acad. Sci.* 235, 364-85.
- 124.** Kamiya A., Kikuchi A., Tomita Y., Kanbe T. (2004). PCR and PCR-RFLP techniques targeting the DNA topoisomerase II gene for rapid clinical diagnosis of the etiologic agent of dermatophytosis, *Journal of Dermatological Science*, Volume 34, Issue 1, Pages 35-48.
- 125.** Keller N.P. and Woobok J. (2005). Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi, (edn) Warfe.
- 126.** Kerzaon I. (2009). Métabolites bioactifs d'Ascomycètes marins: dérégulation, isolement, identification et étude de production. Université De Nantes.
- 127.** Khelili K. (2015). Application des outils biomoléculaires 16S, MALDI-TOF et métagénomique pour la détermination des variantes taxonomiques bactériennes telluriques. UMFC.
- 128.** Kirk P.M., Cannon P.F., David J.C. and Stalpers J.A. (2001). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 9th Edition. CABI Publishing.
- 129.** Kitouni M. (2007). Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. UFMC.

- 130.** Kosalec I., Pepeljnjak S. and Jandrli M. (2005). Influence of media and temperature on gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* strains. 56:269-273.
- 131.** Kulling-Gradinger C.M., Szakacs G. and Kubicek C.P. (2002). Phylogenetic and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* : 155: 1-9.
- 132.** Kumara C. G., Mongollaa P., Josepha J., Nageswara Y. V. D., and Kamal A. (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dung samples from Kaziranga National Park, Assam, India. *Journal de Mycologie Médicale* : 20: 283-289.
- 133.** Kuroya M., Ouchi N. and Katsuno M. (1949). Studies on the antibiotic substances from Actinomyces. II. On the classification of antibiotic-producing Actinomyces by the “streak plate method”. *J. Antibiotics 2 (suppl. A)*: 74-78.
- 134.** Lambert PA. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: modified target sites. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1471-1485.
- 135.** Lamrani K. (2009). Étude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc. Université Mohamed V – AGDAL. Faculté des Sciences, Rabat.
- 136.** Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Cenna R., McGettigan P.A. and McWilliam H. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinform.* 23: 2947-2948.
- 137.** Lartigue M.F., Héry-Arnaud G., Haguenoer E., Domelier A.S., Schmit P.O., vander Mee Marquet N., Lanotte P., Mereghetti L., Kostrzewa M. and Quentin R. (2009). Identification of *Streptococcus agalactiae* isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization time-offlight mass spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 47: 2284–2287.
- 138.** Le Berre M. and Ramousse R. (2003). Les enjeux de la conservation de la biodiversité en milieu saharien. *Socioloécologie et Conservation*. Université Claude Bernard Lyon1: 18p.
- 139.** Le Minor L. and Veron M. (1989). *Bacteriologie medicale*. 2ème édition. Medecine. Sciences Flammarion.
- 140.** Leontopoulos D., Siafaka A. and Markaki P. (2002). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiol.* 20, 119-126.
- 141.** Leveau J.Y. and BouixM. (1993). Les moisissures. In florent J *Microbiologie industrielle*. Les microorganismes d'intérêt industrielle. (edn) Tec et Doc- Lavoisier.

- 142.** Levy SB. and Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10: 122-129.
- 143.** Liu S., Wang H., Su M., Hwang G.J., Hong J. and Jung J.H. (2017). New metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus sydowii* J05B-7F-4. *Natural Product Research.*
- 144.** Liu Z.Y., Milner R.J., McRae C.F and Lutton G.G. (1993). The use of dodine in selective media for the isolation of *Metarhizium spp.* from soil. *J. Invertebr. Pathol.* 62 :248–251.
- 145.** Loucif K. (2011). Recherche de substances antibactériennes à partir d’une collection de souches d’actinomycètes, caractérisation préliminaire de molécules bioactives. UFMC.
- 146.** Lozniewski A. and Rabaud C. (2010). Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risqué infectieux. Centre de Coordination de lutte contre les infections Nosocomiales-Sud Est.
- 147.** Lund F., Nielsen A.B. and Skouboe P. (2002). Distribution of *Penicillium commune* isolates in cheese dairies mapped using secondary metabolite profiles, morphotypes.
- 148.** Madigan M.T., Matinko J.M. and Parker J. (1997). Brok biology of microorganisms, 8th edn. USA.
- 149.** Madigan M.T et Martinko J.M. (2007). Biologie des microorganismes. Pearson Education France, 11e edition : 331-423, 686-718.
- 150.** Madki M. A., Manzoor A. S., Powar P. V. and Patil K. S. (2010). Isolation and Biological Activity of Endophytic Fungi from *Withania Somnifera*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2: 848-858.
- 151.** Maltezou HC. and Giamarellou H. (2006). Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 27: 87-96.
- 152.** Mangili A., Bica I., Snyderman DR. and Hamer DH. (2005). Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 40: 1058-1060.
- 153.** Mangin L. (2016). Antibiotiques et résistances : enquête sur les connaissances et les comportements du grand public. Université De Lorraine.
- 154.** Maragakis L.L., Perencevich EN. and Cosgrove SE. (2008). Clinical and economic burden of antimicrobial resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 6: 751-763.

- 155.** Maria G. L., Sridhar K. R. and Raviraja N. S. (2005). Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology* : 1: 67-80.
- 156.** Markham PN. and Neyfakh AA. (2001). Efflux-mediated drug resistance in Gram-positive bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 509-514.
- 157.** Martin J.F. (1998). New aspect of genes and enzymes for B- Lactam. Biosynthesis. *App.Microbiol. Biotechnol.*50: 1-15.
- 158.** Marty FM., Yeh WW., Wennersten CB., Venkataraman L., Albano E., Alyea EP., Gold HS., Baden LR. and Pillai SK. (2006). Emergence of a clinical daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate during treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and osteomyelitis. *J. Clin. Microbiol.* 44: 595-597.
- 159.** Mathan S., Subramanian V. and Nagamony S. (2013). Optimization and antimicrobial metabolite production from endophytic fungi *Aspergillus terreus* KC 582297. *European Journal of Experimental Biology.* 3(4):138-144.
- 160.** Mathew R. (1995). *Biologie Campbell*, (edn) ISBN Canada.
- 161.** Meenupriya J. and Thangaraj M. (2011). Analytical characterization and structure elucidation of metabolites from *Aspergillus ochraceus* MP2 fungi. *Asian Pac J Trop Biomed.*1(5): 376–380.
- 162.** Mesbah S. (2009). Sur le front des emergences. *Medecine Tropicale.* 69: 27-32.
- 163.** Meziani M. (2012). Contribution du diagnostic biochimique bactérien dans l'établissement des parentés phylogénétiques : Cas des Entérobactéries et *Pseudomonas*. UFMC.
- 164.** Miao F.P., Li X.D., Liu X. H., Cichewicz R. H., and Ji N.Y. (2012). Secondary Metabolites from an Algicolous *Aspergillus versicolor* Strain. *Mar Drugs.* 10(1): 131–139.
- 165.** Michalski A., Damoc E., Hauschild J., Lange O., Wieghaus A., Makarov A., Nagaraj N., Cox J., Mann M., and Horning S. (2011). Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics* : 10.9. 0.1074/mcp.M111.011015–2.
- 166.** Moore J. H., Davis N.D and Diener U.L. (1972). Mellein and 4-Hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Appl. Microbiol.* 23: 1067-1072.

- 167.** Moreau C. (1991). Les moisissures. Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaire. Contrôle microbiologique. 222-241.
- 168.** Morin O. (1994). *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. *Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses* 8-600-A-10.
- 169.** Moroh, J. L. A. (2013). Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides (Doctoral dissertation, Brest).
- 170.** Mueller G.M. and Schmit J.P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What Can we predict? *Biodiversity and Conservation*. 16: 1-5.
- 171.** Nagy E., Maier T., Urban E., Terhes G. and Kostrzewa, M. (2009). Species identification of clinical isolates of *Bacteroides* by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Microbiol. Infect.* 15: 796–802.
- 172.** Neilson K.F. (2000). Mould growth on building materials secondary metabolites .Mycotoxins and biomakers.
- 173.** Newman DJ., Cragg GM. and Snader KM. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* 66: 1022-1037.
- 174.** Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. (2000). L'essentiel en microbiologie. Édition BERTI, Paris.
- 175.** Niedege A. J. C. F., Suraia S., Izabel Y. I. and Jairo K. B. (2002). The antimicrobial activity of *Aspergillus fumigatus* is enhanced by a pool of bacteria. *Microbiol. Res.* 157, 207–211.
- 176.** Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 593-656.
- 177.** Nikaido H. and Rosenberg EY. (1981). Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Physiol.* 77: 121-135.
- 178.** Normak HB. and Normak S. (2002). Evolution and spread of antibiotic resistance. *J. Intern. Med.* 252: 91-106
- 179.** Obana H., Kumeda Y. and Nishimune T. (1995). *Aspergillus ochraceus* production of 5,6-dihydropenicillic acid in culture and foods. *J. Food. Protection.* 58: 519-523.

- 180.** Ola A. R.B. , Debbab A., Aly A. H., Mandi A., Zerfass I., Hamacher A., Kassack M. U., Brötz-Oesterhelt H., Kurtan T. and Proksch P. (2014). Absolute configuration and antibiotic activity of neosartorin from the endophytic fungus *Aspergillus fumigatiaffinis*. *Tetrahedron Letters*. V. 55, Issue 5, Pages 1020–1023.
- 181.** Olivier P. (2007). Bases moléculaires de la voie de biosynthèse de la patuline, mycotoxine produite par *Byssosclamyces nivea* et *Penicillium griseofulvum*. INP. TOULOUSE.
- 182.** Olson E. and Rattzkin B. (1999). Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 10: 525-527.
- 183.** Omoto S., Shomura T., Suzuki H. and Inouye S. (1979). Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture II. Isolation, structure and biological properties of N-carbamoyl-D-glucosamine (substance SF-1993). *J. Antibiotics*. 32: 436-441.
- 184.** Omura S. and Tanaka J. (1986). Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. In: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G. Regulation of secondary metabolites. *VCH Publishers Inc. Berlin*. 306-332.
- 185.** Pamel E. V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A. and Daeseleire E. (2010). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an HPLC-MS/MS multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotoxin Research* : 27(1): 37-47.
- 186.** Pandey A., Shukla A. and Majumdar S. K. 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M27 for the production of an antibacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology*. 4(9): 909-910.
- 187.** Pao SS., Paulsen IT. and Saier MH. (1998). Major facilitator. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 1-34.
- 188.** Percival SL. (2004). Microbiology of waterborne diseases. Ed. *Elsevier Academic Press, Amsterdam; Boston*. P. 480.
- 189.** Perry JOJ., Staley J. T. and Lory S. (2004). Microbiologie. Dunod. France.
- 190.** Phainuphong P., Rukachaisirikul V., Tadpetch K., Sukpondma Y., Saithong S., Phongpaichit S., Preedanon S. and Sakayaroj J. (2017).  $\gamma$ - Butenolide and furanone derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus sclerotiorum* PSU-RSPG178. *Phytochemistry* 137:165- 173.

- 191.** Philippon A. (2006). Antibiotiques I. cours de bactériologie Générale. Faculté de médecine COCHIN-POR-ROYAL. Université PARIS.
- 192.** Pillai V. R., Gunasekaran S., Ramanathan S., Murugaiyah V., Samsudin M.W. and Din L. B. (2016). Biological activities of four Parmotrema species of Malaysian origin and their chemical constituents. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* .Vol. 6 (08), pp. 036-043
- 193.** Pomini M. A., Dalva T.F., Raimundo B.F., Halha O.S., Wanderley S., Noemia K.I. and Milton F. (2006). A new method for asperphenamate synthesis and its antimicrobial activity evaluation. *Natural Product Research*. V.20, N: 6.
- 194.** Poole K. (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 12-26.
- 195.** 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* 5(9): 974-6846.
- 196.** Praveena Y. S. N. and Padmini P. (2011). Antibacterial activities of mycotoxins from newly isolated filamentous fungi. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 1(1): 8-13.
- 197.** Prescott L.M., Harley J.P. and Klein .D.A. (2003). Microbiologie. De Boeck & Larcier. Bruxelles.
- 198.** Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007). Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles.
- 199.** Prince L., Prabakaran P., Mehalingam R. and Samuel P. (2011). An investigation of the soil mycoflora in sugarcane field of Thanjavur district tamilnadu. *Europ. Exper. Biol.* 1(2): 132-138.
- 200.** Raimbault M. (1983). Fermentation en milieu solide, croissance de champignons filamenteux sur substrat amylicé. p:1-42. O.R.S.T.O.M.-Paris.
- 201.** Rajan B. M. and Kannabiran K. (2010). Antimicrobial activity of *Streptomyces albofaciens* vitbrk1 spp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. *Pharmacologyonline*. 1: 124-132.
- 202.** Raper K. and Fennell D.J. (1965). The genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins editors, Baltimore.

- 203.** Rulz N. (2007). Micromycètes et métabolites fongiques en milieu marin - isolement de souches- mise en culture- production, identification et évaluation pharmacologique de lipides, acides gras et peptides. Université de Nantes, 283 p.
- 204.** Ryzhov, V., Hathout, Y. and Fenselau, C. (2000). Rapid characterization of spores of *Bacillus cereus* group bacteria by matrix-assisted laser desorption–ionization time-of-flight mass spectrometry. *Applied Environmental Microbiology*. 66:3828–3834.
- 205.** Sadfi-Zouaoui N., Rouaïssi M., Essghaier B., Hajlaoui M.R., Hermosa M.R. et Boudabous A. (2008). Identification morphologique et moléculaire d'espèces du genre *Trichoderma* isolées de différents sols Tunisiens. *Microbiol. Hyg. Alim.-Vol 20, N° 57*.
- 206.** Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J. and Kishan V. (2008). Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol*. 7: 349-355.
- 207.** Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O. (2000). Introduction of food and airborne fungi. 6th edition. Centraal bureau voor schimmelcultures. Utrecht.
- 208.** Sanchez S. and Demain A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology*. 31: 895-906.
- 209.** Sanger F., Nicklen S. and Coulson A.R.(1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natn. Acad.Sci. USA* 74, 5463-5467.
- 210.** Sarker S. D., Latif Z. and Gray A. I. (2005). Natural Product Isolation. In: Sarker S. D., Latif Z. and Gray A. I. *Natural products isolation. Humana Press (Totowa)*, pp: 1-23.
- 211.** Schloissnig S., Arumugam M., Sunagawa S., Mitreva M., Tap J., Zhu A., Waller A., *et al.* (2013). Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*: 493 45–50.
- 212.** Schmidt FR. (2004). The challenge of multidrug resistance: actual strategies in the development of novel antibacterials. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 63: 335-343.
- 213.** Seng, P. Drancourt, M. Gouriet, F. La, S.B. Fournier, P.E. Rolain, J.M. and Raoult D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis*. 49:543-551.
- 214.** Sharma R., Sharma C.L. and Kapoor B. (2005). Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. *Indian J Med Sci*. 59: 120-129.

- 215.** Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. and Nida T. (1979). Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot.* 32: 427-435.
- 216.** Siddiqui I.A., Shaukat S.S. and Khan A. (2004). Differential impact of some *Aspergillus* species on *Meloidogyne javanica* biocontrol by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0. *Letters in Applied Microbiology.* 39, 74–83.
- 217.** Singh RS., Bhari R., Kaur HP. and Vig M. (2010). Purification and characterization of a novel thermostable mycelial lectin from *Aspergillus terricola*. *Appl Biochem Biotechnol.* 162(5):1339–1349.
- 218.** Singh SB. and Barrett JF. (2006). Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015.
- 219.** Singleton P. (1999). Bactériologie, 4<sup>ème</sup> édition, Dunod, Paris.
- 220.** Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. INP.Toulouse.
- 221.** Smeyers Y. G., Hernandez A. and Von Carstenn-Lichterfelde C. (1983). Quantum mechanical calculations useful for determining the mechanism of action of fosfomycin. *J. Pharm, Sci.* 72:1011-1014.
- 222.** Stoks S.M. and Thomas C.R. (2001) Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythraea* in submerged fermentation. *Biotechnol and Bioeng.* 75 (6): 702-709.
- 223.** Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest.
- 224.** Takahashi J.A., Monteiro de Castro M.C., Souza G.G., Lucas E.M.F., Bracarense A.A.P., Abreu L.M., et al. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J. med. mycol.* 18: 198-204.

- 225.** Taniwaki MH, Pitt JI, Teixeira AA. and Iamanaka BT. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int. J. Food. Microbiol.* 82:173-179.
- 226.** Taylor and Francis. (1998). Bristol basic biology,taxonomy and genetics. *Trichoderma* and *Gliocladium. london(UK)(USA)*. vol.pp:350, 356, 358-370, 381,387-391.
- 227.** Torres M., Balcells M., Sala N., Sanchis V. and Canela R. (1998). Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide. Science.* 53: 9-14.
- 228.** Tortora J., Funk B.F. et Case C.H.L. (2003). Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN.Canada
- 229.** Tortorano AM., Cabrini E. and Viviani MA. (1979). Sensibilité in vitro des levures a cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.* 8:69-74.
- 230.** Tresner, H.D. and Hayes J.A. (1971). Sodium chloride tolerance of terrestrial fungi. *Applied Microbiology*, 22, 210-213.
- 231.** Turner W.B. (1971). Fungal Metabolites. Academic Press, London.
- 232.** Turner, W.B. and Aldridge D.C. (1983). Fungal metabolites II; Academic Press, Inc.: London, New York.
- 233.** Van Bambeke F. et Tulkens P. (2009). Pharmacologie et Pharmacothérapie. Anti-infectieuse. Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire Université catholique de Louvain. Belgique.
- 234.** Van Delden C. and Iglewski B. H. (1998). Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4: 551-560.
- 235.** Voelker F. and Altaba S. (2001). Nitrogen source governes the pattren of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbial* :147: 2447-2459.
- 236.** Walsh C. (2003).Natural and produced immunity versus acquired resistance. In: antibiotics; actions, origins, resistance. Ed. ASM press, *Washington*. 91-106.
- 237.** Wang Y., Zheng J., Liu P., Wang W. and Zhu W. (2011). Three New Compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 Grown in a High Salt Medium Marine Drugs, 9(8), 1368-1378; doi:10.3390/md9081368.

- 238.** Ward O. P., Qin W. M., Dhanjoon J., Ye J. and Singh A. (2006). Physiology and Biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology*. 58 : 1-75.
- 239.** Webster J. and Weber R.W.S. (2007). Introduction to fungi. 3rd edition. Cambridge University Press. New York, pp. 286–302.
- 240.** Whalley, A.J.S. (1994). *Science in Parliament* 51, 19.
- 241.** White, T., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990). Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes tiré de PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White, eds. Academic Press. New York. USA. pp 31 5-322.
- 242.** Wild A. (1993). Soils and environment. An introduction, pp. 281. In. Cambridge price editions. Cambridge University press, Cambridge.
- 243.** Woobok J. and Keller N.P. (2004). Lae A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus sp*. *Eucaryotic Cell*. 3(2): 527-535.
- 244.** Wright GD. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57: 1451-1470.
- 245.** Xu L., Meng W., Cao C., Wang J., Shan W. and Wang Q. (2015). Antibacterial and Antifungal Compounds from Marine Fungi. *Mar. Drugs*. 13, 3479-3513; doi:10.3390/md13063479.
- 246.** Yagupsky P. (2006). Selection of antibiotic-resistant pathogens in the community. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 25: 974-976.
- 247.** Yala D., Merad A. S., Mohamed D. and Ouar Korich M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° 91.
- 248.** Yamaç M. and Bilgili F. (2006). Antimicrobial Activities of Fruit Bodies and/or Mycelial Cultures of Some Mushroom Isolates. *Pharm. Biol.* 44:660- 667.
- 249.** Yang G., Sandjo L., Yun K., Leutou AS., Kim GD., Choi HD., Kang JS., Hong J. and Son BW. (2011). Flavusides A and B, antibacterial cerebrosides from the marine-derived fungus *Aspergillus flavus*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 59(9):1174-7.
- 250.** Youcef-Ali M. (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. UPMC.

- 251.** Zerroug A. (2011). Métabolites secondaires bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). UFAS.
- 252.** Zhang D., Yang X., Kang JS., Choi HD. and Son BW. (2008). Chlorohydroaspyrones A and B, antibacterial aspyrone derivatives from the marine-derived fungus *Exophiala sp.* *J Nat Prod.*71(8):1458-60.
- 253.** Zinedine A. (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des Aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. USMBA.
- 254.** Zmahoun C. (2005). Evaluation de la sensibilité aux antibiotique des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire-Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M ). Université du Mali. 91.

# *Résumés*

## Résumé

Dans le but de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques, l'activité antibactérienne de dix espèces fongiques du genre *Aspergillus* isolées à partir des sols prélevés d'écosystèmes particuliers (Laghouat et Teleghma) a été recherchée vis-à-vis de six souches bactériennes dont trois à coloration Gram + et trois à coloration Gram-. Les résultats de la mise en évidence par différentes techniques (cylindres, disques et puits) nous ont permis de sélectionner pour la suite de notre travail trois espèces fongiques (*A. quadrilineatus*, *A. niveus* et *A. wentii*) qui présentent un effet antibactérien considérable, et qui ne sont pas bien développées par les chercheurs sur le volet des métabolites secondaires à activité antibactérienne. Afin d'optimiser les conditions d'extraction des molécules bioactives de ces souches, cinq solvants de polarités différentes ont été testés, dont le chloroforme s'est avéré être le meilleur solvant. Après la sélection de ce dernier, quatre milieux de culture à diverses compositions ont été utilisés pour déterminer le milieu le plus adéquat à la production des antibiotiques. Les résultats montrent que la nature des composants de ces milieux (en source de carbone, d'azote, et source minérale) influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les mycètes. Par ailleurs, l'étude de la stabilité des molécules bioactives révèle que la majorité des extraits actifs gardent leur activité après le traitement thermique (jusqu'à 100°C) et l'exposition à la lumière. En supplément, la séparation des molécules antibactériennes par les techniques chromatographiques nous a permis de sélectionner une fraction active. Après l'analyse de cette dernière par UPLC-MS, 24 pics correspondant à 24 molécules ont été révélés avec détermination de leurs caractéristiques chimiques : rapports m/z, formules, temps de rétention et intensités.

**Mots clés :** *Aspergillus*, écosystèmes particuliers, activité antibactérienne, molécules bioactives.

## **Abstract**

In the interest of discovering new antibiotic molecules, the antibacterial activity of ten fungal species of *Aspergillus* genus isolated from soils taken from particular ecosystems (Laghouat and Telegma) was sought against six bacterial strains; three with Gram + staining and three with Gram - staining. The results of the demonstration by different techniques (cylinders, disks and wells) have allowed us to select for the rest of our work three fungal species (*A. quadrilineatus*, *A. niveus* and *A. wentii*) that have a considerable antibacterial effect, and which are not well developed by researchers in the field of secondary metabolites with antibacterial activity. In order to optimize the extraction conditions of the bioactive molecules of these strains, five solvents in different polarities were tested, of which chloroform turned out to be the best one. After the selection of this solvent, four culture media of various compositions were used to determine the most adequate medium for the production of antibacterial substances. The results show that the nature of the components of these media (carbon source, nitrogen, and mineral source) greatly influences the production capacity of antibiotics in fungi. Moreover, the study of the stability of bioactive molecules reveals that the majority of active extracts maintain their activity after heat treatment (up to 100 °C) and exposure to light. In addition, the separation of antibacterial molecules by chromatographic techniques allowed us to select an active fraction. After the analysis of this fraction by UPLC-MS, 24 peaks corresponding to 24 molecules were revealed with determination of their chemical characteristics: m/z ratios, formulas, retention time and intensities.

**Key words:** *Aspergillus*, particular ecosystems, antibacterial activity, bioactive molecules.

## ملخص

من أجل اكتشاف جزيئات لمضادات حيوية جديدة، تم التحقق من النشاط المضاد للبكتيريا لعشرة أنواع من فطريات (*Aspergillus*) عزلت من عينات تربة جمعت من نظم إيكولوجية خاصة (الأغواط، تلاغمة) وذلك ضد ستة سلالات بكتيرية من بينهم ثلاثة سلبية الغرام وثلاثة موجبة الغرام. النتائج المتحصل عليها بعد استخدام تقنيات مختلفة (اسطوانات، والأقراص والحفر) سمحت لنا باختيار ثلاثة أنواع من الفطريات (*A. quadrilineatus*, *A. niveus*, *A. wentii*) لتكملة العمل و التي أظهرت نشاط معتبر مضاد للبكتيريا و التي لم يسبق التطرق إليها من طرف الباحثين في مجال المنتجات الايضية الثانوية ذات النشاط الضد بكتيري. و لتحسين ظروف استخلاص الجزيئات النشطة بيولوجيا من هذه السلالات، تم اختبار خمسة مذيبات عضوية ذات قطبية مختلفة، حيث تبين أن الكلوروفورم أفضل المذيبات. بعد اختيار هذا الأخير، استخدمت أربع أوساط استنبات ذات تركيبات مختلفة لتحديد الوسط الأكثر ملائمة لإنتاج المضادات البكتيرية. وأظهرت النتائج أن طبيعة مكونات هذه الأوساط (مصدر الكربون ، النيتروجين والمصدر المعدني) تؤثر بشكل كبير على القدرة الإنتاجية للمضادات الحيوية لدى الفطريات. أيضا، فان دراسة ثبات الجزيئات ذات النشاط الحيوي بينت ان معظم المستخلصات النشطة احتفظت بفعاليتها عند المعاملة الحرارية (حتى عند 100 °م) و تعرضها للضوء. بالإضافة إلى ذلك، سمح لنا فصل الجزيئات المضادة للبكتيريا باستخدام تقنيات الكروماتوجرافيا باختيار جزء نشط. بعد تحليله بواسطة UPLC-MS، تم الكشف عن 24 نقطة تتطابق مع 24 جزيئة تم تحديد خصائصها الكيميائية : العلاقة بين  $m / z$  ، الصيغة الكيميائية ، أوقات الاحتفاظ والشدة.

**الكلمات المفتاحية:** *Aspergillus* ، نظم بيئية خاصة ، نشاط مضاد للبكتيري، جزيئات نشطة حيويا.

# *Annexes*

## *Annexe 1*

### **Milieux de cultures**

#### ➤ **Milieu PDA (Potato Dextrose Agar)**

- Pomme de terre 200 g
  - Dextrose 20 g
  - Agar 20 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH= 6

#### ➤ **Milieu Czapek Dox Agar**

- Nitrate de sodium 2 g
  - Chlorure de potassium 0.5 g
  - Sulfate de magnésium 0.5 g
  - Sulfate ferreux 0.01 g
  - Phosphate de potassium 1 g
  - Saccharose 20 g
  - Agar 20 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH = 7

#### ➤ **Milieu MEA (Malt Extract Agar)**

- Extrait de malt 20 g
  - Peptone 1 g
  - Dextrose 20 g
  - Agar 15 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH = 5.5

#### ➤ **Milieu Sabouraud**

- Peptone 10 g
- Dextrose 20 g

- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 mL  
pH = 7

➤ **Milieu Chapman**

- Peptone 10 g
- Extrait de viande de bœuf 1 g
- Mannitol 10g
- Chlorure de sodium 75 g
- Bacto Agar 15 g
- Rouge de phénol 0,025 g
- Agar 15 g
- Eau distillée 1000 mL  
pH final : 7,4

➤ **Gélose Hecktoen**

- Protéose peptone 12 g
- Extrait de levure 3 g
- Sels biliaires 9 g
- Lactose 12 g
- Saccharose 12 g
- Salicine 2g
- Chlorure de Sodium 5 g
- Thiosulfate de sodium 5 g
- Citrate ferrique d'ammonium 1,5 g
- Agar 14 g
- Bleu de bromothymol 0,065 g
- Fuschine 0,1 g
- Agar 14 g
- Eau distillée 1000 mL  
pH final : 7,5

➤ **Gélose au céramide**

- Peptone 20 g

- Chlorure de magnésium 1,4 g
  - Sulfate dipotassique 10 g
  - Cétrimide 0,3 g
  - Glycérol 10 mL
  - Agar 13,6 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH final: 7,2

➤ **Milieu TSA (Trypticase Soja Agar)**

- Hydrolysate enzymatique de caséine 15 g
  - Peptone de soja 5 g
  - Chlorure de sodium 5 g
  - Agar 12 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH =7.3

➤ **Milieu Muller-Hinton**

- Extrait de viande de boeuf 2 g
  - Peptone de caséine 17.5 g
  - Amidon de maïs 1.5 g
  - Agar 17 g
  - Eau distillée 1000 mL
- pH=7.4

## *Annexe 2*

### **Solutions**

➤ **Solution d'eau Physiologique**

- NaCl 9 g
- Eau distillée 1000 mL

➤ **Solution Mc-Farland 0.5**

- Chlorure de baryum à 1% (10g/L)    0.05 mL
- Acide sulfurique à 1% (10mL/L)    9.95 mL

## *Annexe 3*

**Les séquences des dix souches fongiques obtenues après traitement par le logiciel**

### **Chromas**

**La souche *Aspergillus quadrilineatus* (L2) :**

CGGGCTGCCTCCGGGCGCCCAACCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGTG  
GGGAGCCCCCTAGGGGCGAGCCGCCGGGGGAACACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATG  
CAGTCTGAGCCTGAATACAAATCAGTCAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGC  
ATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC  
ATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGC  
GTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCCCCCGGGGGACGGG  
CCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTCCCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGG  
TCGATTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGGCGTCTCCAACCTTATTTCTCAGGTGACCTCG  
ATC

**La souche *Aspergillus fumigatus* (L3) :**

AACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCT  
ATCGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCTTGCGC  
CCCCGGGCCCGCGCCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCT  
GAGTTGATTATCGTAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT  
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG  
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG  
CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCTCCCGGGGGACGGGCC  
GAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC

**La souche *Aspergillus fumigatiaffinis* (L61) :**

CGGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGT  
ACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGTTTCGACGGCCGCCGGGGAGGCCTCGCGCCCCCG  
GGCCCCGCGCCCGCCGAAGACCCCAACATGAACGCTGTTCTGAAAGTATGCAGTCTGAGTT  
GATTATCATAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC  
CCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCCCGTCCCCCTCCCCGGGGACGGGCCCGAAAGGC  
AGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCC  
CGGCCGGCGCCAGCCGACACCCAACTTTTATTCTAAGGTGACCTCGGATCAGTACG

**La souche *Aspergillus flavus* (T1) :**

CCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTAGGGTTCCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGT  
TACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCATTCATGGCCGCCGGGGGCTCTCAGCCC  
CGGGCCCGCGCCCGCCGGAGACACCACGAACCTCTGTCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTTGA  
TTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAG  
AACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAGTCTTT  
GAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGC  
CCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCCCCTCTCCGGGGGGGACGGGCCCAA  
AGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGC

**La souche *Aspergillus niger* (T5) :**

GGAAGGATCATTATTGAGTGCGGGCTGCCTCCGGGGCGCCCAACCTCCCACCCGTGAATAC  
CTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAACCCCTCGGGGGCGAGCCGCCGGGGACTACTGAAC  
TTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCAAACTTTCAACA  
ATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAGTAATGTGAA  
TTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCATTCCGG  
GGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTCGT  
CGTCCCCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGTGTCCGGTCTCGAGC  
GTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGACTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGACGTCTCCAAC  
CATTTTTTCTTCAGGTTGACCTCG GATCAGGTAG

**La souche *Aspergillus nidulans* (T7) :**

TAATCGAGCGGGTGACAAAGCCCCATACGCTCGAGGACCGGACACGGTGCCGCCGCTGC  
CTTTCGGGCCCGTCCCCCGGGGGGACGACGACCAACACACAAGCCGGGCTTGAGGGC  
AGCAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCCCGGAATGCCAGGGGGCGCAATGTGCGTTCA  
AAGACTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGAGTTCGCTGCGTTCT  
TCATCGATGCCGGAACCAAGAGATCCATTGTTGAAAGTTTTGACTGATTTGTATTAGGCT  
CAGACTGCATCACTCTCAGGCATGAAGTTCAGTGGTCCCCGGCGGCTCGCCCCTGGGGG  
CTCCCCACCGAAGCAACAGTGTTAGGTAGTCACGGGTGGGAGGTTGGGCGCCCCGGAGGC  
AGCCCGCACTCGGTAATGATCCTTCCGCAGGTC

**La souche *Aspergillus niveus* (T32) :**

TGACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCGCGTGGCCCAACCTCCCACCCGTGC  
CTATTGTACCCTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCAGCCTTCGGGCTGGCCGCCGGGGGGCGT  
CTCGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGG  
TGTCTGAGTGTGATTGTTTGAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGG  
CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT  
CATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG  
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGG  
ACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCT  
TCCG

**La souche *Aspergillus wentii* (T33) :**

CTGCGAGGATCATTACGAGTGAGGACCTAACCGGTCCAACCTCCCACCCGTGTCTATCGT  
ACCTTGCTCGCTTCGGCGGGCCCCGCCATTCGTGGCCGCCGGGGGGCATTTCGCCCCCGGG  
CCCGCGCCCGCCGGAGACACCAACACGAACACTGTCTGAAGGTTGCAGTCTGAGTCGATT  
TATTTAATCGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGC  
AGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACG  
CACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCA  
AGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGCCGTCCCCTTCCCAGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCG  
GCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCG

**La souche *Aspergillus terreus* (T46) :**

CTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCTTTATGGCCCAACCTCCCACCCGTGACTAT  
TGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCAGCGTTGCTGGCCGCCGGGGGGCGACTCGCCC  
CCGGGCCCGTGCCCGCCGGAGACCCCAACATGAACCCTGTTCTGAAAGCTTGCAGTCTGA  
GTGTGATTCTTTGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGAT  
GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAG  
TCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG  
CTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCTCGTCCCCCGGCTCCCGGGGGACGGGCC  
CGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCTTCCGCTC  
CGTAGGC

**La souche *Aspergillus sclerotiorum* (T62) :**

CCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTGAGGGTCCCTCGGGGCCCAACCTCCCCACCCGTGTA  
TACCGTACCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCCGCCGCGCAAGCGGCCGCCGGGGGGGGCGTCAA  
ACCCCCCTCCCTAGGCGAGCGCCCGCCGGAGACACCAACGTGAACACTGTCTGAAGTTT  
TGTTGTCTGAGTTCGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCTTGGTT  
CCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAATTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCACCCCCCTGGTATTCCGGGGGGTATGCCTGTC  
CGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTGTCCCCCCGGGGAC  
GGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACC  
CGCTCTTGTAGG

## ***Annexe 4***

### **Bactéries tests utilisées**

Six souches bactériennes ont été choisies pour la réalisation de nos tests antibactériens :

#### ***Staphylococcus aureus***

Bactéries appartenant à la famille des Micrococcaceae (les staphylocoques), ce sont des cocci (forme arrondie) à Gram positif avec un diamètre de 0,5 à 1,5  $\mu\text{m}$ , de forme non sporulée, qui tendent à se grouper en paires, petites chaînes. Elles sont habituellement non capsulées, ou possédant des capsules limitées. Non mobiles, elles sont anaérobies facultatives.

Elles colonisent très largement la peau et les muqueuses (couche de cellules recouvrant l'intérieur des organes creux). Ils sont responsables d'infections diverses superficielles ou profondes, mais également d'intoxications et d'infections urinaires (Singleton, 1999 ; Dworkin et Falkow, 2006).

#### ***Bacillus subtilis***

Bactérie ubiquitaire à Gram positif, aérobie pouvant se développer en anaérobiose, mobile par des flagelles péritriches, formant des spores très résistantes dont l'élimination efficace nécessite des conditions particulières. Malgré le fait qu'il s'agisse d'une bactérie à faible potentiel pathogène, elle peut donner lieu à de redoutables infections dans certains cas ou encore être à l'origine d'une intoxication alimentaire (Bouhairi, 2017).

#### ***Enterococcus faecalis***

Les entérocoques sont des bactéries à Gram positif, non sporulées qui se présentent sous forme de coques isolés ou arrangés en paires ou en chaînettes. Ce sont des bactéries ubiquistes, présentes dans différentes niches écologiques, telles que le tractus intestinal des mammifères dont l'homme, plus rarement au niveau du vagin ou de la cavité buccale (Beargie *et al.*, 1975 ; Schloissnig *et al.*, 2013).

*E. faecalis* est une bactérie non-mobile, anaérobie facultatif. Elle peut causer des endocardites, ainsi que des infections de la vessie, de la prostate ou de l'épididyme.

### ***Escherichia coli***

Appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, c'est une bactérie à Gram négatif, commensal du tube digestif de l'Homme et de l'animal, de forme non sporulée, de type aérobie facultative, généralement mobile grâce aux flagelles (flagellés péritriches), (Singleton, 1999). Sa longueur varie de 2 à 6 µm, alors que sa largeur est de 1,1 à 1,5 µm, c'est la bactérie la plus impliquée dans les infections aiguës d'appareil urinaire, elle provoque également les diarrhées d'été, diarrhée infantile et les intoxications alimentaires (Percival, 2004).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

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

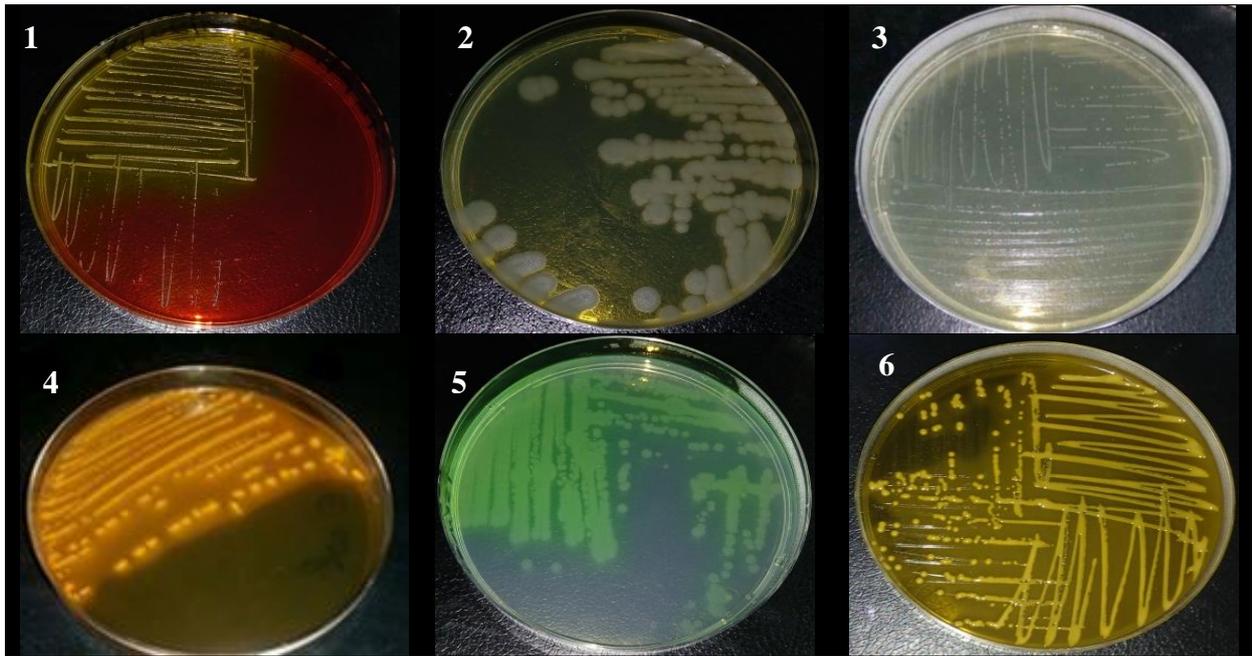
*P. aeruginosa* peut être impliquée dans des infections communautaires et c'est l'une des bactéries les plus fréquemment isolées lors d'infections nosocomiales. À elle seule, elle représente environ 90% de tous les *Pseudomonas sp*, isolées au laboratoire. Cette espèce est responsable de 16% des cas de pneumonie nosocomiale, 12% des infections urinaires, 8 % des infections suites aux blessures chirurgicales (Van Delden et Iglewski, 1998).

### ***Klebsiella pneumoniae***

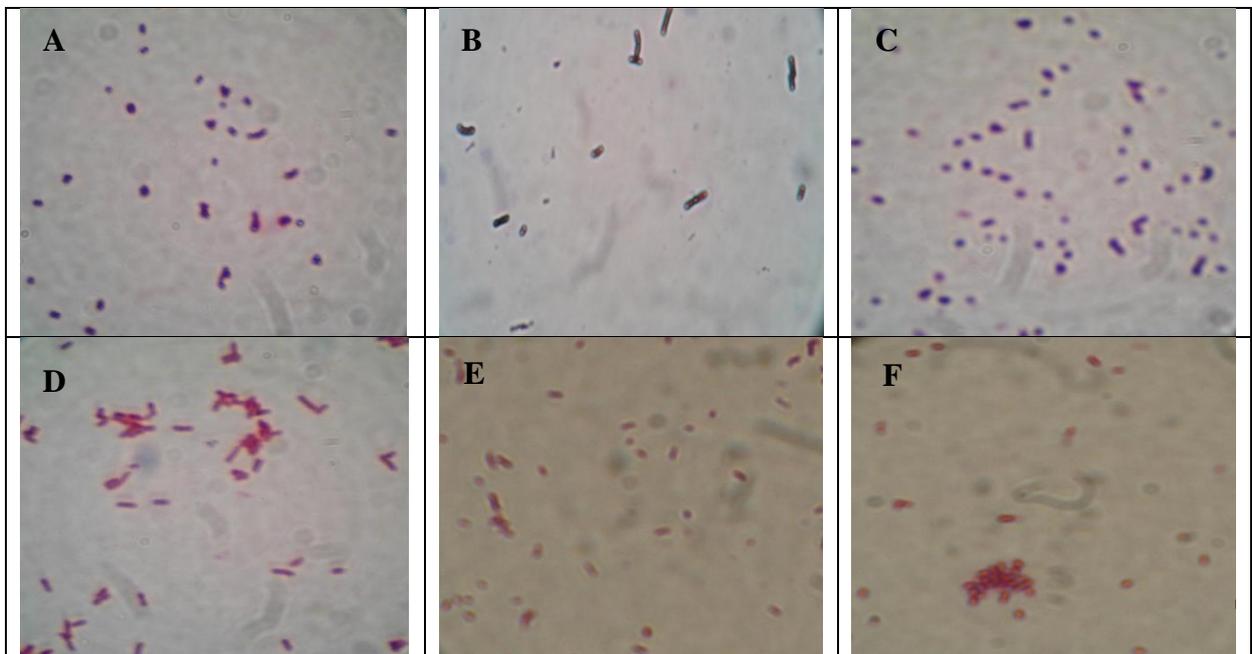
C'est l'espèce-type du genre *Klebsiella*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (la plus fréquente des bactéries à Gram négatif).

*K. pneumoniae* est une bactérie immobile, capsulée (sauf 6 % des souches de *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*). Se trouve notamment dans le sol, dans les eaux, et comme parasites, parfois pathogènes chez l'Homme et chez d'autres animaux. Elle est impliquée dans les cas de pneumonies nosocomiales (dont le taux de mortalité atteint souvent environ 50%) et qui cause jusqu'à 5% des infections urinaires nosocomiales (Singleton, 1999 ; Cano, 2009).

### Morphologie des bactéries tests



**Figure 15 :** Aspect macroscopique des bactéries tests : (1). *Staphylococcus aureus*, (2). *Bacillus subtilis*, (3). *Enterococcus faecalis*, (4). *Escherichia coli*, (5). *Pseudomonas aeruginosa*, (6). *Klebsiella pneumoniae*.



**Figure 16 :** Aspect microscopique des bactéries tests (X 100) : (A). *Staphylococcus aureus*, (B). *Bacillus subtilis*, (C). *Enterococcus faecalis*, (D). *Escherichia coli*, (E). *Pseudomonas aeruginosa*, (F). *Klebsiella pneumoniae*.

*Productions  
scientifiques*

## ***Publications et Communications***

Les travaux réalisés ont été valorisés par deux publications dans des revues internationales impactées, et des communications dans différents congrès.

### ***Publications***

-**Bramki Amina, Ghorri Sana, Jaouani Atef, Dehimat Laid and Kacem Chaouche Noreddine.** Antibacterial activity of *Aspergillus* isolated from different Algerian ecosystems. A.J.B. 2017. Vol. 16(32), pp. 1699-1704.

-**Bramki Amina, Frahtia Meriem, Jaouani Atef, Dehimat Laid and Kacem Chaouche Noreddine.** Extraction and preliminary Study of antibacterial compounds of three species of *Aspergillus* genus. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. 2019. Vol. 27 (2) : 26-34

### ***Communications internationales***

- **Bramki Amina, Dehimat Laid et Kacem Chaouche Noreddine.** Isolement et identification morphologique des moisissures, à partir d'un sol thermal de hammam Teleghma, Mila. 26<sup>ème</sup> Forum des Sciences Biologiques et de Biotechnologie, Mars 2015. Tunisie.

- **Bramki Amina, Ghorri Sana, Jaouani Atef, Dehimat Laid et Kacem Chaouche Noreddine.** Comparaison entre la flore fongique isolée à partir de différents sols algériens. Séminaire International des Biotechnologies (SIBC), Octobre 2015. Constantine, Algérie.

- **Bramki Amina, Dehimat Laid and Kacem Chaouche Noreddine.** Chromatographic separations of secondary metabolites of two strains of *Aspergillus fumigatus*. The 1<sup>st</sup> International Conference Microbial Ecology, Décembre 2015. Setif, Algeria.

- **Bramki Amina, Ghorri Sana, Dehimat Laid et Kacem Chaouche Noreddine.** Etude de l'activité antibactérienne des souches du genre *Aspergillus*. 1<sup>er</sup> Symposium International sur la Recherche Antimicrobienne (ISAR2018), Mai 2018. Khemis Miliana, Algérie.

<p><b>Nom :</b> BRAMKI</p> <p><b>Prénom :</b> Amina</p>	<p><b>Date de soutenance :</b> 22/07/2019</p>
<p><b>Thème :</b> Isolement et identification de souches d'<i>Aspergillus</i> de différents écosystèmes productrices de substances à activité antibactérienne et caractérisation partielle des molécules élaborées.</p>	
<p>Dans le but de découvrir de nouvelles molécules antibiotiques, l'activité antibactérienne de dix espèces fongiques du genre <i>Aspergillus</i> isolées à partir des sols prélevés d'écosystèmes particuliers (Laghouat et Teleghma) a été recherchée vis-à-vis de six souches bactériennes dont trois à coloration Gram + et trois à coloration Gram-. Les résultats de la mise en évidence par différentes techniques (cylindres, disques et puits) nous ont permis de sélectionner pour la suite de notre travail trois espèces fongiques (<i>A. quadrilineatus</i>, <i>A. niveus</i> et <i>A. wentii</i>) qui présentent un effet antibactérien considérable, et qui ne sont pas bien développées par les chercheurs sur le volet des métabolites secondaires à activité antibactérienne. Afin d'optimiser les conditions d'extraction des molécules bioactives de ces souches, cinq solvants de polarités différentes ont été testés, dont le chloroforme s'est avéré être le meilleur solvant. Après la sélection de ce dernier, quatre milieux de culture à diverses compositions ont été utilisés pour déterminer le milieu le plus adéquat à la production des antibiotiques. Les résultats montrent que la nature des composants de ces milieux (en source de carbone, d'azote, et source minérale) influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les mycètes. Par ailleurs, l'étude de la stabilité des molécules bioactives révèle que la majorité des extraits actifs gardent leur activité après le traitement thermique (jusqu'à 100°C) et l'exposition à la lumière. En supplément, la séparation des molécules antibactériennes par les techniques chromatographiques nous a permis de sélectionner une fraction active. Après l'analyse de cette dernière par UPLC-MS, 24 pics correspondant à 24 molécules ont été révélés avec détermination de leurs caractéristiques chimiques : rapports m/z, formules, temps de rétention et intensités.</p>	
<p><b>Mots clés :</b> <i>Aspergillus</i>, écosystèmes particuliers, activité antibactérienne, molécules bioactives.</p>	
<p><b>Laboratoire de recherche:</b> Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne.</p>	
<p>Président : Mr. BENSEGUENI A. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine 1.</p> <p>Directeur de thèse : Mr. DEHIMAT L. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine 1.</p> <p>Examineurs : Mr. HAMIDECHI A. Prof. Université des Frères Mentouri. Constantine 1.</p> <p>Mr. SOUMATI B. Prof. Université de Badji Mokhtar. Annaba.</p>	