

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université Des frères Mentouri–Constantine 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Microbiologie



N° d'ordre : 38/DS/2020  
N° de série : 01/MB/2020

### *Thèse*

Présentée en vue de l'obtention  
du diplôme de Doctorat en sciences  
Option : Biochimie microbienne  
Par: SAKHRI Afaf

### *Thème*

**Exploitation et caractérisation des substances  
bioactives sécrétées par une souche  
d'*Aspergillus sp.***

Soutenue le : 07 Juillet 2020

Devant le jury

Président de jury :	Mr. HAMIDECHI M. A.	Pr. Univ. Frères Mentouri, Constantine
Directeur de thèse :	Mr. KACEM CHAUCHE N.	Pr. Univ. Frères Mentouri, Constantine
Examineurs :	Mr. HARZELLAH D.	Pr. Univ. Ferhat Abbas, Sétif
	Mr. RIBA A.	Pr. Univ. M'Hamed Bougara, Boumerdes
	Mr. SIFOUR M.	Pr. Univ. Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel
	Mme. BAHRI F.	M.C.A. Univ. Frères Mentouri, Constantine

Année universitaire : 2019/2020



## Remerciements

En premier lieu, je remercie **DIEU** tout puissant de m'avoir donnée la force et le courage durant toute cette période afin que je puisse arriver à ce stade...

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), université des frères Mentouri, Constantine-1 et au laboratoire de Chimie alimentaire, université de Federico II, Naples, Italie.

Mes sincères remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur **Kacem Chaouche Noreddine**, Professeur à l'université des frères Mentouri (Constantine) et Directeur du LaMyBAM. Monsieur, je n'arrive pas à trouver de mots suffisamment forts pour exprimer la reconnaissance que j'ai à votre égard. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance dès le tout début et de m'avoir offert l'opportunité de rejoindre votre équipe. Merci de m'avoir accepté de me former à la mycologie et de m'avoir encadré, suivi et guidé durant toutes ces années. Vos conseils et votre gentillesse m'ont été considérablement précieux. Vous m'avez toujours réservé un bon accueil malgré vos obligations professionnelles. Vos grandes qualités scientifiques et humaines ont été durant ces années passées une aide exceptionnelle et seront toujours pour moi un exemple. Merci Monsieur d'avoir tout fait pour que cette thèse soit une réussite.

Je remercie profondément Monsieur **Antonello Santini**, Professeur à l'université de Federico II (Italie), de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de chimie alimentaire et de m'avoir assuré toutes les conditions agréables pour la réalisation d'une bonne partie de ma thèse.


J'exprime ma profonde reconnaissance à Monsieur, **Hamidechi M.A.** Professeur à l'université des frères Mentouri (Constantine) pour l'honneur qu'il m'a fait d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Je tiens à remercier vivement les membres du jury, Monsieur **Harzellah D.** Professeur à l'université de Ferhat Abbes (Sétif), Monsieur **Riba A.** Professeur à l'université de M'Hamed Bougara (Boumerdes), Monsieur **Sifour M.** Professeur à l'université Mohamed Seddik Ben Yahia (Jijel), ainsi que Madame **Bahri F.** Maître de conférences A à l'université des frères Mentouri (Constantine) qui m'ont fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail et de l'évaluer.

J'exprime toute ma reconnaissance et mes sincères remerciements à Madame **Maria Rosaria Catania**, Professeur à la faculté de médecine (Naples), pour l'aide précieuse qui m'a accordé.

Un grand merci également à Monsieur **Alberto Rietini**, Professeur au département de pharmacie (Naples) ainsi que son équipe qu'ils m'ont été d'une grande aide pour réaliser les analyses LC-MS/MS.

Je voudrais remercier les Professeurs Madame **Ermenegilda Parrilli** et Madame **Maria Luisa Tutino** ainsi que leur équipe du laboratoire de microbiology (département des sciences

A decorative border of arrows, each with a black and white striped tail and a dotted trail, surrounds the text on all four sides.

*chimiques, Naples) pour leur collaboration et m'avoir permis d'utiliser certains de leurs appareils pour réaliser certaines fermentations.*

*Je remercie également toute l'équipe du LaMyBAM qui a participé à la bonne humeur du labo : Asma, Hamida, Mounia, Mounira, Hadjer, Radia, Insaf et Imène.*

*Un grand merci également à toute l'équipe du laboratoire de chimie alimentaire (Naples) qui m'a assuré toutes les conditions agréables pour la réalisation de mon travail. Merci : Anna, Donato, Julia, Luigi, Maria, Silvia, ....*

*Un merci tout particulier à ma famille, à mes Parents pour m'avoir donné l'envie et les moyens de faire ce travail et pour m'avoir soutenue pendant ceci. Maman, Papa merci pour votre patience, votre affection et votre gentillesse sans limite. A mes sœurs qui m'ont beaucoup aidé pour l'accomplissement de ce travail. Merci pour votre soutien sans faille que vous m'avez toujours apporté aussi bien dans les moments difficiles que radieux. Un immense merci à mon frère pour le soutien qui m'a apporté surtout au cours de ces mois de rédaction.*

*Merci à tous ceux qui ont fait de ces années une aventure agréable et pleine de très bons souvenirs !!!!*

# *Table des matières*

<b>Listes des figures</b>	
<b>Liste des tableaux</b>	
<b>Liste des abréviations</b>	
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>1- Revue bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1- Substances naturelles bioactives</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2- Substances bioactives d'origine fongique</b> .....	<b>5</b>
1.2.1- Généralités sur les champignons.....	<b>5</b>
1.2.2- Métabolites secondaires fongique.....	<b>8</b>
1.2.2.1- Les polycétides.....	<b>9</b>
1.2.2.2- Les terpènes.....	<b>10</b>
1.2.2.3- Les alcaloïdes.....	<b>11</b>
1.2.2.4- Les peptides non ribosomiques.....	<b>11</b>
1.2.3- L'ère des médicaments fongiques.....	<b>12</b>
1.2.4- Les <i>Aspergillus</i> .....	<b>13</b>
1.2.4.1- Généralités.....	<b>13</b>
1.2.4.2- Importance économique et médicale des <i>Aspergillus spp.</i> .....	<b>15</b>
<b>1.3- Les antibiotiques</b> .....	<b>16</b>
1.3.1- classification des antibiotiques.....	<b>16</b>
1.3.2- Résistance aux antibiotiques .....	<b>17</b>
1.3.2.1- Résistance naturelle.....	<b>17</b>
1.3.2.2- Résistance acquise.....	<b>18</b>
<b>1.4- Les antifongiques</b> .....	<b>19</b>
<b>1.5- Le pouvoir antioxydant</b> .....	<b>21</b>
1.5.1- Les radicaux libres oxygénés.....	<b>21</b>
1.5.1.1- Classes des radicaux libres oxygénés.....	<b>21</b>
1.5.1.2- Production des radicaux libres oxygénés.....	<b>22</b>
1.5.1.3- Action néfaste des radicaux libres oxygénés.....	<b>24</b>
✓ Oxydation des lipides.....	<b>24</b>
✓ Oxydation des protéines.....	<b>25</b>
✓ Oxydation de l'ADN.....	<b>25</b>
1.5.2- Les Antioxydants.....	<b>25</b>
<b>2- Matériel et méthodes</b> .....	<b>27</b>

<b>2.1- Echantillonnage.....</b>	<b>27</b>
<b>2.2- Isolement, purification et caractérisation des <i>Aspergillus</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>2.3- Sélection d'isolat producteur de substances antimicrobiennes.....</b>	<b>28</b>
2.3.1- Microorganismes test.....	28
2.3.2- Technique des cylindres d'agar.....	28
<b>2.4- Identification de la souche sélectionnée.....</b>	<b>29</b>
2.4.1- Identification macroscopique.....	29
2.4.2- Identification microscopique.....	29
2.4.3- Identification moléculaire.....	29
<b>2.5- Production des substances bioactives par la souche sélectionnée.....</b>	<b>30</b>
2.5.1- Préparation de la suspension sporale.....	30
2.5.2- Choix du milieu de fermentation.....	30
2.5.3- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes par la souche sélectionnée.....	31
2.5.4- Production et extraction des substances bioactives.....	31
<b>2.6- Evaluation de l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>32</b>
2.6.1- Microorganismes test .....	32
2.6.2- Détermination du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose.....	32
2.6.3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	33
<b>2.7- Evaluation de l'activité antioxydante.....</b>	<b>34</b>
2.7.1- Test DPPH.....	34
2.7.2- Test ABTS.....	35
2.7.3- Pouvoir réducteur de Fer.....	35
2.7.4- Dosage des polyphénols totaux.....	36
<b>2.8- Analyses statistiques.....</b>	<b>36</b>
<b>2.9- Identification des métabolites par UHPLC- HRMS/MS.....</b>	<b>37</b>
<b>3- Résultats.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1- Isolement, purification et identification des <i>Aspergillus</i>.....</b>	<b>39</b>

<b>3.2- Sélection d'isolat producteur de substances antimicrobiennes.....</b>	<b>42</b>
<b>3.3-Identification de la souche fongique sélectionnée.....</b>	<b>43</b>
3.3.1- Identification macroscopique.....	43
3.3.2- Identification microscopique.....	43
3.3.3- Identification moléculaire.....	45
<b>3.4- Production des substances bioactives par <i>Aspergillus creber</i>.....</b>	<b>46</b>
3.4.1- Choix du milieu de fermentation.....	46
3.4.2- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes par <i>Aspergillus creber</i> .....	47
<b>3.5- Production et extraction des substances bioactives.....</b>	<b>48</b>
<b>3.6- Evaluation de l'activité antimicrobienne.....</b>	<b>49</b>
3.6.1- Détermination du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose.....	49
3.6.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice.....	51
<b>3.7- Evaluation de l'activité antioxydante.....</b>	<b>52</b>
3.7.1- Test DPPH.....	53
3.7.2- Test ABTS.....	54
3.7.3- CI50 sur les radicaux DPPH <sup>*</sup> et ABTS <sup>+</sup> .....	54
3.7.4- Pouvoir réducteur du fer.....	55
3.7.5- Corrélation entre les tests DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur de fer.....	56
3.7.6- Dosage des polyphénols totaux.....	57
<b>3.8- Identification des métabolites par UHPLC- HRMS/MS.....</b>	<b>58</b>
3.8.1- Identification du composé C1 .....	61
3.8.2- Identification du composé C2.....	61
3.8.3- Identification du composé C3.....	62
3.8.4- Identification du composé C4.....	62
3.8.5- Identification du composé C5.....	63
3.8.6- Identification du composé C6.....	63
3.8.7- Identification du composé C7.....	64
3.8.8- Identification du composé C8.....	64
3.8.9- Identification du composé C9.....	65

3.8.10- Identification du composé C10.....	65
<b>4- Discussion.....</b>	<b>67</b>
<b>5- Conclusion et perspectives.....</b>	<b>79</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>82</b>
<b>ملخص.....</b>	<b>83</b>
<b>Références.....</b>	<b>84</b>
<b>Annexes</b>	

## *Liste des figures*

<b>Figure 1</b> Composants de la paroi fongique.....	<b>5</b>
<b>Figure 2</b> Les différents types de spores asexuées.....	<b>6</b>
<b>Figure 3</b> Classification et répartition de la diversité des champignons.....	<b>7</b>
<b>Figure 4</b> Formation de la chaîne de polycétide.....	<b>9</b>
<b>Figure 5</b> Voie métabolique de la synthèse des terpènes chez les champignons.....	<b>10</b>
<b>Figure 6</b> Morphologie des têtes aspergillaires.....	<b>15</b>
<b>Figure 7</b> Sites d'action des antibiotiques sur la bactérie .....	<b>17</b>
<b>Figure 8</b> Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	<b>18</b>
<b>Figure 9</b> Sites d'action des antifongiques sur la cellule fongique.....	<b>20</b>
<b>Figure 10</b> Sites de production intracellulaire des espèces réactives oxygénées.....	<b>23</b>
<b>Figure 11</b> Maladies liées au stress oxydant.....	<b>24</b>
<b>Figure 12</b> Action des antioxydants au cours du métabolisme des espèces réactives oxygénées.....	<b>26</b>
<b>Figure 13</b> Activité antimicrobienne de l'isolat AS1 vis-à-vis de : (a) <i>Staphylococcus epidermidis</i> , (b) <i>Candida albicans</i> , (c) <i>Staphylococcus aureus</i> , (d) <i>Chryseobacterium sp...</i>	<b>42</b>
<b>Figure 14</b> Aspect microscopique de la souche sélectionnée AS1 sous microscope optique...	<b>45</b>
<b>Figure 15</b> Séquence finale des régions ITS et LSU combinées.....	<b>45</b>
<b>Figure 16</b> Séquence finale d'une partie du gène codant pour la calmoduline .....	<b>46</b>
<b>Figure 17</b> Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'isolat <i>Aspergillus creber</i> produite sur différents milieux de culture.....	<b>47</b>
<b>Figure 18</b> Cinétique de croissance et de la production des substances antimicrobiennes.....	<b>48</b>
<b>Figure 19</b> Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la culture d' <i>Aspergillus creber</i> vis-à-vis des microorganismes pathogènes.....	<b>51</b>
<b>Figure 20</b> Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH' en fonction des différentes concentrations de l'extrait d' <i>A. creber</i> et de l'acide ascorbique .....	<b>53</b>



<b>Figure 21</b> Pourcentages d'inhibition du radical ABTS <sup>•+</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait d' <i>A. creber</i> et de l'acide ascorbique.....	<b>54</b>
<b>Figure 22</b> Valeurs de CI50 de l'extrait d' <i>A. creber</i> et de l'acide ascorbique par la méthode de piégeage du radical DPPH <sup>•</sup> et celle du radical ABTS <sup>•+</sup> .....	<b>55</b>
<b>Figure 23</b> Pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations de l'extrait d' <i>A. creber</i> et de l'acide ascorbique.....	<b>56</b>
<b>Figure 24</b> Corrélacion entre le test DPPH et ABTS.....	<b>56</b>
<b>Figure 25</b> Corrélacion entre le test DPPH et le pouvoir réducteur de fer.....	<b>56</b>
<b>Figure 26</b> Corrélacion entre le test ABTS et le pouvoir réducteur du fer.....	<b>57</b>
<b>Figure 27</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	<b>57</b>
<b>Figure 28</b> Chromatogramme de courants ioniques extraits (XIC) les plus abondants de l'extrait d'acétate d'éthyle d' <i>A. creber</i> par la technique de UHPLC-HRMS.....	<b>58</b>
<b>Figure 29</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C1.....	<b>61</b>
<b>Figure 30</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C2.....	<b>61</b>
<b>Figure 31</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C3.....	<b>62</b>
<b>Figure 32</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C4.....	<b>62</b>
<b>Figure 33</b> Spectre de masse MS en mode négatif du composé C5.....	<b>63</b>
<b>Figure 34</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C6.....	<b>63</b>
<b>Figure 35</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C7.....	<b>64</b>
<b>Figure 36</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C8.....	<b>64</b>
<b>Figure 37</b> Spectre de masse MS en mode positif du composé C9.....	<b>65</b>
<b>Figure 38</b> Spectre de masse MS en mode négatif du composé C10.....	<b>65</b>

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1</b> Médicaments et produits d'origine fongique.....	<b>13</b>
<b>Tableau 2</b> Origine des espèces réactives oxygénées.....	<b>22</b>
<b>Tableau 3</b> Gradient d'éluion pour l'analyse de l'extrait de la souche sélectionnée.....	<b>37</b>
<b>Tableau 4</b> Isolats fongiques obtenus à partir des cinq échantillons de grains de maïs analysés.....	<b>40</b>
<b>Tableau 5</b> Aspect morphologique des isolats d' <i>Aspergillus</i> obtenus à partir de Maïs.....	<b>41</b>
<b>Tableau 6</b> Aspect macroscopique de la souche sélectionnée (AS1) après 7 jours d'incubation à 25°C.....	<b>44</b>
<b>Tableau 7</b> Diamètres de zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle vis-à-vis des microorganismes pathogènes.....	<b>50</b>
<b>Tableau 8</b> CMI de l'extrait d'acétate d'éthyle d' <i>A. creber</i> vis-à-vis les microorganismes sensibles.....	<b>52</b>
<b>Tableau 9</b> Métabolites d' <i>Aspergillus creber</i> identifiés par UHPLC-HRMS/MS.....	<b>60</b>

## *Liste des abréviations*

AB : Antibiotique

ABTS<sup>•+</sup> : Radical acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique

ARNm : Acide ribonucléique messager

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique

CALM : Calmoduline

CMI : Concentration minimale inhibitrice

CYA : Czapek Yeast extract Agar

CYB : Czapeck Yeast extract Broth

DMAPP : Diméthylalyl diphosphate

DPPH<sup>•</sup> : Radical 2,2- diphényl-1-picrylhydrazyl

EAc : Extrait d'acétate d'éthyle

ERO : Espèces réactives oxygénées

FDA: Food and Drug Administration

G25N : 25% Glycerol Nitrate Agar

GN : Gélose nutritive

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peroxyde d'hydrogène

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

IPP : Isopentényldiphosphate

ITS: Internal Transcribed Spacer

LSU : Large Subunit

MEA : Malt Extract Agar

MHA: Mueller Hinton Agar

MVA : Mevalonic Acide

MEB : Malt Extrat Broth

NO<sup>•</sup>: Monoxyde d'azote

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : Radical superoxyde

\*OH : Radical hydroxyle

ONOO<sup>-</sup> : Peroxynitrite

PLP : Protéines liant les pénicillines

PN : Produits Naturels

PDA : Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

PT : Polyphénols totaux

S : Svedberg

SABL : *Staphylococcus aureus* producteur de bêta-lactamase

SDA : Sabouraud Dextrose Agar

SDB : Sabouraud Dextrose Broth

SERM : *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline

STC : Stérigmatocystine

tr : Temps de rétention

UFC : Unité formant colonie

YPG : Yeast extract Peptone Glucose Agar

UHPLC : Ultra High Performance Liquid Chromatography

# Introduction

## **Introduction**

Depuis le début du 21<sup>ème</sup> siècle, le nombre de nouveaux antibiotiques autorisés sur le marché demeure faible et ne cesse de diminuer alors qu'en parallèle, le nombre de souches bactériennes résistantes à un ou à plusieurs antibiotiques augmente (Davies et Davies, 2010; Penesyan et *al.*, 2015; Marques et *al.*, 2018). L'incidence des infections fongiques ne cesse de croître en raison principalement du nombre accru de patients immunodéprimés tel que les personnes atteintes du cancer, infectées par le virus VIH, etc. (Lass-Flörl, 2008; Webb et *al.*, 2018; Friedman et Schwartz, 2019). De nombreuses maladies à fort taux de mortalité restent encore sans traitement. De ce fait, les travaux de recherche, ces dernières années, se sont orientés vers la recherche de nouvelles substances, biologiquement, plus actives, à des effets secondaires mineurs et respectueux de l'environnement.

La nature est le meilleur candidat à explorer pour la recherche de ces nouvelles molécules. Avec des milliers d'espèces de microorganismes et de plantes, la nature est la source d'une formidable variété et d'un nombre incroyable de molécules ayant des propriétés thérapeutiques. Vue l'existence de nombreuses ressources inexplorées provenant de la nature, l'espoir de découvrir de nouveaux organismes ou des organismes moins étudiés et, par conséquent, la découverte éventuelle de nouveaux produits naturels (PN) bioactifs persiste (Aly et *al.* 2011).

L'isolement et la caractérisation des PN connus généralement sous l'appellation de « substances bioactives » constituent un sujet de recherche d'actualité. Vue la diversité de leurs structures chimiques et leurs activités biologiques, les PN sont considérés comme une voie intéressante pour la découverte de nouveaux médicaments (Newman et Cragg, 2016; Wang, 2017). Entre 1981 et 2014, près de 51% des nouveaux médicaments approuvés étaient d'origine naturelle ou dérivés de composés naturels, ce qui représente 65% des molécules antibactériennes et 73% des composés anticancéreux approuvés (Chassagne et *al.*, 2019).

Les champignons filamenteux constituent un des plus grands groupes de populations microbiennes qui se caractérisent par leur diversité. Ces organismes jouent un rôle important dans la vie humaine, que ce soit positif ou négatif, par la production des divers types de produits naturels bioactifs nommés métabolites secondaires (Gerke et Braus, 2014; Wang, 2017).

La recherche de substances bioactives à partir des champignons a débuté en 1928 par Alexander Fleming et sa découverte de la pénicilline produit par la moisissure *Penicillium notatum* (Kerzaon, 2009). De nos jours, les médicaments dérivés des champignons ont contribué de manière significative au processus de découverte de médicaments. Sur les 37 500 composés biologiquement actifs obtenus à partir de microorganismes, environ 53% sont produits par des champignons (Chassagne et *al.*, 2019). Outre les antibiotiques, plusieurs métabolites secondaires fongiques sont exploités dans l'industrie pharmaceutique tel que les statines hypocholestérolémiantes (la lovastatine), les antifongiques (la griséofulvine) et les immunosuppresseurs (l'acide mycophénolique) (Shwab et Keller, 2008; Nielson et Nielson, 2017).

Les espèces du genre *Aspergillus* restent les producteurs les plus puissants des composés bioactifs d'origine fongique (Dewi et *al.* 2012; Bai et *al.* 2014). Ils sont à l'origine d'environ 18 % des produits naturels d'origine fongique (Chassagne et *al.*, 2019). L'importance pharmacologique des métabolites produits par les *Aspergillus* ne cesse d'augmenter, en raison de leurs diverses activités biologiques (antibactérienne, antifongique, antioxydante, anticancéreuse etc.) et plusieurs espèces sont utilisées à l'échelle industrielle.

En Algérie, la majorité des travaux de recherches effectués sur les *Aspergillus spp.* sont axés principalement sur la recherche de l'effet néfaste de ses microorganismes et leurs métabolites toxiques (mycotoxines) (Riba et *al.*, 2008, 2010; Guezlane- Tebibel et *al.*, 2013, Azzoune et *al.*, 2016; Ait-Mimoune et *al.*, 2018 ; Bouti et *al.*, 2019; Mimoune et *al.*, 2020) à l'exception de quelques recherches qui se sont orientées vers l'étude de leurs métabolites à activité antimicrobienne (Youcef Ali, 2014; Amina et *al.*, 2017) ou leur capacité à produire des enzymes extracellulaires d'intérêt agroalimentaire (Kacem-Chaouche et *al.*, 2005, 2013; Belmessikh et *al.*, 2013).

De ce fait, les travaux de cette thèse revêt comme objectif la sélection d'une espèce appartenant au genre *Aspergillus* peu étudiée afin d'évaluer ses activités biologiques en particulier, ses capacités antibactérienne, anti-Candida et antioxydante et de caractériser les molécules qui sont potentiellement responsables de ces activités.

Pour ce faire, la première partie est consacrée à une synthèse bibliographique portée sur trois aspects : le premier est un aperçu sur les substances naturelles bioactives, le deuxième comporte des données générales sur la production des substances naturelles bioactives par les

champignons filamenteux et les substances à activité antibiotique, antifongique et antioxydante et le troisième est consacré à l'étude des *Aspergillus*.

Divisé en plusieurs parties, la seconde partie présente la méthodologie développée pour réaliser ce travail. Elle s'est orientée dans un premier temps sur la sélection d'une souche d'*Aspergillus* qui a un effet antagoniste sur des bactéries et des levures pathogènes et son identification par l'utilisation des techniques morphologiques et moléculaires. Elle se poursuit par une partie développée sur la production et l'extraction des métabolites sécrétés par la souche sélectionnée, l'extrait a été soumis à des tests capables de mettre en évidence les activités antibactériennes, anti-*Candida* et antioxydantes de ladite souche. Enfin, la dernière partie est dédiée à l'analyse approfondie par chromatographie des métabolites secondaires rencontrés dans l'extrait. En effet, la technique de chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS/MS) a été utilisée afin d'analyser plus précisément les résultats d'activités biologiques obtenus et de lier ces activités à la composition de l'extrait.

La troisième partie présente les résultats obtenus au cours de ce travail. L'ensemble des résultats est discuté par comparaison aux travaux publiés.

Enfin, le manuscrit s'achève par une conclusion générale, ainsi que les différentes perspectives qu'apporte ce travail tant au niveau de la recherche qu'au niveau des applications industrielles et médicales.



# Revue bibliographique

# **1- Revue bibliographique**

## **1.1- Substances naturelles bioactives**

En étymologie, le terme bioactif vient du grec *bios* "la vie", et du latin *activus* qui signifie "dynamique, plein d'énergie ou inclue une activité". Dans un sens scientifique, le mot "bioactif" est un terme alternatif pour "biologiquement actif". Une substance bioactive est une substance qui a un effet direct sur un organisme vivant (Guaadaoui et *al.*, 2014).

Les substances naturelles bioactives se réfèrent généralement aux métabolites secondaires produits principalement par des plantes et des micro-organismes, notamment des champignons et des bactéries, bien que certains proviennent d'animaux (Gerke et Braus, 2014; Díaz-Godínez, 2015). Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites secondaires sont des molécules de faible poids moléculaire et non indispensables à la survie de l'organisme producteur (Netzker et *al.*, 2015). Ils présentent différentes variétés de composés structurellement et fonctionnellement divers. Cette diversité les a amenés à être biologiquement actifs contre diverses maladies, ce qui les rend importants et précieux pour l'être humain (Khan et *al.*, 2014). Dans ce travail, les termes substances naturelles bioactives, produits naturels et métabolites secondaires seront utilisés de manière interchangeable.

Aujourd'hui, les substances naturelles bioactives représentent une part importante des molécules thérapeutiques utilisées en médecine. Entre 1981 et 2002, 535 sur 877 PN isolés dans le monde entier ont été transformés en médicaments (Khan et *al.*, 2014). Ces PN continueront d'être la principale source pour l'élaboration de nouveaux médicaments à cause de leur diversité structurelle incomparable, leurs tailles relativement petites et leurs propriétés médicamenteuses, c'est-à-dire leur aptitude à être absorbés et métabolisés par l'organisme (Sticher, 2008; Harvey, 2000). Les PN peuvent être efficaces sous leur forme native et, par conséquent, contribuent directement au développement d'un médicament, être modifiés par transformation chimique (semi-synthétique) donnant naissance à de nombreux dérivés similaires à la molécule mère mais avec des propriétés biologiques plus intéressantes ou bien ils peuvent également servir de modèle pour le développement de molécules complètement synthétiques (Aly et *al.*, 2011; Newman et Cragg, 2016). Jusqu'en 2014, près de 51% des nouveaux médicaments approuvés étaient d'origine naturelle ou dérivés de composés naturels. Dans les domaines du cancer et des maladies infectieuses, 73% et 65% des nouveaux médicaments, respectivement, provenaient de sources naturelles (Chassagne et *al.*, 2019).

Comparés aux sources de produits naturels tels que les plantes et les animaux, les microorganismes constituent une source beaucoup plus facilement renouvelable et reproductible. Les nouvelles techniques du génie génétique facilement applicables sur les microorganismes font de produits microbiens la source la plus attrayante pour la découverte de médicaments à base de PN (Lam, 2007).

## 1.2- Substances bioactives d'origine fongique

### 1.2.1- Généralités sur les champignons

Les champignons, que l'on nomme également mycètes ou *Fungi*, sont des Eucaryotes qui peuvent être unicellulaires (levures) ou pluricellulaires (filamenteux), microscopiques (micromycètes) ou macroscopiques (macromycètes). Ils sont ubiquitaires et très répandus dans tous les écosystèmes terrestres et aquatiques (Khan et al., 2014). Plusieurs auteurs utilisent encore l'appellation *Fungi* toutefois, *Eumycota*, qui se traduit littéralement par «vrais champignons», est le terme taxonomiquement approprié (Després et al., 2012).

La structure cellulaire des champignons diffère de celle des plantes, notamment par l'absence de chloroplastes et par la composition de la paroi des cellules. Les champignons possèdent une paroi formée essentiellement de polysaccharides dont la chitine et les glucanes, de glycoprotéines et de mannoprotéines. La chitine donne à la paroi sa rigidité et sa résistance et avec les glucanes, elle joue un rôle dans la protection des champignons vis-à-vis des agressions du milieu extérieur, les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence alors que les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (Figure 1).

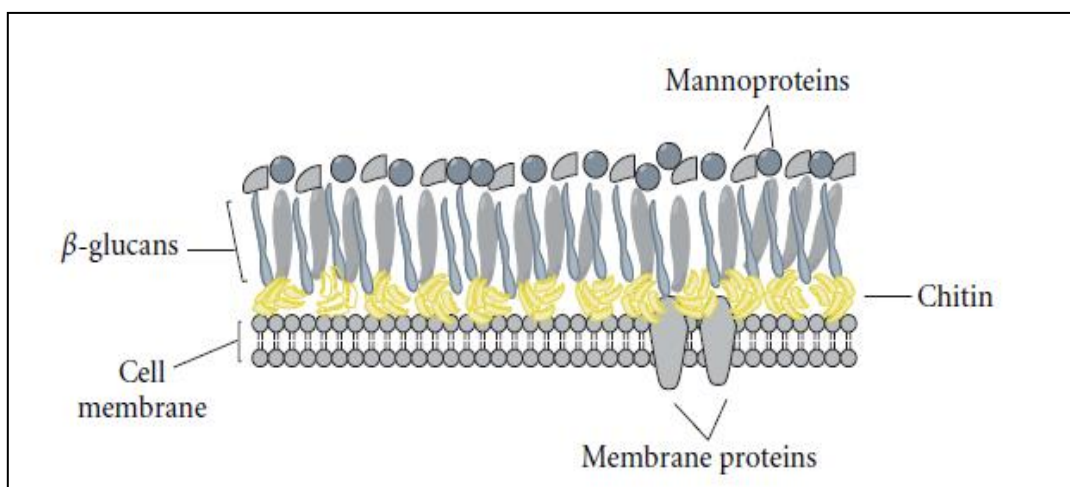
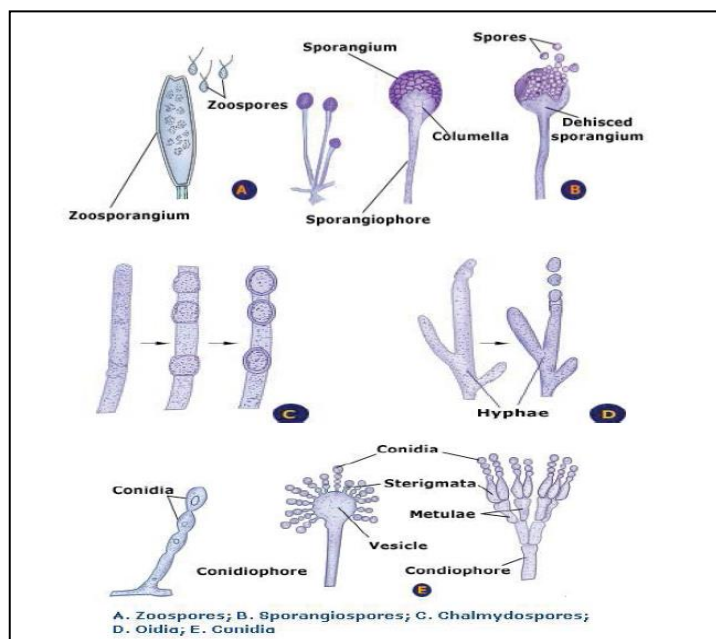


Figure 1 Composants de la paroi fongique (Vega et Kalkum, 2011)

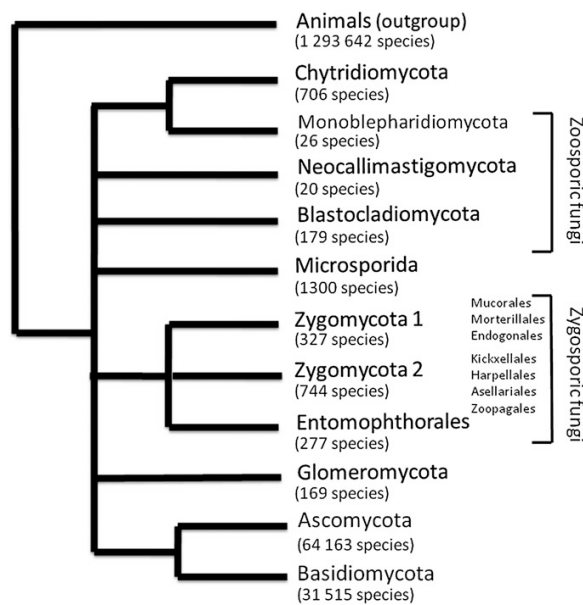
L'appareil végétatif des champignons, appelé le thalle, est constitué de filaments tubulaires ou hyphes habituellement ramifiés, l'ensemble des hyphes constitue un réseau souvent dense appelé mycélium. Ces hyphes qui peuvent être cloisonnés (septés) ou non (aseptés) ont pour fonction principale d'assurer la nutrition des champignons par absorption directe des nutriments indispensables à leur survie et à leur reproduction à partir du milieu par osmotrophie (Després et *al.*, 2012). Ces organismes qualifiés d'hétérotrophes se procurent leur matière organique de l'environnement selon trois modes : le saprophytisme (les champignons tirent leur énergie de la matière organique morte), le parasitisme (les champignons tirent leur énergie de la matière organique vivante aux dépens de l'hôte) et la symbiose (ils se développent grâce à leur association durable avec un autre organisme vivant comme les lichens et les mycorhizes).

Une des principales caractéristiques des champignons filamenteux est leur reproduction, le cycle de vie des champignons comprend deux types de reproduction ; la reproduction sexuée correspondant à la forme téléomorphe et la reproduction asexuée correspondant à la forme anamorphe. La voie asexuée la plus connue est la production des spores. Les spores peuvent parcourir de très longues distances dans l'air, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion considérable dans des environnements très différents de ceux de leur origine (Duran et *al.*, 2010). Les spores peuvent être le résultat de la fragmentation du mycélium. Elles peuvent aussi être produites de manière endogène, ou de manière exogène en continu à l'extrémité des structures spécialisées (Figure 2).



**Figure 2** Les différents types de spores asexuées (Abd El-Ghany et El-Sheikh, 2016)

En 1969, les champignons ont été séparés du règne végétal et classés dans un règne à part sous le nom de *Mycota* (Whittaker, 1969). Les classifications les plus récentes font apparaître les champignons, avec les animaux, dans le groupe des *Opisthokonta* au sein de l'Empire des Eucaryotes (Simpson et Roger 2002, 2004 ; Steenkamp et *al.*, 2005). La classification traditionnelle des champignons, basée sur des critères phénotypiques (type de thalle, le mode de reproduction, type de spores), a été supplantée par l'apparition des méthodes de biologie moléculaire. Suite à l'étude de Hibett et *al.*, (2007), basée sur des critères génotypiques, la classification des champignons a subi une révision et une modification. Selon cette étude, le règne des eumycètes, *Eumycota*, est regroupé en 1 sous-règne, 7 divisions et 10 sous-divisions. Le sous-règne *Dikarya* se divise en deux divisions, *Ascomycota* et *Basidiomycota*. Les autres divisions sont les *Glomeromycota*, les *Chytridiomycota*, les *Neocallimastigomycota*, les *Blastocladiomycota* et les *Microsporidiomycota*. Cette classification est toujours en évolution et en discussion (Figure3).



**Figure 3** Classification et répartition de la diversité des champignons (Blackwell, 2011).  
L'arbre phylogénétique est basé sur l'étude de Hibette et *al.*, 2007

Les champignons demeurent le règne le plus méconnu. Selon les modèles de prédiction de biodiversité, les champignons occupent le deuxième rang, après les insectes, parmi les règnes les plus diversifiés (Després et *al.*, 2012). Bien que des estimations récentes prédisent l'existence de près de cinq millions d'espèces fongiques (O'Brien et *al.*, 2005; Blackwell, 2011; Meyer et *al.*, 2016) l'estimation la plus largement acceptée se situe autour de 1,5

million espèces (Hawksworth, 2001, Kirk et *al.*, 2008, Blackwell, 2011). Peu importe le nombre réel de champignons, l'important est qu'ils sont considérés comme une extraordinaire ressource disponible pour les substances naturelles bioactives. A l'heure actuelle, près de 99 000 espèces fongiques ont été formellement décrites dans le dictionnaire des Fungi (Kirk et *al.*, 2008) dont 98% appartiennent au sous-règne Dikarya où les *Ascomycota* représente le plus grand groupe du règne *Eumycota* avec plus de 64 000 espèces (Figure3).

Dans l'équilibre naturel les champignons jouent un rôle fondamental dans les cycles de la matière vivante en dégradant les molécules organiques et en libérant du phosphore, de l'oxygène, de l'azote et du carbone dans l'atmosphère et le sol (Svahn, 2015). En outre, de leur importance géochimique l'impact économique généré par la biotechnologie fongique ne peut être sous-estimée. Les eumycètes, en particulier ceux appartenant aux *Ascomycota*, ont des applications industrielles tout à fait intéressantes par exemple : au sein de l'industrie agroalimentaire, certains champignons filamenteux sont utilisés en fromagerie (*Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*), ils peuvent également servir à la synthèse d'acides organiques comme l'acide citrique et l'acide gluconique (*Aspergillus niger*) (Gerke et Braus, 2014). Au sein de l'industrie pharmaceutique, certains champignons filamenteux sont utilisés pour la synthèse de médicaments notamment des antibiotiques, des vasodilatateurs, des immunosuppresseurs et des agents anticancéreux.

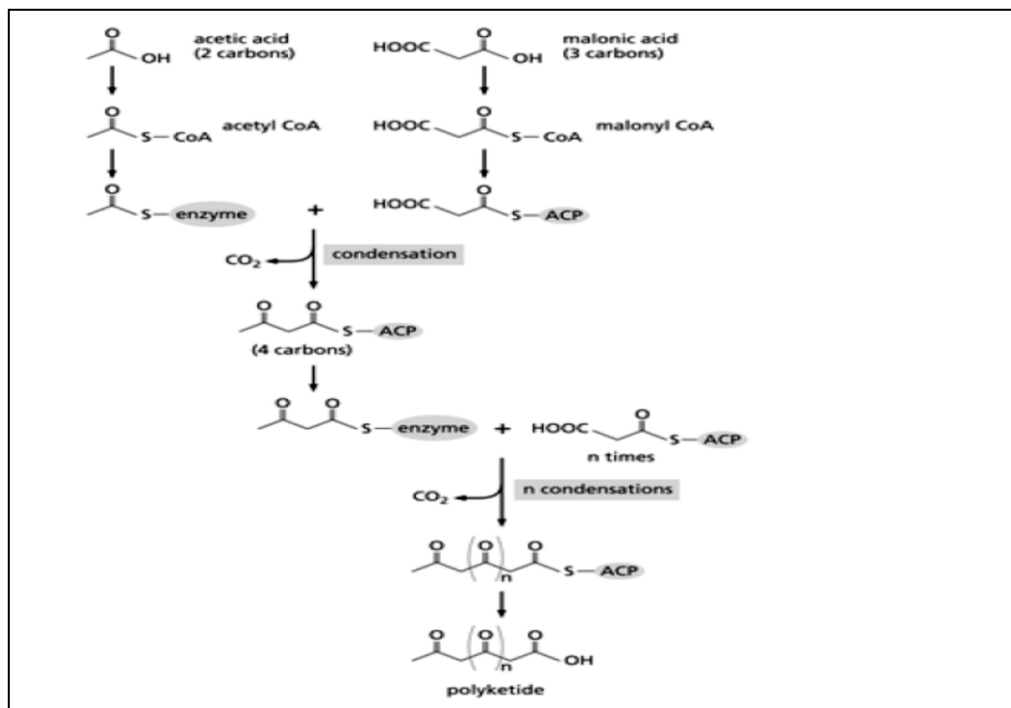
### **1.2.2- Métabolites secondaires fongique**

Les champignons filamenteux sont des organismes remarquables qui produisent facilement une vaste gamme de produits naturels, souvent appelés métabolites secondaires (Calvo et *al.*, 2002). Les métabolites secondaires fongiques sont définis comme des substances naturelles souvent bioactifs, de faible masse moléculaire et qui ne sont pas nécessaire à la survie du champignon producteur (Shwab et Keller, 2008; Coleman et *al.*, 2011; Gerke et Braus, 2014; Netzker et *al.*, 2015). Ils sont produits sous forme de familles de composés apparentés à des moments restreints du cycle de vie du champignon (Keller et *al.*, 2005).

Le métabolisme secondaire diffère du métabolisme primaire par la nature aléatoire de son activation, par la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Les classes chimiques les plus retrouvées sont les polycétides, les terpènes, les alcaloïdes et les peptides non ribosomiques (Chiang et *al.*, 2009).

### 1.2.2.1- Les polycétides

Le terme de polycétide désigne des composés dont la structure chimique possède une chaîne d'alternance de groupes cétone ( $>C=O$ ) et de groupes méthylène ( $-CH_2-$ ). La formation de la chaîne de carbones de la polycétone est le résultat de la condensation, tout d'abord, d'un acétyl-CoA (unité de départ) et d'un malonyl-CoA (unité d'extension), puis de la prolongation par condensation successive des groupements acyles dans un processus analogue à celui de la biosynthèse des acides gras (Figure 4). Chez les champignons, l'ensemble de ces réactions est catalysé par des polycétides synthases de type I (Smith, 2014). La chaîne ainsi produite après élongation peut être transformée par cyclisation, réduction ou méthylation et donne une grande famille de PN qui sont divers tant par leur structure: aromatiques (ex: tétracycline), macrolides (ex: rapamycine), polyéthers (ex: salinomycine) et polyenes (ex: amphotericine) que par leur fonction: des activités antibactériennes, antifongiques, antiparasitaires, antitumorales ou encore des propriétés agrochimiques (Shen et *al.*, 2000). Tout ceci rend les polycétides économiquement, cliniquement et industriellement les plus recherchés parmi de nombreuses molécules. Plusieurs polycétides fongiques sont exploités à l'industrie pharmaceutique comme la lovastatine utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie (Wang et *al.*, 2011 ; Wang, 2017) et la cyclosporine un agent immunosuppresseur. Néanmoins, certains polycétides fongiques sont toxiques (aflatoxines, ochratoxines, patuline, stérigmatocystine, etc.).

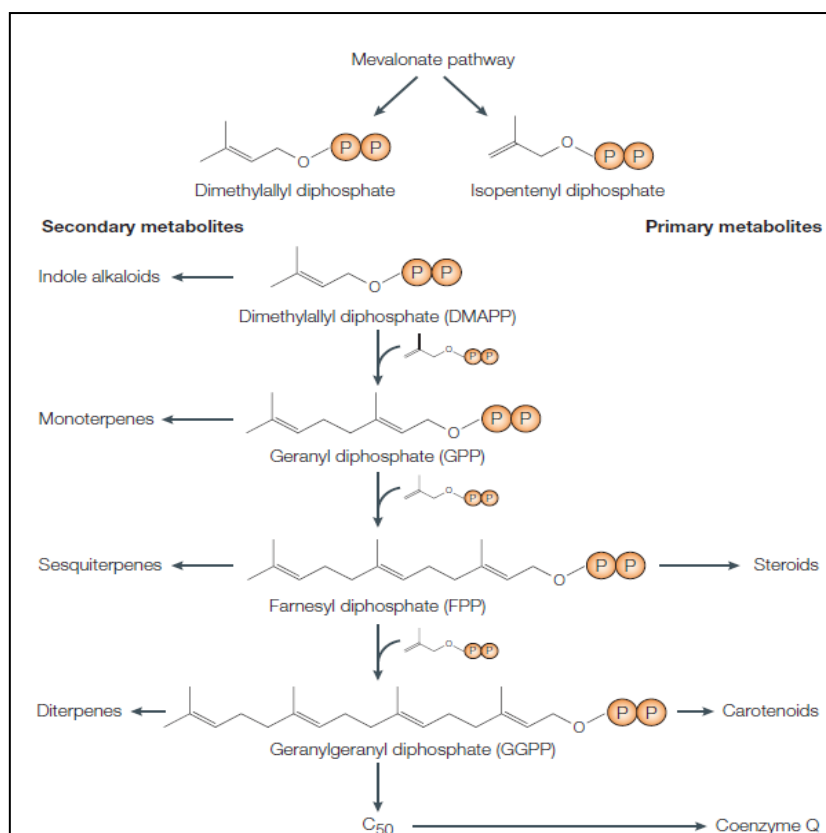


**Figure 4** Formation de la chaîne de polycétide

### 1.2.2.2- Les terpènes

Les terpènes sont des hydrocarbures naturels, de structure soit cyclique soit à chaîne ouverte, saturé ou insaturé. Tous les terpènes proviennent des précurseurs simples à 5 atomes de carbones, l'isopentényldiphosphate (IPP) et son isomère le diméthylalyl diphosphate (DMAPP). En fonction de l'organisme producteur, IPP et DMAPP sont synthétisés soit via la voie de l'acide mévalonique (MVA) soit via la voie du méthylérythritol phosphate (MEP). Pour les champignons la seule voie de biosynthèse des terpènes est la voie MVA. Ces deux composés sont associés pour former les différentes classes de terpènes. Les classes courantes de terpènes comprennent les monoterpènes qui sont générés à partir de géranyl pyrophosphate, les sesquiterpènes qui sont générés à partir de farnésyl pyrophosphate, les diterpènes et les caroténoïdes qui sont générés à partir de géranylgéranyl pyrophosphate (Figure 5).

Les champignons filamenteux synthétisent plusieurs terpènes importants, notamment les aristolochènes, les caroténoïdes, les gibbérellines, les indole-diterpènes et les trichothécènes (Keller et *al.*, 2005).



**Figure 5** Voie métabolique de la synthèse des terpènes chez les champignons (Keller et *al.*, 2005)



### **1.2.2.3- Les alcaloïdes**

Les alcaloïdes sont des substances naturelles et organiques qui contiennent au moins un atome d'azote dans leur structure chimique. L'atome d'azote dans les alcaloïdes provient, en général, d'un acide aminé dont la structure carbonée reste souvent intacte dans la structure finale de l'alcaloïde. Ils sont classés en 3 groupes : les alcaloïdes vrais (synthétisés à partir d'acides aminés), les proto-alcaloïdes (amines simples synthétisées à partir d'acides aminés) et les pseudo-alcaloïdes (non dérivés d'acides aminés) (Bruneton, 2009).

Les ascomycètes du genre *Claviceps* représentent la principale source productrice d'alcaloïdes fongique. L'une des voies de synthèses principales des alcaloïdes fongiques est celle qui vise à produire des alcaloïdes indoliques. Cette voie permet aux champignons de produire, à partir du tryptophane, des molécules d'intérêt thérapeutique majeur, par exemple l'ergométrine et l'ergotamine (dérivées de l'acide lysergique) qui sont employés depuis fort longtemps pour leur action sur le muscle utérin. Par leur action vasoconstrictrice, ils agissent sur le rythme cardiaque, la circulation sanguine (traitement de l'hypertension) et le système nerveux (Dewick, 2009).

### **1.2.2.4- Les peptides non ribosomiques**

Les peptides non ribosomiques sont des métabolites secondaires que l'on retrouve chez les bactéries et les champignons. Ils sont synthétisés par des complexes enzymatiques multi-domaines appelées peptides synthétases non ribosomales (NRPS). Contrairement à la synthèse ribosomale, cette synthèse ne nécessite pas d'ARN messager (ARNm) et utilise à la fois des acides aminés protéinogènes ainsi que des acides aminés non protéinogènes (Keller et *al.*, 2005).

De nombreux peptides non ribosomiques d'intérêt pharmaceutique sont produits par les champignons filamenteux comme par exemple les antibiotiques bêta-lactame tels que les pénicillines et les céphalosporines, et la cyclosporine qui est un médicament immunosuppresseur utilisé pour traiter les patients après une greffe d'organe (Hoffmeister et Keller 2007).

### **1.2.3- L'ère des médicaments fongiques**

L'étude systématique des métabolites secondaires fongiques a débuté en 1922 sous la direction de Harold Raistrick, qui a pu caractériser plus de 200 métabolites fongiques (Keller et *al.*, 2005). Cependant, ce n'est qu'au moment de la découverte et au développement de la pénicilline que l'attention portée aux métabolites secondaires fongiques s'est généralisée.

En septembre 1928, le microbiologiste Alexander Fleming a constaté qu'une boîte de ses cultures de *Staphylococcus* était contaminée par la moisissure *Penicillium notatum*, (actuellement *P. chrysogenum*) et autour de celle-ci, la bactérie ne s'est pas développée. Fleming déduisait que la moisissure avait secrété une substance qui avait inhibée la croissance de la bactérie et il a nommé cette substance la pénicilline (Aly et *al.*, 2011). Au début des années 1940, Howard Florey et Ernst Chain ont réussi à isoler la «pénicilline G» et à la produire à grande échelle (Khan et *al.*, 2014). Cette découverte a sauvé un nombre considérable de vies lors de la Seconde Guerre mondiale et ouvert une nouvelle ère dans le traitement des maladies infectieuses, décrites comme «l'âge d'or des antibiotiques» (Penesyan et *al.*, 2015; Chassagne, 2019).

Dans les années suivantes, plusieurs autres agents antimicrobiens d'origine fongique tels que la griséofulvine (1952) et la céphalosporine C (1955) ont été découvertes. Cela a incité les sociétés pharmaceutiques à prélever et à sélectionner de grandes collections de souches fongiques, en particulier pour la recherche d'antibiotiques (Aly et *al.*, 2011). Avec la découverte des antibiotiques, l'humanité a disposé d'un moyen et d'un remède extrêmement efficace contre les bactéries pathogènes qui l'accablaient depuis des millénaires. Ainsi, entre 1945 et 1980 les principales classes d'antibiotiques, encore utilisées aujourd'hui, ont été découvertes (Ali et *al.*, 2018).

Au cours des dernières années, les métabolites secondaires fongiques ont gagné une grande attention à la recherche de nouveaux médicaments pour le traitement des cancers et des maladies infectieuses graves (Wang, 2017). En effet, de nombreux composés affectant notre vie quotidienne proviennent des métabolites secondaires fongiques (Tableau 1).

**Tableau 1** Médicaments et produits d'origine fongique (Aly et al., 2011)

Médicaments et produits agrochimiques	Utilisations
<b>Pénicillines</b>	Antibiotiques
<b>Céphalosporines</b>	
<b>Griséofulvine</b>	Antifongique
<b>Acide fusidique</b>	Antibiotique
<b>Cyclosporine</b>	Immunosupresseur
<b>Mévastatine</b> <b>Lovastatine</b> <b>Analogues synthétiques exp: atorvastatine, fluvastatine, pitavastatine, pravastatine, rosuvastatine, simvastatine</b>	Antilipidémique
<b>Strobilurine A et B</b> <b>Analogues synthétiques exp : azoxystrobine, kresoxim-méthyle, métominostrobine, trifloxytrobine, picoxystrobine, pyraclostrobine</b>	Fongicides agricoles
<b>Echinocandines</b>	Antifongique
<b>Pneumocandines</b>	
<b>PF1022A</b>	Anthelminthique
<b>Analogue semisynthétique émodepside</b>	
<b>Acide nodulisporique A</b>	Insecticide
<b>Analogue semisynthétique N-tert-butyl nodulisporamide</b>	
<b>Scyphostatine</b>	Inhibiteur N-SMase

#### 1.2.4- Les *Aspergillus*

##### 1.2.4.1- Généralités

Les *Aspergillus spp.* sont des micromyètes omniprésents, largement distribués dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées et facilement transmissibles par le courant d'air (Bennett, 2007). On les rencontre aussi bien en milieu rural (dans les silos à grains, céréales ou fruits moisissés, matière organique en décomposition, foin, compost, terreau, etc.) qu'en milieu urbain, et aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations (Gugnani, 2003). Les *Aspergillus spp.* sont également rencontrés sur certains fruits et légumes, dans le pain, le poivre, les épices, le thé et aliments lyophilisés. De nombreuses

espèces d'*Aspergillus* spp. ont ainsi été isolées du milieu marin (Hiort et al., 2004; Cantrell et al., 2006).

*Aspergillus* est un genre fongique très vaste comprenant à l'heure actuelle 339 espèces figurant sur la liste des espèces acceptées (Samson et al., 2014). Selon la dernière révision de Peterson (2008), basée sur le séquençage de gènes conservés (calmoduline, bêta-tubuline, ARN polymérase II et ARNr), le genre *Aspergillus* regroupe 4 sous-genres (*Fumigati*, *Ornati*, *Circumdati* et *Nidulantes*) eux-mêmes divisés en 17 sections (*Terrei*, *Flavipedes*, *Candidi*, *Flavi*, *Nigri*, *Circumdati*, *Cremeri*, *Clavati*, *Fumigati*, *Cervini*, *Nidulantes*, *Versicolores*, *Usti*, *Sparsi*, *Aspergillus*, *Restricti* et *Ornati*).

Leur classification est la suivante (Houbraken et Samoson, 2014) :

**Règne :** *Mycota*

**Embranchement :** *Ascomycota*

**Classe :** *Eurotyomycota*

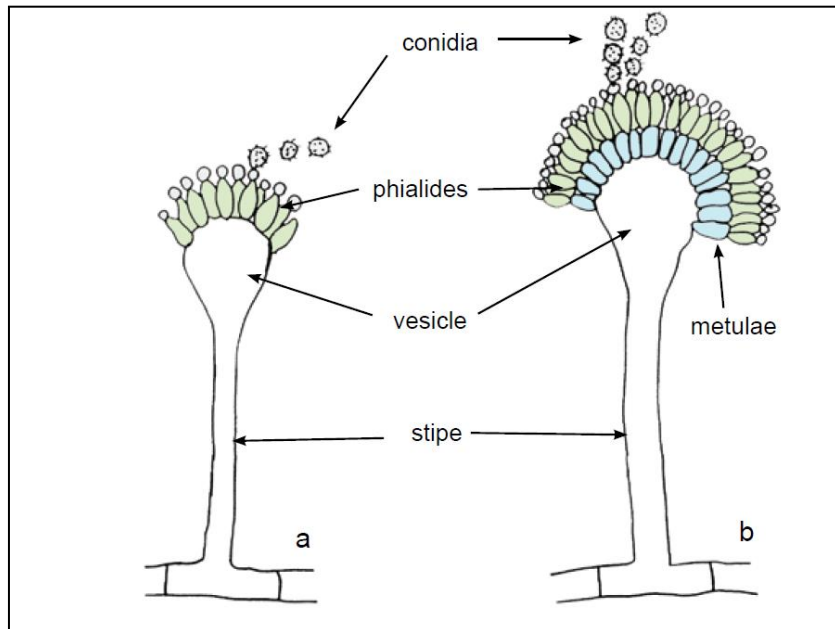
**Ordre :** *Eurotiales*

**Famille :** *Trichocomaceae*

**Genre :** *Aspergillus*

La reproduction asexuée (forme anamorphe) est le mode commun de la plupart des *Aspergillus* spp. Il peut se faire par production de conidies se formant à l'extrémité des cellules conidiogènes, les phialides. Les espèces d'*Aspergillus* sont caractérisées par un mycélium végétatif constitué d'hyphes cloisonnés hyalins, de diamètre fin et régulier, portant des conidiophores. Ces conidiophores sont constitués d'un stipe non ramifié se dressant à partir des hyphes végétatifs et se terminant par une vésicule de forme variable (globuleuse, sphérique, pyriforme, claviforme ou en forme de spatule) sur laquelle, sont disposées les phialides. Chez certaines *Aspergillus*, les phialides produisant les conidies sont directement formées sur la vésicule (tête conidienne unisériée). D'autres espèces possèdent une autre structure entre la vésicule et les phialides, nommée métule (tête conidienne bisériée). L'ensemble vésicule, phialide, conidies forme la tête aspergillaire qui caractérise le genre *Aspergillus* (Figure 6). Les conidies sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées et sont plus ou moins pigmentées (Chabasse et al., 2002). Des cellules à paroi épaisse (*Hülle cells*) parfois présentes (Botton et al., 1990).

Certaines *Aspergillus spp.* produisent également des formes sexuées (formes téléomorphes). Ceux-ci sont classifiés en dix genres d'ascomycètes dont trois genres sont les plus répandus en l'occurrence *Eurotium*, *Neosartorya*, et *Emericella* (Bennett, 2007)



**Figure 6** Morphologie des têtes aspergillaires . **a** : unisériée, **b** : bisériée (Kidd et *al.*, 2016).

#### 1.2.4.2- Importance économique et médicale des *Aspergillus spp.*

L'importance économique et médicale des *Aspergillus spp.* n'est pas négligeable avec des impacts pouvant être positifs ou négatifs.

Les *Aspergillus spp.* sont capables de produire de très nombreuses molécules dont certaines sont exploitées en santé humaine ou dans les industries chimiques. Par exemple, la lovastatine qui a été la première statine (molécule hypocholestérolémiante) approuvée par la FDA en 1987 est produite par *A. terreus* (Wang et *al.*, 2011; Wang, 2017). Les dérivés synthétiques de la lovastatine comptent parmi les médicaments les plus vendus au monde (Chassagne et *al.*, 2019). *A. nidulans* est utilisé pour la production d'échinocandines, une famille de lipopeptides à forte effet anti-*Candida*, dont trois dérivés semi-synthétiques sont approuvés par FDA: la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine (Emri et *al.*, 2013, Healy et Perlin, 2018). *A. fumigatus* est exploré pour la production de la fumagilline utilisée dans le traitement des microsporidioses (Siddiquee, 2018). Différentes espèces d'*Aspergillus* sont également exploitées au niveau industriel notamment pour leur production d'enzymes ou d'acides

organiques. A titre d'exemple, l'*Aspergillus niger* est utilisé pour la fermentation à grande échelle pour la production de l'acide citrique et de l'acide gluconique (Gerke et Braus, 2014). *Aspergillus oryzae* est utilisé pour la la production à grande échelle des amylases, lipases et protéases (Rank et *al.*, 2012).

En revanche, certaines espèces d'*Aspergillus* ont également des impacts négatifs notamment sur l'agriculture, étant des causes majeures de dégradation de produits agricoles en stockage ou de leur contamination par leur production de nombreuses mycotoxines telles que les aflatoxines, l'ochratoxine A, les verruculogènes et fumitremorgènes, etc. (Samson et *al.*, 2004). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux par leur pouvoir d'envahir les tissus vivants et de provoquer des aspergilloses, particulièrement chez les personnes immunodéprimées (Bennett, 2007).

### **1.3- Les antibiotiques**

Au début du XX<sup>ème</sup> siècle Selman Waksman, a décrit le mot antibiotique (du grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») comme une substance chimique produite par des microorganismes et capable d'inhiber la croissance d'autres microbes ou même de les détruire (Davies et Davies, 2010). Avec le temps, le terme d'antibiotique s'est élargi pour décrire toute substance, d'origine naturelle, hémi-synthétique ou synthétique dotée de ces propriétés (Yala et *al.*, 2001; Etubu et Ariekpar, 2016).

#### **1.3.1- Classification des antibiotiques**

Il existe plusieurs modalités de classification des antibiotiques (AB). Les AB peuvent être classés selon leurs structures chimiques, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent, ou bien selon leurs sites cible. La catégorisation basée sur le site cible est la plus appropriée car elle permet de mieux comprendre la base moléculaire et le mode d'action de l'activité antibactérienne (Ali et *al.*, 2018). En effet, les antibiotiques exercent généralement leurs effets par l'un des cinq mécanismes suivants : inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire, altération de la membrane plasmique, inhibition de la synthèse protéique bactérienne, inhibition de la synthèse des acides nucléiques et inhibition de la synthèse de l'acide folique (Figure 7).

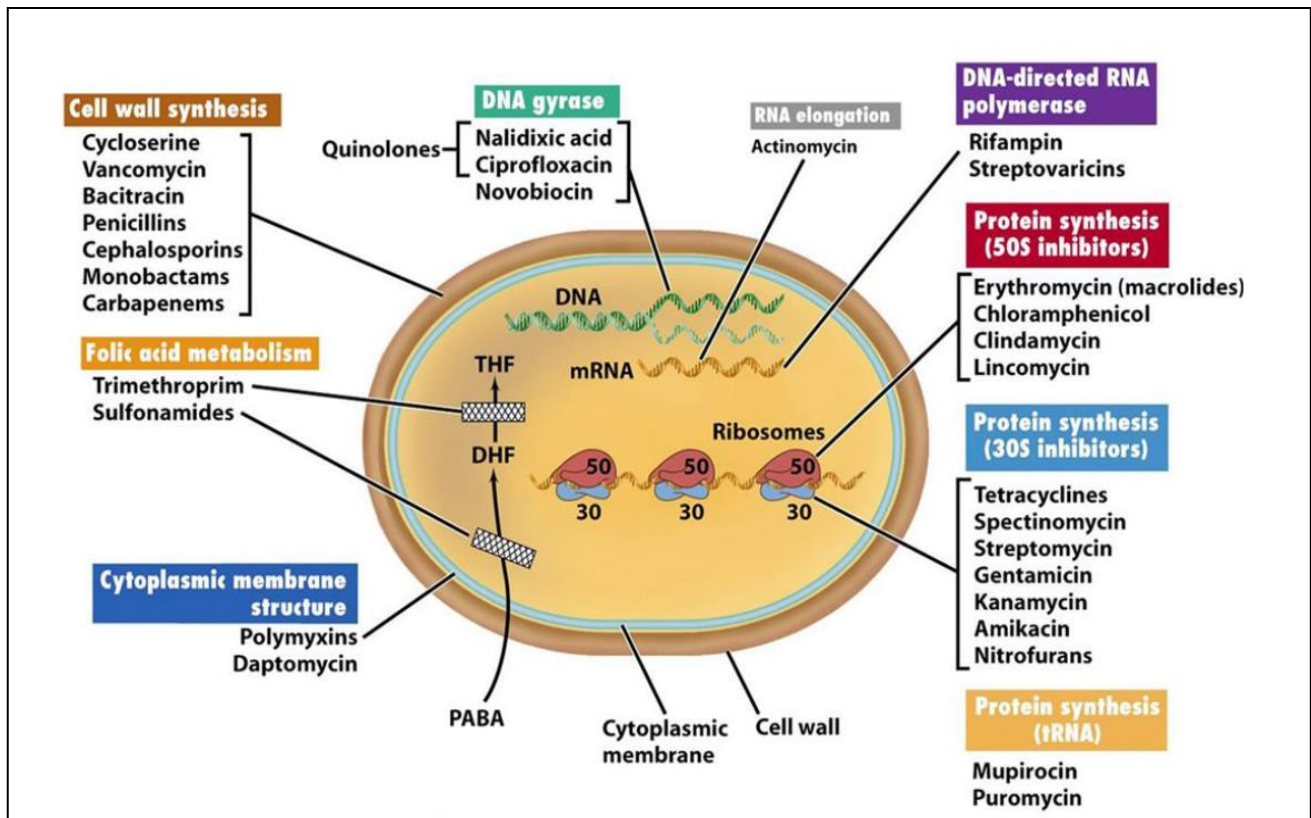


Figure 7 Sites d'action des antibiotiques sur la bactérie (Etubu et Arikekper, 2016).

### 1.3.2- Résistance aux antibiotiques

Un problème majeur rencontré au 21<sup>ème</sup> siècle dans le monde entier est l'émergence croissante de la résistance bactérienne aux AB couramment utilisés. En effet, les maladies infectieuses constituent la deuxième cause de mortalité dans le monde (Lam, 2007). Les bactéries sont capables de développer une résistance à toutes les classes d'antibiotiques actuellement utilisés (Aly et al., 2011). Cette résistance aux AB peut être naturelle ou acquise.

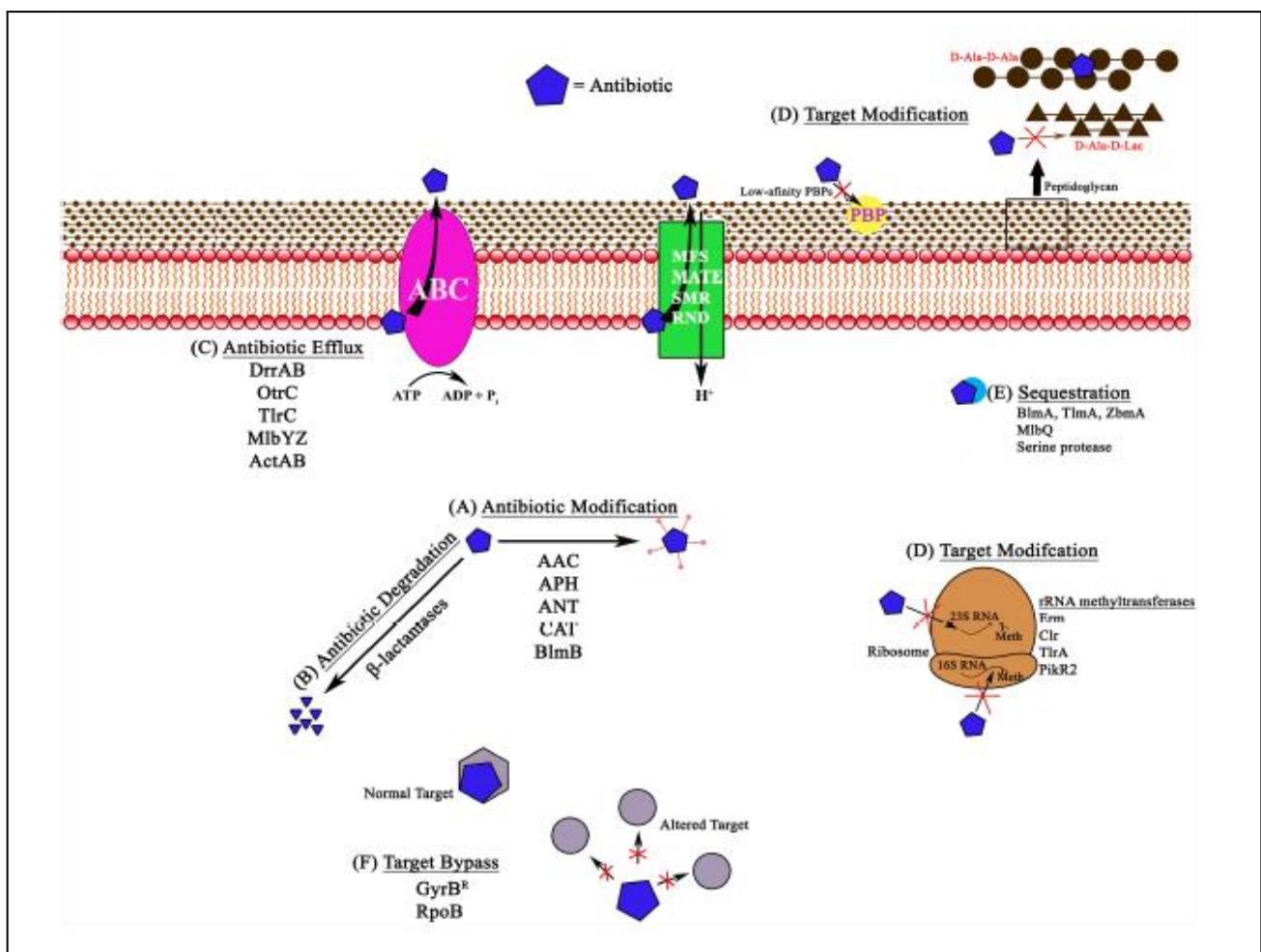
#### 1.3.2.1- Résistance naturelle

Dans ce type de résistance, la résistance fait partie du patrimoine génétique de l'espèce et est donc toutes les souches d'une même espèce sont naturellement résistantes à une ou plusieurs classes d'AB. A titre d'exemple, la résistance naturelle de certains Entérobactéries comme *Klebsiella pneumoniae* et *Enterobacter cloacae* aux  $\beta$ -lactamines.

### 1.3.2.2- Résistance acquise

En revanche, la résistance acquise est due à une modification génétique soit par mutation génétique (très rare) soit par acquisition de gènes de résistance portés sur les plasmides R (la plus fréquente) ou sur des transposons (Prescott *et al.*, 2013). Exemple, la résistance de certaines bactéries à Gram positif aux  $\beta$ -lactames, *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline et *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline (Aly *et al.*, 2011).

Pour chacune des classes des AB, il existe au moins un mécanisme biochimique permettant à la bactérie résistante de se protéger (Figure 8).



**Figure 8** Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Peterson et Kaur, 2018)

D'après Peterson et Kaur, (2018), les mécanismes de résistances sont les suivants :

- ✓ **Modification ou dégradation de l'AB:** c'est l'un des mécanismes les plus répandus pour les bactéries qui consiste à modifier la structure de l'AB ou à sécréter une



enzyme capable d'inactiver l'AB pour le rendre inefficace avant même qu'il ait pénétré dans la bactérie. Les AB concernés sont les  $\beta$ -lactamines, les aminoglycosides et le chloramphénicol. La production de  $\beta$ -lactamases est le mécanisme de résistance le plus répandu vis-à-vis les  $\beta$ -lactamines. *S. aureus* et *Enterococcus spp.* sont les pathogènes les plus susceptibles de produire des  $\beta$ -lactamases parmi les bactéries à Gram positif.

- ✓ **Efflux actif d'AB :** c'est l'un des mécanismes de résistance qui se déroule généralement en association avec autres mécanismes. Ce mécanisme consiste à expulser l'AB dans le milieu extérieur à travers des pompes à efflux ou des transporteurs actifs.
- ✓ **Modification de la cible :** ce mécanisme d'auto-résistance agit contre plusieurs classes d'antibiotiques, y compris les  $\beta$ -lactamines, les glycopeptides, les macrolides, les lincosamides, les streptogramines et les aminosides. Lorsque la cible de l'AB se trouve modifiée ou remplacée, l'agent antibactérien perd son affinité pour celle-ci et ne peut plus exercer son activité au niveau de la bactérie. Les glycopeptides, comme la vancomycine et le teicoplanine, inhibent les phases de la transpeptidation et la transglycosylation de la synthèse de la paroi cellulaire par association avec des précurseurs de peptidoglycane (D-Ala-D-Ala). La résistance à ces AB résulte d'un changement du précurseur D-Ala-D-Ala à D-Ala-D-Lac ou D-Ala-D-Ser, ce qui diminue leur affinité et rend la bactérie résistante.
- ✓ **Séquestration de l'AB :** la bactérie empêche l'AB d'atteindre sa cible par surproduction de cette dernière.
- ✓ **Contournement de la cible :** la bactérie empêche l'AB d'atteindre sa cible par la synthèse d'une autre cible capable de le leurrer.
- ✓ **Protection de la cible :** La bactérie produit des protéines qui se fixent sur la cible de l'AB réduisant son affinité pour celle-ci.

#### **1.4- Les antifongiques**

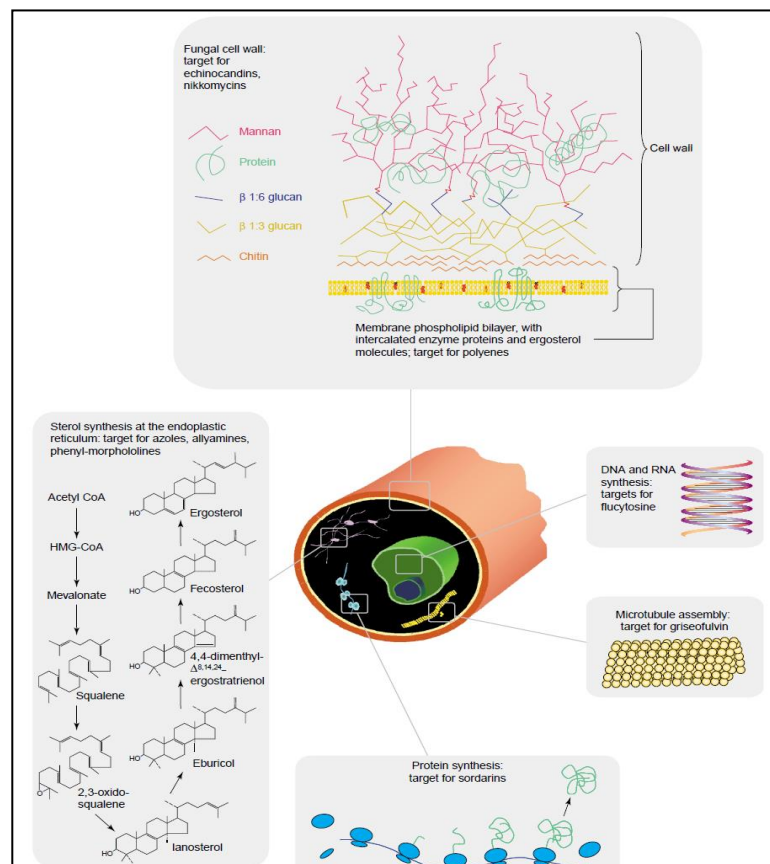
Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées pour lutter contre les mycoses qui sont des maladies provoquées par des champignons microscopiques. Ils sont aussi utilisés pour lutter contre les champignons phytopathogènes.

Comparé aux infections bactériennes, le traitement des mycoses est souvent beaucoup plus difficile. Cela s'explique par le fait que les cellules des mycètes sont très proches des cellules

humaines et animales, ainsi les produits qui sont toxiques pour le champignon pathogène peuvent l'être aussi pour les cellules de leurs hôtes. De ce fait, un antifongique idéal doit avoir une toxicité spécifique vis-à-vis du champignon pathogène, une bonne diffusion dans l'organisme, un large spectre d'action *in vivo* et dépourvu de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et aussi d'effets secondaires. Cependant, tous les antifongiques utilisés actuellement dans le traitement des mycoses (les polyènes, les azolés, etc) ne réunissent pas ces critères (Merghache et *al.*, 2012).

Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons (Figure 9) (Odds et *al.*, 2003):

- ✓ Action sur la synthèse de la paroi fongique (Echinocandines et nikkomycines).
- ✓ Action sur l'ergostérol (polyènes).
- ✓ Blocage de l'assemblage des microtubules (griseofulvine).
- ✓ Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (flucytosine).
- ✓ Inhibition de la synthèse protéique (sordarines)
- ✓ Inhibition de la synthèse des stérols (azoles, allyamines et phenyl-morphololines)



**Figure 9** Sites d'action des antifongiques sur la cellule fongique (Odds et *al.*, 2003)

## 1.5- Le pouvoir antioxydant

### 1.5.1- Les radicaux libres oxygénés

Espèces réactives oxygénées (ERO) ou les radicaux libres oxygénés sont des espèces chimiques (molécules ou atomes) dont la couche externe contient un ou plusieurs électrons non appariés ce qui leur confère une haute instabilité et réactivité donc une demi-vie très courte (de la nano- à la milliseconde) (Koechlin-Ramonatxo, 2006; Gilber *et al.*, 2013). Les EOR regroupent non seulement des radicaux libres telles que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) ou le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) mais également des dérivés non radicalaires telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) ou le peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) c'est pourquoi le terme d'espèces réactives oxygénées est préféré de celui de radicaux libres (Goudable et Flavier, 1997). Du fait de leur instabilité, les EOR vont se stabiliser en donnant un électron ou en prenant une à une autre molécule. Ils peuvent être générés en très faible quantité au cours du métabolisme normal de l'oxygène ( $O_2$ ) *in vivo*, mais aussi en plus grande quantité pendant une consommation accrue d'oxygène (Gauche et Hausswirth, 2006).

#### 1.5.1.1- Classes des radicaux libres oxygénés

Les principaux ERO formés à partir de l'oxygène sont représentés ci-dessous (Goudable et Flavier, 1997) :

**Radical superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) :** Il est l'ERO qui possède la plus faible réactivité vis-à-vis des substrats bioorganiques. Cependant, l' $O_2^{\cdot-}$  est capable de produire d'autres radicaux beaucoup plus réactifs (Tableau 2). Il est produit à partir de l'oxygène moléculaire, principalement par les cellules phagocytaires, et il participe à l'inactivation des virus et bactéries.

**Peroxyde d'hydrogène ou eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) :** Il est produit en grande partie à partir du  $O_2^{\cdot-}$  en présence de superoxyde dismutase qui catalyse la réaction. Le  $H_2O_2$  est un produit plus stable que les radicaux superoxydes, c'est pourquoi il diffuse très facilement à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. C'est un oxydant très puissant capable d'accepter deux électrons supplémentaires.

**Le radical hydroxyle ( $\cdot OH$ ) :** c'est le radical le plus puissant et le plus dangereux pour l'organisme. Il peut être produit à partir de l'eau par les radiations ionisantes dans tous les

organismes vivants mais il est surtout formé à partir d' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence d'ion ferreux suivant la réaction de Fenton.

Toutefois, il existe également d'autres ERO, dit secondaires, comme les radicaux peroxydes RO<sub>2</sub><sup>•</sup>, les hydroperoxydes RO<sub>2</sub>H et les radicaux alkoxydes RO<sup>•</sup>.

**Tableau 2** Origine des espèces réactives oxygénées (Migdal et Serres, 2011)

Réduction tétravalente de l'oxygène		$O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$
$O_2^{\bullet -}$	Anion superoxyde	<b>1</b> $O_2 + 1 e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$
$H_2O_2$	Peroxyde d'hydrogène	<b>2</b> $O_2^{\bullet -} + O_2^{\bullet -} (+ 2 H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$\bullet OH$	Radical hydroxyle	<b>3</b> $H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow \bullet OH + Fe^{3+} + OH^-$ <b>4</b> $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ <b>5</b> $H_2O_2 + 2 GSH \rightarrow 2 H_2O + GSSG$
$RO_2^{\bullet}$	Radical peroxyde	<b>6</b> $R^{\bullet} + O_2 \rightarrow RO_2^{\bullet}$
$RO_2H$	Hydroperoxyde	<b>7</b> $RO_2^{\bullet} + RH \rightarrow RO_2H + R^{\bullet}$
$RO^{\bullet}$	Radical alkoxyde	<b>8</b> $RO_2H + Fe^{2+} \rightarrow RO^{\bullet} + Fe^{3+} + OH^-$

### 1.5.1.2- Production des radicaux libres oxygénés

La production des EOR dans les cellules mammifères découle de plusieurs sources possibles mais est essentiellement d'origine enzymatique (**Figure 10**) :

**Au niveau des mitochondries** : La phosphorylation oxydative représente la voie métabolique énergétique principale de l'organisme assurant une production importante et permanente d'ATP. Lors de la phosphorylation oxydative, la majeure partie de l'oxygène subit une réduction tétravalente conduisant à la production d'eau. Cette réaction est catalysée par la cytochrome c oxydase. Ainsi, environ 2 % de l'oxygène consommé subit une réduction monoélectronique conduisant à la formation du radical superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) au niveau de l'ubiquinone. Durant la phosphorylation oxydatives, trois ERO sont formées : le radical hydroxyl (•OH), l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Gilbert et *al.*, 2013).

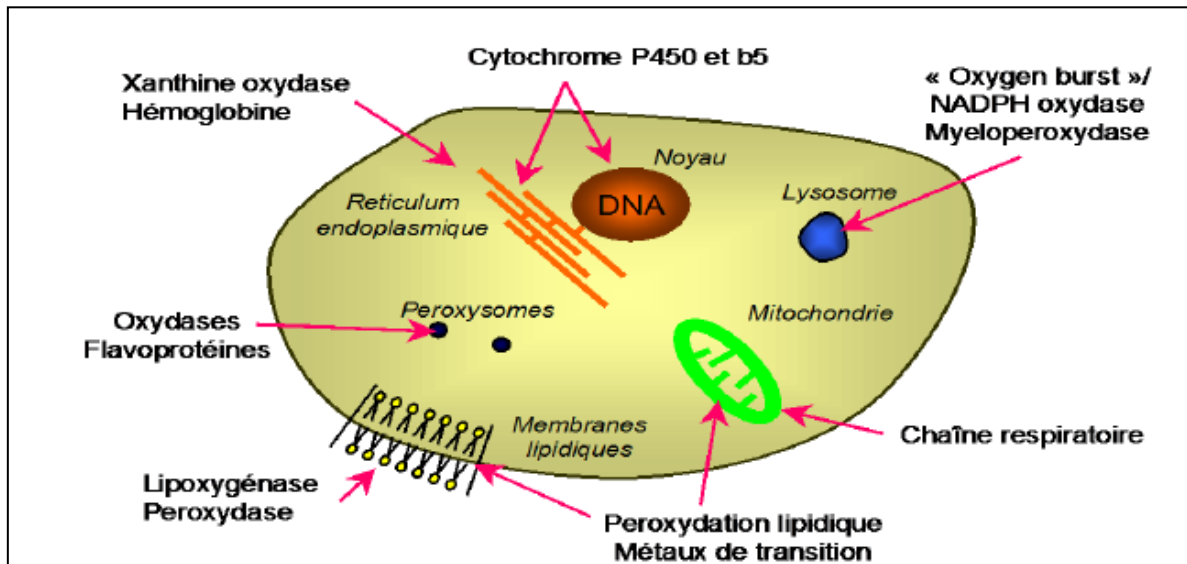


Figure 10 Sites de production intracellulaire des espèces réactives oxygénées (Rezaire, 2012)

**Au niveau des cellules phagocytaires** (polynucléaires et macrophages) : ces cellules possèdent une enzyme membranaire, la NAD(P)H oxydase (NOX) qui est spécialisée dans la fabrication du  $O_2^{\cdot-}$ . La NOX est une enzyme qui catalyse la réduction monoélectronique de l' $O_2$  en utilisant le NADPH ou le NADH comme donneur d'électrons. Cette enzyme est activée lorsque la cellule phagocytaire est stimulée (Cano et *al.*, 2006).

**La xanthine oxydase** est une enzyme ubiquitaire qui catalyse l'oxydation de l'hypoxanthine et de la xanthine au cours du métabolisme des purines, entraîne la formation d' $O_2^{\cdot-}$  (Migdal et Serres, 2011).

**Le monoxyde synthase** (NO-synthase) beaucoup de cellules sont capables de produire du monoxyde d'azote ( $NO^{\cdot}$ ) à partir d'arginine et d'oxygène, dans une réaction catalysée par la NO-synthase. À forte concentration, le  $NO^{\cdot}$  réagit avec un  $O_2^{\cdot-}$  pour former un puissant oxydant : le peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). En outre, le peroxynitrite peut se décomposer en d'autres oxydants ( $NO_2^{\cdot}$ ,  $^{\cdot}OH$ , etc.) (Oldham et *al.*, 1998).

**Les ions métalliques** comme le fer et le cuivre sont de remarquables promoteurs de processus radicalaire *in vitro*. Ils transforment  $H_2O_2$  en  $^{\cdot}OH$ , encore plus toxique, et accélèrent la peroxydation lipidique (Cano et *al.*, 2006).

**Les enzymes** de la voie de l'acide arachidonique, les peroxysomes, les lysosomes et le noyau sont également capables de produire  $O_2^{\cdot-}$ .

### 1.5.1.3- Action néfaste des radicaux libres oxygénés

La production des ERO et de leurs dérivés se fait de manière continue. Lorsque cette production dépasse les capacités de système de défenses (système antioxydant) de l'organisme, cette rupture d'équilibre correspond à l'état dit de « stress oxydant » (Gilbert et *al.*, 2013). Toutes les molécules biologiques possédant des doubles liaisons sont particulièrement affectées par les radicaux libres, entraînant la très grande réactivité de ces espèces chimiques vis-à-vis des lipides, des protéines et de l'ADN (Goudable et Flavier, 1997), c'est pourquoi les effets des radicaux libres sont retrouvés dans tout l'organisme et dans des pathologies très variées, parmi lesquelles le cancer, les maladies cardiovasculaires, les diabètes, les maladies neurodégénératives, les maladies inflammatoires aiguës et chroniques, et le déclin du système immunitaire (Figure 11) (Roussel, 2009).

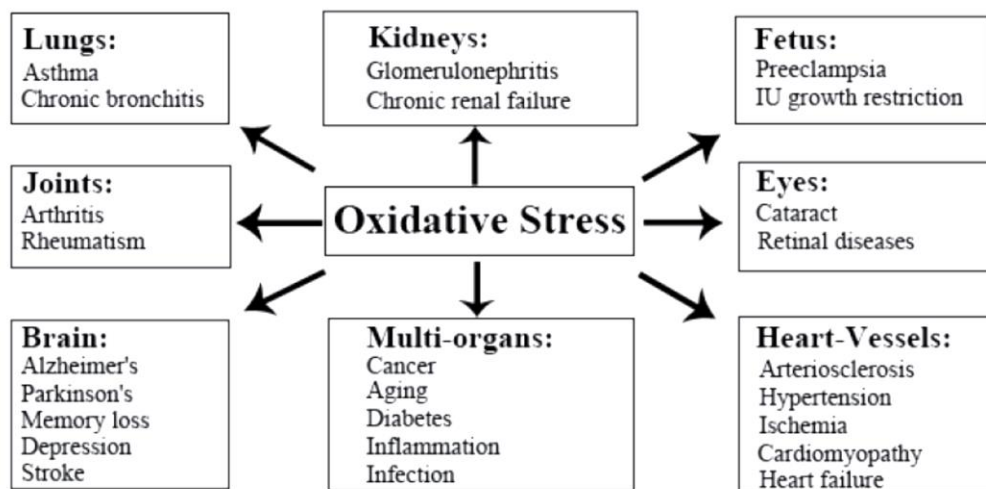


Figure 11 Maladies liées au stress oxydant (Pham-Huy et *al.*, 2008)

- ✓ **Oxydation des lipides :** Les lipides membranaires, particulièrement les plus riches en acides gras polyinsaturés sont les plus sensibles à l'oxydation par les ERO (Rao et *al.*, 2011). Leur oxydation (peroxydation) conduit à une désorganisation membranaire avec des modifications de la fluidité et de la perméabilité. Un certain nombre d'enzymes et de récepteurs membranaires sont également inactivés (Phaniedra et *al.*, 2015). La peroxydation oxydative est initiée, quand un acide gras polyinsaturé (LH) est attaqué par le radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) qui arrache un atome d'hydrogène produisant ainsi un radical lipidique ( $\text{L}\cdot$ ). Le radical lipidique formé peut réagir avec

de l'oxygène moléculaire pour former un radical lipide peroxyde (LOO<sup>•</sup>) qui va réagir avec une autre molécule d'acide gras (LH) formant de l'hydroperoxyde lipidique (LOOH) et un nouveau radical libre qui va à son tour s'oxyder (Labo et *al.*, 2010). La peroxydation lipidique fournit une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines et l'ADN. Parmi les produits formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane et le malondialdéhyde (MDA) qui sont étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique (Phaniedra et al, 2015).

- ✓ **Oxydation des protéines :** les réactions d'oxydation des protéines peuvent être classées en trois catégories : celles qui modifient un acide aminé spécifique, les modifications oxydatives qui cassent les liaisons peptidiques et les modifications des peptides par addition de produits issus de la peroxydation lipidique (Labo et *al.*, 2010). Ces changements conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures (perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases...) (Levine, 2002).
- ✓ **Oxydation de l'ADN :** l'ADN mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant supérieure à celle de l'ADN nucléaire. Les ERO notamment le radical (•OH) peuvent réagir avec tous les composants de l'ADN (les bases de purine et de pyrimidine, le désoxyribose) provoquant la formation des bases modifiées, des cassures simples et doubles de la chaîne d'ADN et pontages avec des protéines (Phaniédra et *al.*, 2015) . Ces lésions sont impliquées dans de nombreux processus pathologiques (létalité cellulaire, mutagenèse, cancérogenèse) et aussi dans le vieillissement cellulaire (Hochberg et *al.*, 2006).

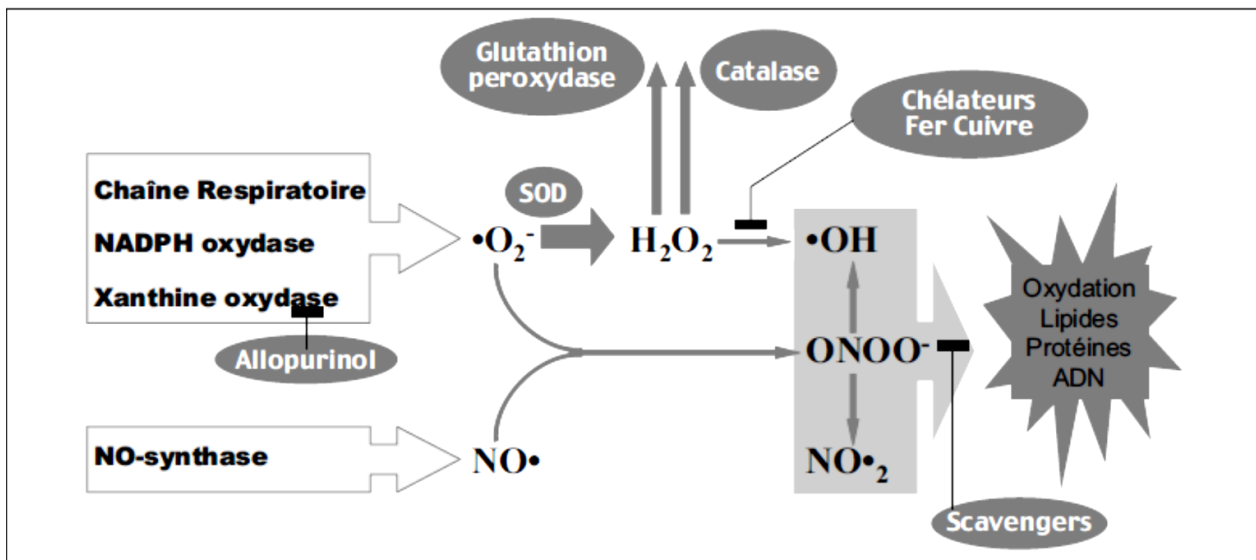
### **1.5.2- Les Antioxydants**

Le terme antioxydant regroupe « toutes substances qui, présentes à faibles concentrations par rapport à celle du substrat oxydable, retardent ou inhibent significativement l'oxydation de ce substrat » (Gauche et Hausswirth, 2006). L'effet des antioxydants provient de deux mécanismes : Ils neutralisent les ERO et empêchent les réactions en chaîne initialisées par ces derniers et les antioxydants qui détruisent les hydroperoxydes, diminuant ainsi la vitesse de formation des ERO (Ribeiro et *al.*, 2001).

L'organisme dispose de systèmes naturels de protection mis en jeu pour lutter contre les actions agressives des ERO dans des conditions métaboliques normales (Figure 12). Ces systèmes antioxydants peuvent être enzymatiques et/ou non enzymatiques. Les trois

principaux représentants de l'équipement enzymatique antioxydant sont les superoxydes dismutases (SOD), la catalase et la glutathion peroxydase (GPx). Les SOD, métalloenzymes ubiquitaires chez les eucaryotes, éliminent les  $O_2^{\cdot-}$  par dismutation du radical en  $H_2O_2$ , en  $OH^+$  et  $OH^-$ . Ces enzymes sont capables de neutraliser 80% des  $O^{\cdot-}$  fournis par la mitochondrie (Tessier et Marconnet, 1995). La catalase réduit le  $H_2O_2$  en eau et en oxygène moléculaire. La GPx, utilise également le  $H_2O_2$  comme substrat, réduit le  $H_2O_2$  en eau dans une réaction couplée à l'oxydation du glutathion (Laguerre et *al.*, 2007). Les systèmes antioxydants non-enzymatiques incluent de nombreux thiols dont le majoritaire est le glutathion, les vitamines (vitamine C et vitamine E), les caroténoïdes et les composés phénoliques (McCall et Frei, 1999).

Les antioxydants synthétiques sont utilisés depuis de nombreuses années. Mais, récemment, beaucoup d'études ont porté sur la toxicité élevée des antioxydants synthétiques utilisés dans l'industrie alimentaire, comme, par exemple, le butylhydroxytoluène (BHT), l'hydroxyanisole butyle (BHA), le tert-butylhydroquinone (TBHQ), etc. Le besoin de réduire l'utilisation des antioxydants synthétiques (maintenant limitée dans plusieurs pays en raison de leurs possibles effets indésirables sur la santé humaine) impose d'orienter le marché vers des antioxydants d'origine naturelle et stimule la recherche dans ce domaine (Herodez et *al.*, 2003).



**Figure 12** Action des antioxydants au cours du métabolisme des espèces réactives Oxygénées (Cano et *al.*, 2006)



# Matériel et méthodes

## **2- Matériel et méthodes**

### **2.1- Echantillonnage**

La collecte des échantillons de maïs a été faite le mois de décembre 2013 dans la localité d'Aïn Touta, Wilaya de Batna, Est algérien. En effet, cinq échantillons ont été prélevés aléatoirement à partir d'un stock de maïs grain destiné à l'alimentation de volaille.

L'échantillonnage a été effectué suivant la technique d'Astorica et *al.*, (2011) qui consiste en la prise de deux échantillons de 2.5 kg de chaque endroit d'échantillonnage. Après homogénéisation, des sous-échantillons de 500 g ont été repris de chaque échantillon, placés dans des sacs en papier stériles et soigneusement fermés puis ont été amenés au laboratoire et maintenus à 4°C jusqu'à l'analyse mycologique.

### **2.2- Isolement, purification et caractérisation des *Aspergillus***

50 grains de maïs de chaque échantillon ont été désinfectés en surface dans une solution d'hypochlorite de sodium (NaOCl) à 2.5%, pendant une minute (Atehnkeng et *al.*, 2008). Après trois rinçage à l'eau distillée stérile, les grains ont été séchés avec du papier filtre stérile et placés aseptiquement sur le milieu Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC, annexe1) à raison de 10 grains par boîte de Pétri. L'ensemble a été incubé à 28°C pendant 5 à 10 jours (apparition nette des colonies).

La purification des isolats consiste à repiquer une bouture d'hyphes mycéliens de chaque colonie fongique obtenue, à l'aide d'une anse de platine stérile, au centre de boîte de Pétri contenant le milieu Potato Dextrose Agar (PDA, annexe1) additionné de chloramphénicol. L'incubation a été faite à 28°C pendant 6 jours. Des repiquages successifs accompagnés par des observations microscopiques ont été appliqués jusqu'à l'obtention de souches pures.

La caractérisation des *Aspergillus spp.* s'est basée sur l'observation des caractères macroscopiques (croissance, couleur et aspect de la colonie) et des caractères microscopiques sous microscope optique (aspect du mycélium et fructification asexuée) en se référant à différentes clés de détermination : Chabasse et *al.*, (2002) ; Pitt et Hocking, (2009) ; Samson et *al.*,(2014).

Les souches pures obtenues ont été conservées selon la technique de Botton et *al.*, (1990) qui consiste à repiquer les isolats purs sur milieu PDA incliné. Après incubation à 28°C pendant 7 jours, ils sont stockés à 4°C et un repiquage périodique est réalisé tous les deux mois.

### **2.3- Sélection d'isolat producteur de substances antimicrobiennes**

Dans cette partie du travail, les isolats d'*Aspergillus*, peu communs et rarement étudiés, ont été testés pour voir leurs activités antimicrobiennes. L'isolat qui a montré le plus grand spectre d'activité vis-à-vis des microorganismes test a été retenu pour le reste du travail.

#### **2.3.1- Microorganismes test**

Les microorganismes test utilisés, pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats d'*Aspergillus*, proviennent de la collection du Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM). Les bactéries comprennent deux souches à Gram positif en l'occurrence ; *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus epidermidis*, et une souche à Gram négatif à savoir; *Chryseobacterium sp.* En revanche, une seule levure a été utilisée pour le test ; *Candida albicans*.

#### **2.3.2- Technique des cylindres d'agar**

L'activité antimicrobienne des *Aspergillus spp.* a été testée contre les germes test par la méthode des cylindres d'agar décrite par Devaraju et Satish, (2011). Ce test consiste à ensemercer chaque isolat en stries serrées sur la surface d'une boîte contenant la gélose PDA. Après incubation à 28°C pendant 8 jours, des disques d'agar d'environ 6 mm sont coupés stérilement de cette boîte et déposés sur les boîtes contenant le milieu gélose nutritive (GN, annexe1) et le milieu Yeast extract Peptone Glucose Agar (YPG, annexe1) préalablement ensemençés par les suspensions bactériennes et levurienne standardisées respectivement. Après un séchage de la surface d'environ 10 min, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 28°C pendant 48 h pour *C. albicans*. L'expérience a été répétée trois fois pour chaque isolat, et les diamètres des zones d'inhibition autour des disques indiquant l'activité antimicrobienne ont été mesurées au millimètre près et enregistrées.

## **2.4- Identification de la souche sélectionnée**

La souche d'*Aspergillus* ayant montré une forte activité antimicrobienne a été identifiée par l'ensemble de tests préliminaires (observation des caractères macroscopiques et microscopiques) et moléculaires (analyses des séquences d'ADN).

### **2.4.1-Identification macroscopique**

L'étude de l'aspect macroscopique de la souche d'*Aspergillus* sélectionnée a été faite suivant la méthode décrite par Pitt et Hocking, (2009). Cette méthode consiste à cultiver la souche sélectionnée sur trois milieux standards Czapek Yeast extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) et 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N) (annexe 1) à l'obscurité et à 25°C pendant 7 jours. Après cette période, le diamètre de colonies et leur apparence ont été enregistrés.

### **2.4.2- Identification microscopique**

L'étude microscopique de la souche sélectionnée a été effectuée selon la méthode décrite par Chabasse et *al.*, (2002). A l'aide d'une anse de platine, un fragment mycélien d'une colonie âgée de 7 jours a été prélevé et ensuite déposé dans une goutte de bleu coton (annexe 2) entre lame et lamelle accompagné d'un léger chauffage. L'observation microscopique a été faite au microscope optique aux différents grossissements (Gx25, Gx40) et par immersion à (Gx100). Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des caractères microscopiques (mycélium, tête aspergillaire, forme de vésicule, conidiophores, conidies).

Des photos macroscopiques montrant l'aspect morphologique des colonies et des photos microscopiques du mycélium, les fructifications et les spores ont été prises et enregistrées.

### **2.4.3- Identification moléculaire**

Un échantillon de la souche sélectionnée a été envoyé à la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen ou la Collection Allemande des Microorganismes et des Cultures Cellulaires, Allemagne) afin de confirmer l'identification de la souche fongique par le séquençage des régions ITS (Internal Transcribed Spacer) et D1/D2 de LSU (Large Subunit), de façon combinée, ainsi qu'une partie du gène codant pour la calmoduline (CALM).

## **2.5- Production des substances bioactives par la souche sélectionnée**

### **2.5.1- Préparation de la suspension sporale**

La préparation de la suspension sporale a été effectuée selon la méthode de Bacha, (2009) avec légères modifications. En effet, la souche sélectionnée a étéensemencée en surface dans des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA. Après 10 jours d'incubation à 28°C, les spores ont été récupérées par addition de 9 mL d'eau distillée stérile contenant 0.1 % de Tween 80 en grattant soigneusement la surface des boîtes avec une anse de platine. La solution obtenue a été filtrée à travers une gaze stérile pour séparer le mycélium du bouillon de culture. La concentration de la suspension sporale a été déterminée à l'aide d'une cellule de Thomas, ensuite des dilutions décimales ont été effectuées jusqu'à l'obtention d'une suspension sporale de 10<sup>6</sup> spore/mL. La suspension ainsi obtenue a été conservée à 4°C.

### **2.5.2- Choix du milieu de fermentation**

Afin de sélectionner le milieu le plus adapté au développement de la souche sélectionnée et à la production des substances bioactives, quatre différents milieux de cultures liquides ont été utilisés, en l'occurrence, Czapeck Yeast extract Bouillon (CYB), Malt Extrat Bouillon (MEB), Potato Dextrose Bouillon (PDB) et Sabouraud Dextrose Bouillon (SDB) (annexe1). 1mL de la suspension sporale (10<sup>6</sup> spore/mL) préalablement préparée a été inoculé dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL de chaque milieu de culture stérile. Les erlenmeyers ont été incubés à 28°C pendant 20 jours.

A la fin de la fermentation, le contenu de chaque erlenmeyer a été filtré sur papier Wattman N°1 et l'activité antimicrobienne de chaque filtrat a été ensuite testée, suivant la méthode des puits, vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* et *Candida albicans*.

A l'aide d'un cylindre en cuivre, des puits de 6 mm de diamètre ont été creusés dans les milieux Mueller Hinton Agar (MHA) et Sabouraud Dextrose Agar (SDA) coulés en boîtes de Pétri et pré-ensemencés par les suspensions bactériennes et levuriennes standardisées respectivement. Un volume de 50 µl du filtrat à analyser a été introduit dans les puits et les boîtes ont été mises à 4°C pendant 2 h afin de faciliter la diffusion des substances actives. Les boîtes ont été, ensuite, incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 h pour les bactéries et à 28°C pendant 48h pour la levure. Les tests ont été réalisés en triple pour chaque filtrat

(Jahangirian et *al.*, 2013). La lecture des résultats a été faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des puits exprimés en millimètre près. Plus le diamètre de cette zone est grand, plus l'activité contenue dans le filtrat est importante.

### **2.5.3- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes par la souche sélectionnée**

La cinétique de la production des substances antimicrobiennes a été effectuée en vue de déterminer le temps de production optimale. L'évolution de cette production par l'isolat sélectionnée a été réalisée dans des erlenmeyers de 250 mL contenant 100 mL du milieu sélectionné, le milieu le plus adéquat à la production des substances antimicrobiennes par la souche sélectionnée, et inoculés par 1mL de la suspension sporale ( $10^6$  spore/mL) préalablement préparée. L'ensemble a été incubé à 28°C pendant 20 jours.

Trois prélèvements ont été effectués quotidiennement dans des conditions aseptiques. Chaque échantillon a été centrifugé à 4000 rpm pendant 10 min pour séparer le mycélium du bouillon de culture (Saurav et Kannabiran, 2013). Le mycélium a été séché à 60°C pendant 6 h puis à 40°C pendant une nuit. Ensuite, le poids sec de mycélium correspondant à la biomasse fongique a été mesuré (Kocić-Tanackov et *al.*, 2012). Le surnageant récupéré a été utilisé pour tester ses activités antimicrobiennes par la méthode des puits (section 2.5.2).

### **2.5.4- Production et extraction des substances bioactives**

Pour la production des substances bioactives, le milieu ayant donné l'activité antimicrobienne la plus importante (section 2.5.2) a été utilisé. En effet, le milieu a été réparti dans des erlenmeyers de 1 L, chacun contenant 250 mL du milieu stérilisé. Le pH initial du milieu a été ajusté à 5,75. Ensuite, chaque erlenmeyer a été inoculé par 5 % (v/v) de la suspension sporale préalablement préparée (Slack et *al.*, 2009). Les erlenmeyersensemencés ont été, ensuite, incubés dans un incubateur agitateur à  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant 15 jours et à 125 rpm.

Après 15 jours de fermentation, le contenu de chaque erlenmeyer a été filtré sous vide sur papier Whatman n°1. Ensuite, le filtrat a été centrifugé à 10,000 rpm pendant 10 min et à 4°C pour se débarrasser des spores et des filaments mycéliens (Arora et Chandra, 2011).

Les métabolites secondaires ont été extraits à partir du filtrat en additionnant un volume égal d'acétate d'éthyle. Le mélange a été agité vigoureusement pendant 10 min, puis transvasé

dans une ampoule à décantation. Après décantation de 5 min, la phase supérieure « acétate d'éthyle » a été récupérée (Pavithra et *al.*, 2012). Cette opération a été répétée trois fois. L'ensemble des phases organiques réunies a été déshydraté par passage sur sulfate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), puis évaporé sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif à 40°C. Quand le volume est réduit à environ 4 ml, l'extrait d'acétate d'éthyle (EAc) a été placé dans un flacon en verre pour être évaporé sous flux d'azote. Une fois sec, l'EAc a été stocké à - 20°C.

## **2.6- Evaluation de l'activité antimicrobienne**

### **2.6.1- Microorganismes test**

Dans cette partie de travail, l'activité antimicrobienne de l'EAc obtenu a été testée à l'égard des souches cliniques en raison de leurs résistances. Ces souches proviennent du laboratoire de Microbiologie Clinique de la policlinique universitaire «Federico II » Naples-Italie. En effet, quatre bactéries à Gram négatif et deux bactéries à Gram positif ont été utilisées pour tester l'activité antibactérienne, en l'occurrence : *Escherichia coli* (souche résistante à l'ampicilline), *Klebsiella pneumoniae* (souche résistante à l'ampicilline et à la pipéracilline), *Pseudomonas aeruginosa* (souche résistante aux carbapénèmes), *Salmonella typhi* (souche résistante à l'ampicilline), *Staphylococcus aureus* producteur de bêta-lactamase (SABL) et *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline (SERM). Deux levures ont été utilisées pour tester l'activité anti-Candida : *Candida albicans* et *Candida glabrata*.

### **2.6.2- Détermination du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose**

Afin de déterminer l'activité antimicrobienne de l'EAc, la méthode de diffusion sur gélose a été utilisée suivant la technique décrite par Turkoglu et *al.*, (2007) avec légères modifications.

Les souches testées ont été réactivées dans un bouillon nutritif pendant 24 h à 37°C pour les bactéries et dans un bouillon sabouraud pendant 48 h à 28°C pour les levures. Ensuite, la turbidité de chaque culture a été ajustée à 0.5 Mc Farland ce qui correspond à 1-2×10<sup>8</sup> UFC/ml pour les bactéries et 1-5×10<sup>6</sup> UFC/mL pour les souches *Candida*. L'EAc de la souche sélectionnée a été dissous dans le méthanol absolu. Ensuite, des boîtes de Pétri contenant le milieu MH et SDA ont étéensemencées avec 100 µl des suspensions bactériennes et levuriennes respectivement. Après séchage de la surface, des disques stériles de 6 mm de diamètre imbibés avec 20 µl de l'EAc (2 mg/mL) ont été placés délicatement sur

la surface des milieux gélosés ensemencés. Les boîtes ont été placées pendant 2 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances à activité antimicrobienne puis incubées à 37°C pendant 24 h pour les souches bactériennes et à 28°C pendant 48 heures pour les souches *Candida*. Des disques imprégnés de chloramphénicol (10 µg/disque) et de kétoconazole (30 µg/disque) ont servi de contrôle positif pour les bactéries et les levures respectivement. Comme contrôle négatif, 20 µl de méthanol ont été déposés sur un disque dans les mêmes conditions. Tous les tests ont été effectués en triple. Le diamètre des zones d'inhibition autour des disques révélant l'activité antimicrobienne ont été mesuré en millimètre près.

### **2.6.3- Détermination de la concentration minimale inhibitrice**

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide conformément aux recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute ou l'institut des normes du laboratoire clinique), anciennement NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards ou comité national des normes du laboratoire clinique).

**Pour les souches bactériennes**, un nombre suffisant de colonies, ayant poussé à 35°C±2°C pendant 18 à 24 h sur GN ont été dispersées dans 5 mL de solution saline stérile (NaCl 0.85%) et la turbidité a été ajustée à 0.5 Mc Farland. L'inoculum a été alors dilué 1:150 avec du Bouillon Muller-Hinton (MHB) pour atteindre une concentration de  $1 \times 10^6$  UFC/mL. L'EAc a été dissous dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 1%. Ensuite, 50µl de l'inoculum ont été ajouté dans tous les puits de la microplaque (microplaque 96 puits) contenant 50 µl des dilutions de l'EAc (dans MHB) sauf ceux de la dernière colonne (contrôle de stérilité). La concentration finale des bactéries était  $5 \times 10^5$  UFC/mL. Pour le contrôle de la croissance certains puits n'ont reçu que 50 µl de MHB et 50 µl d'inoculum (CLSI, 2012).

**Pour les souches de *Candida* testées**, cinq colonies ayant poussé à 25°C pendant 24 h sur milieu SDA, ont été dispersées dans 5 mL de solution saline stérile (NaCl 0.85%), afin d'ajuster la turbidité à 0.5 Mc Farland. La suspension obtenue a été diluée 1:50 puis 1:20 avec du MHB pour atteindre une concentration de  $1 \times 10^3$  à  $5 \times 10^3$  UFC/mL. La même méthode d'inoculation a été utilisée, cependant le volume de l'inoculum et ce de l'extrait était 100 µl. La concentration finale de levures était de  $0.5 \times 10^3$  à  $2.5 \times 10^3$  UFC/mL (NCCLS, 2002).



Après l'incubation des microplaques à 35°C pendant 24 h, la CMI est déterminée comme étant la plus faible dilution de l'extrait qui a inhibé toute croissance visible à l'œil nu (Balouiri et *al.*, 2016).

## **2.7- Evaluation de l'activité antioxydante**

L'activité antioxydante (AO) de l'EAc de la souche sélectionnée a été évaluée *in vitro* en utilisant trois tests chimiques : le piégeage du radical 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>), le piégeage du radical acide 2,2-azino-bis-3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique (ABTS<sup>•+</sup>) et le pouvoir réducteur du fer.

### **2.7.1- Test DPPH**

Cette méthode implique la réduction d'une solution alcoolique de l'espèce radicalaire DPPH<sup>•</sup>, de couleur violette, par des substances antiradicalaires ce qui conduit à la formation de DPPH-H non-radicalaire (2,2-diphényl-1-picryl hydrazine). Cette réaction induit une perte de la couleur violette qui peut être suivie par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 517 nm.

La capacité de l'EAc de la souche sélectionnée à piéger le radical DPPH<sup>•</sup> a été déterminée par la méthode décrite par Jakovljević et *al.*, (2014). Une gamme de concentrations d'EAc (12,5 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 400 µg/mL) a été préparée dans le méthanol absolu. Ensuite, un volume de 1mL de chaque concentration a été mélangé avec 1 mL de la solution de DPPH<sup>•</sup> pré préparée (8 µg/mL). Après homogénéisation, les mélanges ont été incubés à l'abri de la lumière pendant 30 min à 37°C. L'absorbance a été mesurée contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol, à 517 nm en utilisant un spectrophotomètre UV-Visible. Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard; l'acide ascorbique. L'inhibition du DPPH<sup>•</sup> par l'acide ascorbique a été également analysée aux mêmes concentrations. Tous les essais ont été effectués en triple afin de vérifier la reproductibilité.

Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>•</sup> (I%) en appliquant la formule suivante :

$$I \% = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

Où **I %**: Pourcentage d'inhibition du radical DPPH<sup>\*</sup>;

**A<sub>0</sub>**: Absorbance du blanc ;

**A<sub>1</sub>** : Absorbance de l'échantillon.

La CI50 a été déterminée pour l'EAc de la souche sélectionnée, elle est définie comme étant la concentration en extrait qui inhibe 50 % du radical DPPH<sup>\*</sup> (Bouyahya *et al.*, 2018).

### **2.7.2- Test ABTS**

Cette méthode est basée sur la neutralisation d'un radical cation préformé (ABTS<sup>•+</sup>) généré par l'oxydation de la molécule stable ABTS.

La capacité de l'EAc de la souche sélectionnée à piéger le radical ABTS<sup>•+</sup> a été déterminée par la méthode décrite par Dudonné *et al.*, (2009). La solution radicalaire d'ABTS<sup>•+</sup> a été préparée en ajoutant 6,6 mg de persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) à 10 mL de la solution aqueuse d'ABTS (7 mM). Le mélange a été mis à l'abri de la lumière pendant 12-16 h à température ambiante. La solution obtenue a été diluée avec de l'éthanol jusqu'à l'obtention d'une absorbance d'environ 0,7 à 734 nm. Ensuite, 100 µL de l'EAc à différentes concentrations (12,5 - 400 µg/mL) ont été ajoutés dans une cuvette en plastique à 3 mL de la solution d'ABTS<sup>•+</sup> et l'absorbance a été lue après 10 min contre un blanc. Le contrôle positif utilisé est l'acide ascorbique. L'inhibition de l'ABTS<sup>•+</sup> par l'acide ascorbique a été également analysée aux mêmes concentrations. Tous les essais ont été effectués en triple. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> en appliquant la formule décrite pour le test DPPH (section 2.7.1).

La CI50 est définie comme étant la concentration en extrait qui inhibe 50 % du radical ABTS<sup>•+</sup>.

### **2.7.3- Pouvoir réducteur de Fer**

Comme indique son nom, cette technique permet de mesurer la réduction du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) présent dans le complexe ferricyanure de potassium [K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>] en fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>) en présence d'un antioxydant. La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique (Fe<sup>3+</sup>) à la couleur bleu-verte du fer ferreux (Fe<sup>2+</sup>). L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Chung *et al.*, 2002).

Le pouvoir réducteur de l'EAc a été déterminé par la méthode décrite par Yen et Chen, (1995). 1 mL de l'EAc à différentes concentrations (12,5-400 µg/mL) a été mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M ; pH 6.6) et 2.5 mL d'une solution de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> à 1%. L'ensemble a été incubé à 50°C pendant 20 minutes, puis 2,5 mL d'acide trichloracétique (CCl<sub>3</sub>COOH) à 10% ont été ajoutés pour stopper la réaction. Ainsi, le mélange obtenu a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 mn et 2,5 mL du surnageant ont été additionnés de 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL de chlorure ferrique (FeCl<sub>3</sub>) à 0,1%. La lecture de l'absorbance a été faite à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par le méthanol. Le contrôle positif est l'acide ascorbique dont l'absorbance est mesurée dans les mêmes conditions que l'EAc. Tous les essais ont été effectués en triple.

#### **2.7.4- Dosage des polyphénols totaux**

Le Folin-Ciocalteu est le réactif le plus utilisé pour le dosage des polyphénols totaux (PT). Il s'agit d'un réactif de coloration jaune qui vire en bleue lorsqu'il est réduit en présence des composés phénoliques. La coloration bleue produite a une absorbance maximale à environ 760 nm, et est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'extrait.

Le dosage des PT de l'EAc de la souche sélectionnée a été déterminé par la méthode décrite par Gan *et al.*, (2010). 500 µl de l'EAc ont été ajoutés à 2,5 mL de solution de Folin- Ciocalteu et 2 mL d'une solution de carbonate de sodium (7,5%). Après 2 heures d'incubation à la température ambiante, l'absorbance a été mesurée à 760 nm. Tous les essais ont été effectués en triple. L'absorbance de l'EAc a été comparée à une courbe standard d'acide gallique pour estimer la concentration de PT dans l'EAc. Les résultats ont été exprimés en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par gramme d'extrait (mg GAE/g).

#### **2.8- Analyses statistiques**

Les valeurs indiquées dans les tableaux sont des moyennes ± écarts-types des trois mesures. Les valeurs de CI<sub>50</sub> ont été calculées à partir des équations linéaires sur les graphiques représentant les pourcentages d'inhibitions de DPPH<sup>•</sup> et d'ABTS<sup>•+</sup> en fonction des concentrations de l'EAc. Les coefficients de corrélation entre les méthodes de l'activité antioxydante ont été démontrés en utilisant Excel (2010).

## 2.9- Identification des métabolites par UHPLC- HRMS/MS

La purification et l'identification des molécules contenant dans l'EAc de la souche sélectionnée a été réalisée par chromatographie liquide à ultra haute performance (UHPLC) couplée à la spectrométrie de masse de type Exactive (spectrométrie à haute résolution (HRMS)) dans le laboratoire de chimie alimentaire, université de Federico II Naples, Italie.

L'EAc sec de la souche sélectionnée a été repris dans 1 mL de méthanol, filtré sur un filtre de 0,2 µm préalablement conditionné avec du méthanol puis évaporé sous flux d'azote. Ensuite, l'extrait sec obtenu est remis en suspension dans 500 µl de méthanol puis injecté en UHPLC.

Le système HPLC utilisé dans le couplage LC-MS est composé d'un système Dionex Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) muni d'une pompe quaternaire (1250 bar) et d'un injecteur automatique. La colonne utilisée est une colonne de type Luna Omega C18 50 x 2,1 mm, 1,6 µm (Thermo Fisher Scientific, Bellefonte, PA, USA). La phase mobile utilisée est un mélange binaire de formate d'ammonium (5 mM) avec 0,1% d'acide formique dans l'eau (éluant A) et de formate d'ammonium (5 mM) avec 0,1% d'acide formique dans le méthanol (éluant B). Le débit de colonne était de 0,4 mL/min et la température de la colonne a été maintenue à 25 °C. Un volume de 1 µL de l'EAc de la souche sélectionnée a été injecté dans le système chromatographique. Le gradient d'élution utilisé est renseigné dans le Tableau 3.

**Tableau 3** Gradient d'élution pour l'analyse de l'extrait de la souche sélectionnée

Temps (min)	A%	B%
0	80	20
0.5	60	40
6	0	100
8	80	20
10	80	20

Les spectres de masse à haute résolution ont été enregistrés sur un spectromètre Q Exactive Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), équipé d'une source électrospray (H-ESI II) de la même compagnie. Ces spectres ont été acquis en modes d'ionisation positive et négative dans une gamme de m/z allant de 90 à 1000 et avec une puissance de résolution de

masse réglée à 70.000 FWHM (full width at half maximum ou largeur total à mi-hauteur). Les paramètres utilisés sont les suivants : Le gaz de gaine (N<sub>2</sub> > 95%) à 35 unités arbitraires, le gaz auxiliaire (N<sub>2</sub> > 95%) à 10 unités arbitraires, la température du capillaire à 290°C, la température du four à 305°C, tension de spray 4 kV; AGC (Automatic gain control ou contrôle automatique de gain) de la valeur cible a été réglée à  $1 \times 10^6$  charges et le temps d'injection maximal (MIT) a été fixé à 100 ms. Le calibrage de l'Orbitrap a été effectué en utilisant le mélange de calibrage du Thermo-Fisher Scientific.

Les spectres MS<sup>2</sup> de chaque métabolite sélectionné ont été acquis en utilisant le mode PRM (parallel reaction monitoring ou surveillance de réaction parallèle) avec une résolution de masse réglée à 35.000. Les paramètres d'acquisition de MS<sup>2</sup> avaient une largeur d'isolement de 2 *m/z*, une énergie de collision de 30%, les valeurs de GAC et de MIT étant réglées à  $2 \times 10^5$  et 200 ms, respectivement.

Le contrôle de système et le traitement des données ont été réalisés en utilisant le logiciel Xcalibur (version 3.0.63) fournit par Thermo Fisher Scientific.

# Résultats

### 3- Résultats

#### 3.1- Isolement, purification et identification des *Aspergillus*

Un nombre total de 251 isolats fongiques a pu être isolé, à partir des cinq échantillons de maïs grain, représentant 6 genres dont l'ordre de prédominance décroissant est comme suit : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Chrysonilia* et *Rhizopus*.

Sur l'ensemble des isolats, le genre *Aspergillus* est apparu prédominant puisque les souches de ce genre ont été isolées en nombre important à partir de tous les échantillons avec une fréquence de 61,75% de l'ensemble de souches obtenues. Vient ensuite, le genre *Penicillium* qui représente 20,32% de l'ensemble des isolats, suivi par le genre *Fusarium* avec une fréquence de 15,14%. Les genres *Trichoderma*, *Chrysonilia* et *Rhizopus* représentent respectivement 1,19%, 0,8% et 0,8% de la totalité des souches isolées.

L'analyse combinée de l'examen macroscopique et microscopique des isolats purifiés, a montré que les espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont représentées essentiellement par quatre sections : *Aspergillus* section *Flavi* représentée par deux espèces à savoir *A. flavus* et *A. parasiticus* ; *Aspergillus* section *Nigri* représentée par l'espèce *A. niger* ; *Aspergillus* section *Nidulantes* représentée par l'espèce *Emericella nidulans* et *Aspergillus* section *Versicolores* regroupant deux espèces en l'occurrence *Aspergillus sp1.* et *Aspergillus sp.2.* Les espèces appartenant à l'*Aspergillus* section *Flavi* et section *Nigri* sont les prédominantes avec une fréquence de 70,32% et 23,29%, respectivement, de l'ensemble des *Aspergillus* isolés, ce qui représente 43,43% et 14,34% de l'ensemble d'isolats fongiques obtenus. Par ailleurs, les espèces appartenant aux sections *Nidulantes* et *Versicolores* sont les moins représentées avec les fréquences respectives de 3,22% et 1,93% des *Aspergillus* isolés ce qui représente 1,99% et 1,19% de l'ensemble d'isolats. D'autres espèces d'*Aspergillus* ont été également identifiées (*Aspergillus sp.3* et *Aspergillus sp.4*). Les résultats obtenus sont détaillés dans le tableau 4. L'aspect morphologique des souches d'*Aspergillus* isolées est illustré dans le tableau 5.


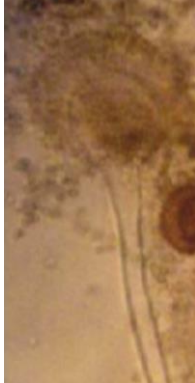
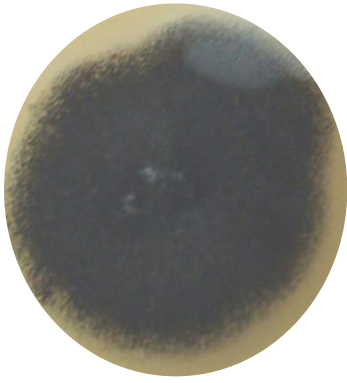
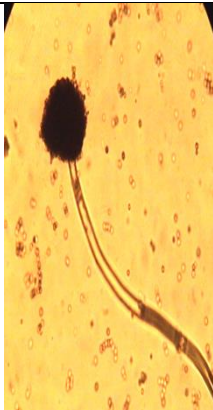
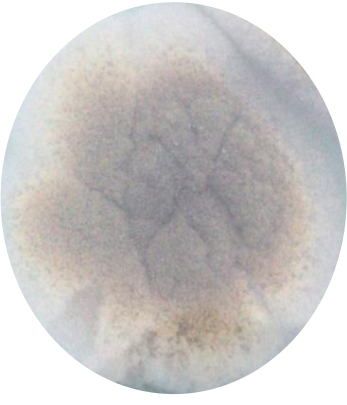
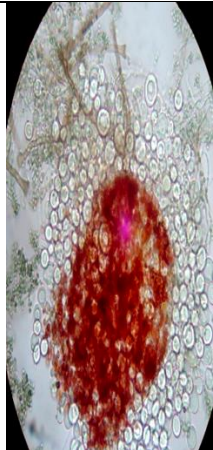


**Tableau 4** Isolats fongiques obtenus à partir des cinq échantillons de grains de maïs analysés

Moisissures isolées	Nombre total d'isolats	Pourcentage d'apparition (%)
<b><i>Aspergillus spp.</i></b>	<b>155</b>	<b>61,75</b>
<b><i>Aspergillus section Flavi</i></b>	<b>109</b>	<b>43,43 (70,32)*</b>
<i>A. flavus</i>	96	38,25 (61,93)*
<i>A. parasiticus</i>	13	5,18 (8,38)*
<b><i>Aspergillus section Nigri</i></b>	<b>36</b>	<b>14,34 (23,29)*</b>
<i>A. niger</i>	36	14,34 (23,29)*
<b><i>Aspergillus section Nidulantes</i></b>	<b>5</b>	<b>1,99(3,22)*</b>
<i>Emericella nidulans</i>	5	1,99 (3,22)*
<b><i>Aspergillus Section Versicolores</i></b>	<b>3</b>	<b>1.19 (1,93)*</b>
<i>Aspergillus sp.1</i>	1	0,4 (0,64)*
<i>Aspergillus sp.2</i>	2	0,8 (1,29)*
<b>Autres <i>Aspergillus</i></b>	<b>2</b>	<b>0,8 (1,29)*</b>
<i>Aspergillus sp.3</i>	1	0,4 (0,64)*
<i>Aspergillus sp.4</i>	1	0,4 (0,64)*
<b><i>Penicillium spp.</i></b>	<b>51</b>	<b>20,32</b>
<b><i>Fusarium spp.</i></b>	<b>38</b>	<b>15,14</b>
<b><i>Trichoderma spp.</i></b>	<b>3</b>	<b>1,19</b>
<b><i>Chrysonilia spp.</i></b>	<b>2</b>	<b>0,8</b>
<b><i>Rhizopus spp.</i></b>	<b>2</b>	<b>0,8</b>
<b>Total</b>	<b>251</b>	<b>100</b>

\* Les valeurs entre parenthèses représentent la fréquence des isolats par rapport au nombre total d'*Aspergillus* isolés.



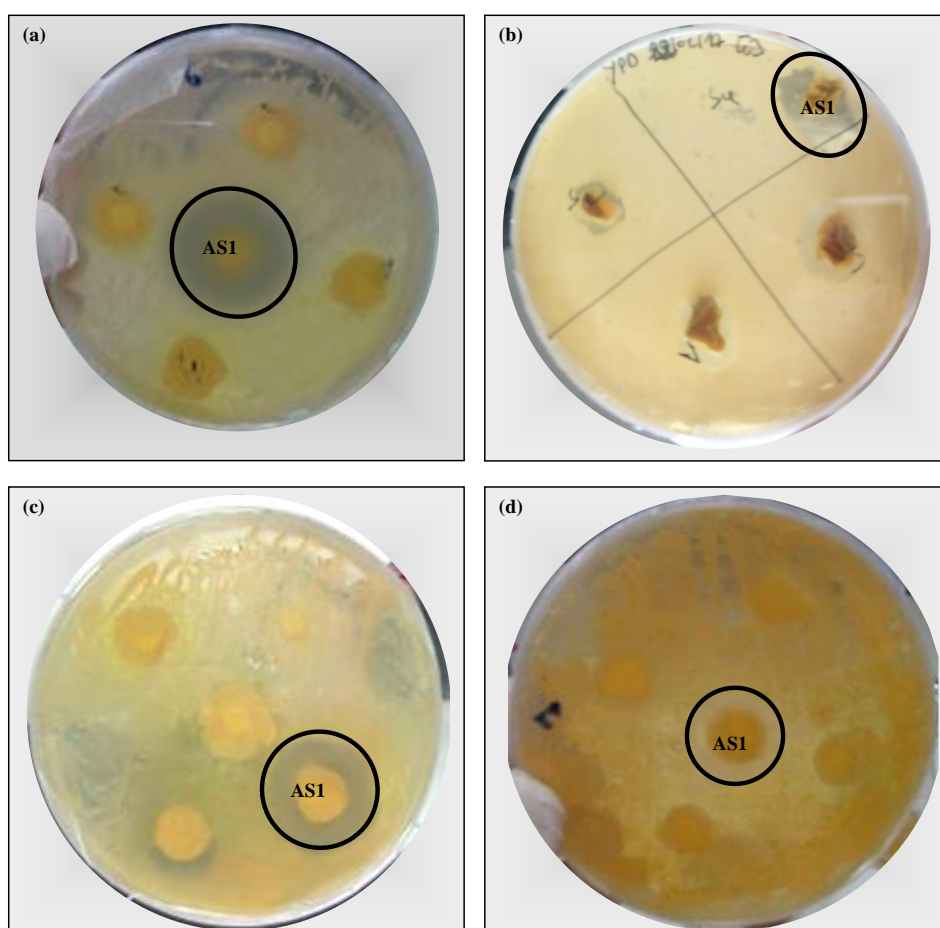
Tableau 5 Aspect morphologique des isolats d'*Aspergillus* obtenus à partir de maïs

Espèce	Aspect macroscopique	Aspect microscopique	Apparence
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>			Colonie vert-jaunâtre, duveteuse à poudreuse avec des contours blancs. Têtes aspergillaires globuleuses à deux rangs de métules et phialides insérés sur la totalité de la circonférence des têtes aspergillaires.
<i>Aspergillus</i> section <i>Nigri</i>			Colonie plane, granuleuse, de couleur noire. Conidiophores brunâtres et longs. Têtes aspergillaires bisériées, globuleuses et radiées.
<i>Aspergillus</i> section <i>Nidulantes</i>			Colonie basse, plate de couleur vert-sombre. Filaments conidiophores courts et sinueux de couleur brune. Ascospores rouges entourés par des cellules de Hülle.
<i>Aspergillus</i> section <i>Versicolores</i>			Colonie veloutée de couleur verte et jaune. Conidiophores lisses qui se terminent par vésicule ovale. Tête aspergillaire bisériée et radiée. Conidies échinulées de couleur verte.

### 3.2- Sélection d'isolat producteur de substances antimicrobiennes

Parmi les 155 isolats d'*Aspergillus*, seuls 5 isolats ont été retenus sur la base de leurs caractéristiques culturales peu commune. En effet, seule les espèces appartenant à la section *Versicolores* en l'occurrence un isolat d'*Aspergillus sp.1* (AS1) et deux isolats d'*Aspergillus sp.2* (AS2a et AS2b), *Aspergillus sp.3* (AS3) et *Aspergillus sp.4* (AS4) sont investiguées pour la sélection d'une souche potentiellement intéressante sur le plan activité biologique.

La recherche de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la technique des cylindres d'agar. Cette technique a permis d'obtenir des zones d'inhibition résultant de la synthèse de substances biologiques actives à effet antibactérien et / ou antifongique sur les germes test. En effet, sur les 5 isolats d'*Aspergillus* testés, la majorité des isolats n'ont montré aucun antagonisme vis-à-vis des germes test. En revanche, l'isolat *Aspergillus sp1.* (AS1) a été le seul qui a développé une activité antimicrobienne à l'égard de tous les germes testés (figure 13).



**Figure 13** Activité antimicrobienne de l'isolat AS1 vis-à-vis de : (a) *Staphylococcus epidermidis*, (b) *Candida albicans*, (c) *Staphylococcus aureus*, (d) *Chryseobacterium sp.*

Les zones d'inhibition les plus intéressantes ont été obtenues, chez la souche AS1, contre *Staphylococcus epidermidis* avec un diamètre de 21 mm, ensuite sur *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de 15 mm et enfin sur *Candida albicans* avec un diamètre de 13 mm. En revanche, l'activité la plus faible de l'isolat AS1 a été enregistrée contre *Chrysobacterium sp.* avec un diamètre d'inhibition inférieur à 6mm.

### 3.3-Identification de la souche fongique sélectionnée

#### 3.3.1- Etude macroscopique




L'étude des caractères macroscopiques de la souche sélectionnée AS1 a été faite sur trois milieux de culture gélosés (CYA, MEA et G25) suivant les recommandations de Pitt et Hocking, (2009) et Samson et *al.*, (2014). La souche AS1 a présenté une vitesse de croissance relativement lente. Après 7 jours d'incubation, le diamètre maximum enregistré est 28mm. L'aspect des colonies ainsi que leur description sont rassemblés dans le tableau 6.

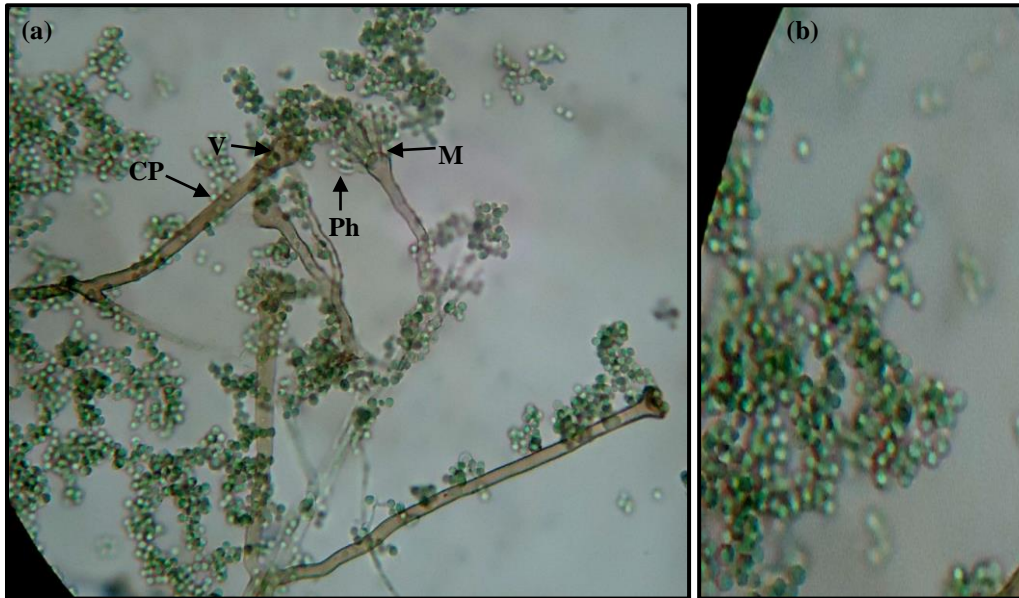
#### 3.3.2- Etude microscopique

L'observation microscopique de la souche sélectionnée AS1 a permis d'observer un mycélium cloisonné, des conidiophores de couleur brun-claire à paroi lisse et se terminent par une tête aspergillaire bisériée et radiée. Cette tête aspergillaire est formée d'une vésicule pyriforme qui porte sur toute sa surface des métules qui portent elles-mêmes des phialides. Les conidies sont rondes, vertes et à paroi légèrement rugueuse (figure14).

D'après ces critères macroscopiques et microscopiques et suivant l'étude de Jurjevik et *al.*, (2012), la souche sélectionnée **AS1** appartient à *Aspergillus* section **Versicolores**. Cette section comprend plusieurs espèces qui ne peuvent être correctement identifiées avec cette méthode. En effet, l'utilisation d'outils moléculaires est avérée indispensable pour l'identification complète de cette souche.

**Tableau 6** Aspect macroscopique de la souche sélectionnée (AS1) après 7 jours d'incubation à 25°C

Milieu	Aspect des boîtes	Description
CYA		<p>Colonie atteint 22 à 26 mm de diamètre, plane, de couleur brun-jaunâtre et bordure blanche. Absence de pigment soluble.</p>
MEA		<p>Colonie atteint 24 à 28 mm de diamètre, de texture duveteuse et couleur blanche devenant verdâtre avec un centre élevé. Absence de pigment soluble.</p>
G25N		<p>Colonie atteint 17 à 19 mm de diamètre, dense, de couleur blanche et jaune au centre. Absence de pigment soluble.</p>



**Figure 14** Aspect microscopique de la souche sélectionnée AS1 sous microscope optique (Gx40) :  
**(a)** Appareil végétatif ; **(b)** Conidies.

### 3.3.3- Identification moléculaire

L'analyse des séquences ITS, LSU et CALM réalisée par la Collection Allemande des Microorganismes et des Cultures Cellulaires a permis d'identifier la souche AS1 comme étant *Aspergillus creber* avec un pourcentage de similarité de 99% (Rapport en annexe 3). Les séquences ont été déposées au niveau de la base de données GenBank qui a fourni les numéro d'accession MH796366, pour les séquences ITS et LSU combinées (figure 15), et MH796367 pour le gène CALM (Figure 16).

```
CCTCCCACCCGTGACTACCTAACACTGTTGCTTCGGCGGGGAGCCCTCTCGGGGGCGAGCCGC
CGGGGACTACTGAACTTCATGCCTGAGAGTGATGCAGTCTGAGTCTGAATATAAAATCAGTCA
AAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAACTGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGCA
TTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCATCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGT
CGTCGTCCCCCCCCGGGGGACGGGCCCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGTGTCCGGTCTTCGAGC
GTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCGATTAGGGCCGGCCGGGCGCCAGCCGACGTCTCCAACCAT
TTTTTTCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCG
GAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAA
TTTGAATCTGGCCCCCTCCGGGGTCCGAGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGGTGCGGCC
CTGTCTAAGTGCCCTGGAACGGGCGTCAGAGAGGGTGAGAATCCCGTCTTGGGCAGGGTGC
CCGTGCCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTG
GTAATTTTCATCTAAAGCTAAATACCGGCCGGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGA
AAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAC AGCACGTGAAATTGTTGAAAG
```

**Figure 15** Séquence finale des régions ITS et LSU combinées

```

CCGACTCTTTGACTGAGGAGCAGGTTTCCGAATACAAGGAGGCCTTCTCCCTATTTGTAAGTGCCA
TTGATTCCATTGGTATCAATTAATAGCTTTTCCGGCAGGGTACTAATTTACTCTGCGCTTAACAG
GACAAGGATGGCGATGGTTAGTGTGCTTCCCGCGATAACTTAGTCGCATACGCCCAATGTCGACA
TCATAATTCTATGTAATTGGACATTGACACACGATTGAGGTCAGATCACTACCAAGGAGCTCGGC
ACCGTGATGCGCTCGCTCGGCCAGAACCCTTCAGAGTCTGAGCTTCAGGACATGATCAACGAAGT
CGACGCTGACAACAATGGCACCATTGATTTCCAGGTACGTGGCCTTGCAAGAATTAATAATGAT
CGTGAAATCGAACACCTTTTAACTGTCATTTAGAGTTCCTCACGATGATGGCTAGAAAGATGAAG
GACACCGACTCCGAGGAGGAAATTCGGGAGGCATTCAAGGTTTTTCGACCGTGATAACAATGGCTT
CATCTCGGCTGCCGAGCTGCGCCACGTCATGACCTCCATTGGTGAGAAGCTCACTGATGATGAAG
TCGACGAGATGATTTCGTGAGGCGGATCAGGATGGTGATGGCCGGATTGACTGTACGTTGGCTTCC
CCGATTATGATTTGACGGTCAGAAAAGATGCTAATTCTCAGCAGACAACGAATTCGTCCAACCTCA
TGATGCAAAAA
    
```

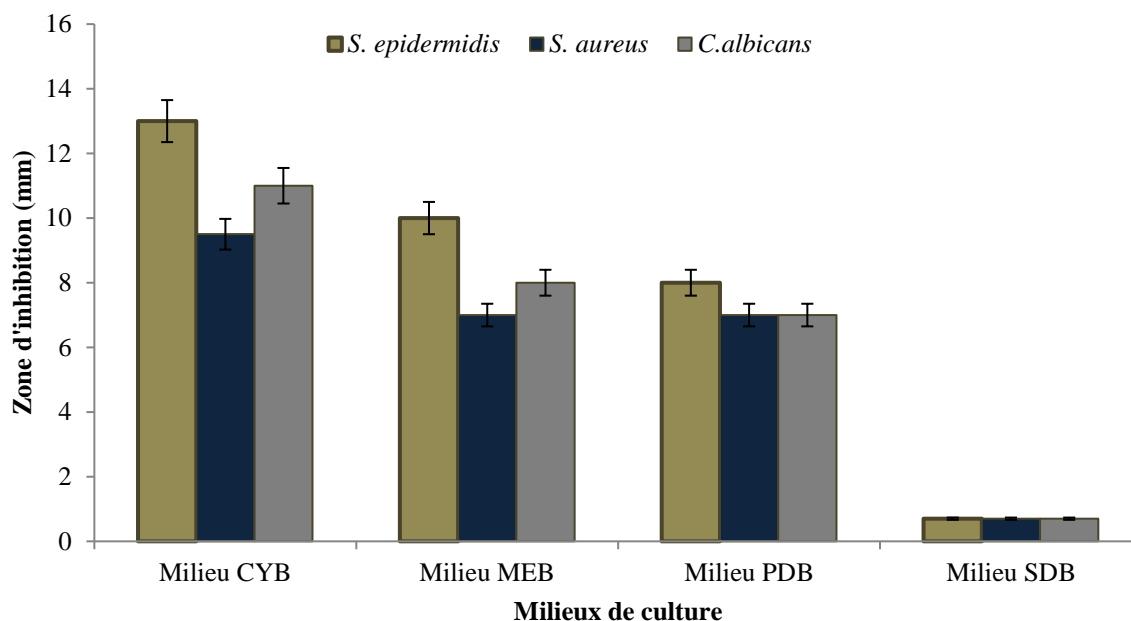
**Figure 16** Séquence finale d'une partie du gène codant pour la calmoduline

### 3.4- Production des substances bioactives par *Aspergillus creber*

#### 3.4.1- Choix du milieu de fermentation

Pour déterminer le milieu le plus favorable à la production des substances bioactives, une fermentation a été lancée sur quatre milieux liquides de nature différente (CYB, MEB, PDB et SDB). A la fin de la période de fermentation, la biomasse a été séparée aseptiquement par filtration sur papier Wattman N°1, le filtrat a été récupéré et son activité antimicrobienne a été testée, par la méthode des puits, en utilisant les germes test qui ont montré une sensibilité importante vis-à-vis de la souche sélectionnée en l'occurrence, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *Candida albicans*.

Les résultats révélés dans la figure 17 montrent que la meilleure activité antimicrobienne est obtenue lorsque la souche sélectionnée *A. creber* s'est développée sur le milieu CYB. En effet, le filtrat obtenu à partir du milieu CYB a montré une importante activité vis-à-vis de tous les germes test et les valeurs des diamètres de zones d'inhibition variaient entre 9 mm à 13 mm. *S. epidermidis* a montré la sensibilité la plus importante avec un diamètre de 13 mm. Par contre, *S. aureus* était la souche la plus résistante avec un diamètre d'inhibition de 10 mm. Par ailleurs, sur les milieux MEB et PDB, l'activité biologique produite n'était pas significative, révélée par la faiblesse de diamètres de zones d'inhibition qui variaient entre 7 et 10 mm. En revanche, une activité antimicrobienne négligeable a été produite sur le milieu SDB.



**Figure 17** Evaluation de l'activité antimicrobienne de l'isolat *Aspergillus creber* produite sur différents milieux de culture.

Considérant les résultats obtenus, le milieu **CYB** a été sélectionné comme le milieu le plus adapté à la production des substances bioactives par la souche sélectionnée en l'occurrence, *Aspergillus creber*.

### 3.4.2- Cinétique de la production des substances antimicrobiennes par *Aspergillus creber*

Cette étape a été réalisée afin de suivre la biomasse microbienne ainsi que la cinétique de production des métabolites à effet antimicrobien en fonction du temps dont le but est de déterminer le temps d'incubation nécessaire à cette production. L'activité antimicrobienne a été testée sur les germes les plus sensibles révélée précédemment, à savoir : *S. epidermidis*, *S. aureus* et *C. albicans* (section 3.2).

Les résultats obtenus ont montré que l'activité antimicrobienne du filtrat d'*A. creber* est, plus ou moins, importante vis-à-vis de *S. epidermidis* en comparaison aux autres germes testés. En effet, les résultats présentés par la figure 18 révèlent une activité antimicrobienne très faible au cours de la phase exponentielle (un maximum de 5 mm) où le poids sec du mycélium atteint sa valeur maximale de 6,115 g/l. Ensuite, cette activité augmente d'une façon significative à partir du 10<sup>ème</sup> jour au fur et à mesure avec la stabilisation du poids sec de

mycélium ce qui correspond la phase stationnaire. L'activité antimicrobienne atteint sa valeur maximale (15 mm vis-à-vis de *S. epidermidis*) au bout du 15<sup>ème</sup> jour lorsque le poids sec du mycélium enregistre une légère diminution (5,824 g/l). Après 16 jours de fermentation, une diminution de l'activité antimicrobienne a été notée (de 14 mm à 12 mm) en relation avec la diminution du poids sec de mycélium (5,211 g/l) ce qui correspond à la phase de déclin.

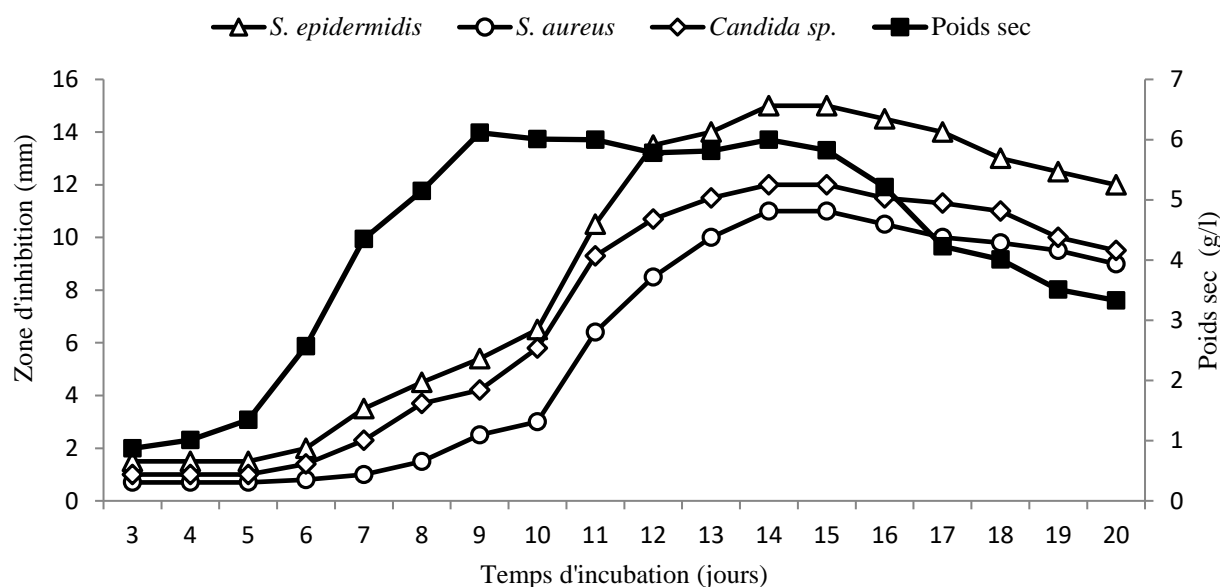


Figure 18 Cinétique de croissance et de la production des substances antimicrobiennes

En effet, il a été constaté que la production des substances antimicrobiennes par *A. creber* a eu lieu durant toutes les phases de croissance. Cependant, les maxima de production ont été détectés durant la phase stationnaire. En effet, une période d'incubation de 15 jours a été prise en considération pour la suite du travail.

### 3.5- Production et extraction des substances bioactives

La production des substances bioactives par la souche d'*A. creber* a été effectuée sur le milieu CYB qui s'est avéré le milieu le plus favorable pour la production de ces molécules (section 3.4.1) et durant un temps d'incubation de 15 jours (section 3.4.2).



En effet, après la mise en culture de l'isolat sur milieu CYB pendant 15 jours à 28°C, le filtrat a été récupéré par filtration. Une extraction a été, ensuite, effectuée par l'acétate d'éthyle. La phase organique obtenue a été évaporée et l'extrait brut a été récupéré et pesé. L'EAc obtenu, de couleur marron, a été, ensuite, dissous dans du méthanol afin d'évaluer ses activités antimicrobienne et antioxydante.

### 3.6- Evaluation de l'activité antimicrobienne

Dans cette partie du travail, l'activité antimicrobienne de l'EAc obtenu a été évaluée qualitativement vis-à-vis d'une gamme de microorganismes multi-résistants (bactéries et levures) d'origine clinique en utilisant la méthode de diffusion sur gélose. Dans cette méthode, la sensibilité des souches testées vis-à-vis de l'EAc s'est traduit par la formation d'une zone claire autour des disques. Par la suite, cette activité a été évaluée quantitativement, par la méthode de microdilutions sur milieu liquide basée sur la détermination de la concentration la plus faible de l'EAc qui inhibe complètement la croissance des souches testées (CMI).

#### 3.6.1- Détermination du pouvoir antimicrobien par la méthode de diffusion sur gélose

Les résultats de l'activité antibactérienne ont montré que l'EAc de la souche *A. creber* a une importante activité contre les bactéries à Gram positif en comparaison avec celle des bactéries à Gram négatif. En effet, la plus forte activité antibactérienne a été enregistrée contre la souche de SERM avec un diamètre de zone d'inhibition de 14 mm suivi par la souche SAPB avec une zone d'inhibition de 12,8 mm. *S. typhi* et *K. pneumoniae* se sont montrées moins sensibles avec des zones d'inhibition de 8.5 mm et 10 mm de diamètre respectivement. Cependant, l'EAc de la souche *A. creber* n'a montré aucune activité contre *E. coli* et *P. aeruginosa*.

Par ailleurs, l'EAc d'*A. creber* a montré également une importante action anti-*Candida* vis-à-vis des souches de *Candida* testées. En effet, la plus forte activité observée induit une zone d'inhibition de 20,6 mm de diamètre (Figure 19). L'ensemble des résultats sont récapitulés dans le Tableau 7.

Il est à signaler que, à titre de comparaison, la sensibilité des souches bactériennes à l'antibiotique de référence, le chloramphénicol, a été, aussi, testée et les diamètres de zones d'inhibition se sont situées entre 19,2 et 25 mm.

Par ailleurs, les souches de *C. albicans* et *C. glabrata* ont montré des zones d'inhibition de 22,8 et 25,7 mm respectivement vis-à-vis de l'antifongique de référence la kétoconazole.

**Tableau 7** Diamètres de zones d'inhibition de l'extrait d'acétate d'éthyle vis-à-vis des microorganismes pathogènes.

Zone d'inhibition (mm) <sup>a</sup>		
Microorganismes test	Extrait brut de la culture fongique	Contrôle positif <sup>b</sup> substances de référence
<i>E. coli</i>	0	23,4 ± 0,3
<i>K. pneumonia</i>	10,0 ± 0,3	25,0 ± 0,4
<i>P. aeruginosa</i>	0	20,8 ± 0,4
<i>S. typhi</i>	8,5 ± 0,6	21,5 ± 0,3
SABL <sup>c</sup>	12,8 ± 0,3	19,8 ± 0,2
SERM <sup>d</sup>	14,0 ± 0,2	19,2 ± 0,2
<i>C.albicans</i>	20,6 ± 0,8	22,8 ± 0,4
<i>C.glabrata</i>	13,0 ± 0,3	25,7 ± 0,5

a: écart type de trois répétition (±).

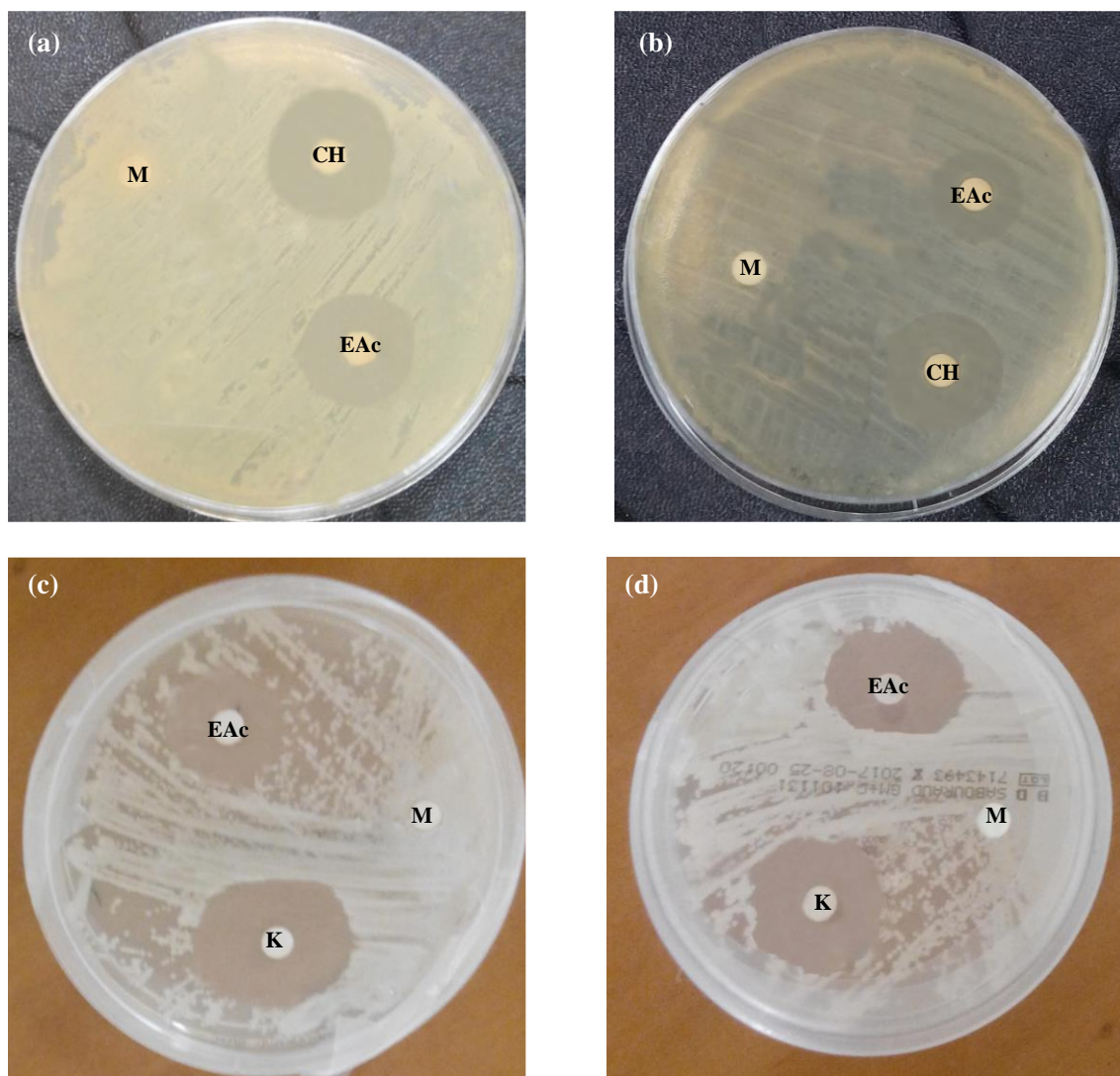
b: chloramphénicol et kétoconazole ont été utilisés comme contrôles positifs pour les bactéries et les levures respectivement.

c: *Staphylococcus aureus* producteur de bêta-lactamase.

d: *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline.

0: absence de zone d'inhibition.

Au terme de cette partie, il est à noter que les résultats obtenus sont très intéressants et confirment que, *A. creber* a un pouvoir antimicrobien assez conséquent. En effet, cet isolat (*A. creber*) possède un pouvoir antibactérien sur des bactéries multi-résistantes à Gram positif ainsi qu'un pouvoir antifongique notamment sur *Candida albicans*.



**Figure 19** Activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle de la culture d'*Aspergillus creber* vis-à-vis des microorganismes pathogènes. (a) *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline; (b) *Staphylococcus aureus* producteur de la bêta lactamase; (c) *Candida glabrata*; (d) *Candida albicans*. EAc : disque contenant l'extrait d'*A. creber* (2mg/mL); CH : disque de chloramphénicol (20µg/mL); K : disque de kétoconazole (20µg/mL); M : disque de méthanol absolu.

### 3.6.2- Détermination de la concentration minimale inhibitrice

Les valeurs de CMI ont été déterminées par la méthode de microdilution en milieu liquide. En effet, les souches microbiennes qui ont fait l'objet de la recherche de CMI sont celles qui se sont montrées sensibles à l'EAc d'*A. creber* (méthode de diffusion sur gélose), en l'occurrence: *K. pneumonia*, SERM, SABL, *S. typhi*, *C. albicans* et *C. glabrata*.

Les valeurs de CMI déterminées pour chaque souche testée sont rapportées dans le Tableau 8. En effet, les souches testées ont été sensibles à des CMI comprises entre 0,325 et 5 mg/mL. *C. albicans* a été la souche la plus sensible avec la valeur de CMI de 0,325 mg/mL, suivie par les bactéries multi-résistantes à Gram positives (SERM et SABL) avec une valeur de CMI égale à 0,625 mg/mL. La souche la plus résistante a été *S. typhi* qui a nécessité une CMI égale à 5 mg/mL pour son inhibition.

**Tableau 8** CMI de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber* vis-à-vis les microorganismes sensibles.

Microorganisms test	CMI (mg/mL)
<i>K. pneumonia</i>	2,5
<i>S. typhi</i>	5
SAPB <sup>a</sup>	0,625
SERM <sup>b</sup>	0,625
<i>C. albicans</i>	0,325
<i>C. glabrata</i>	1, 25
Chloramphénicol	32 <sup>c</sup>
Kétoconazole	12 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>: *Staphylococcus aureus* producteur de bêta-lactamase.

<sup>b</sup>: *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline.

<sup>c</sup> : CMI en µg/mL

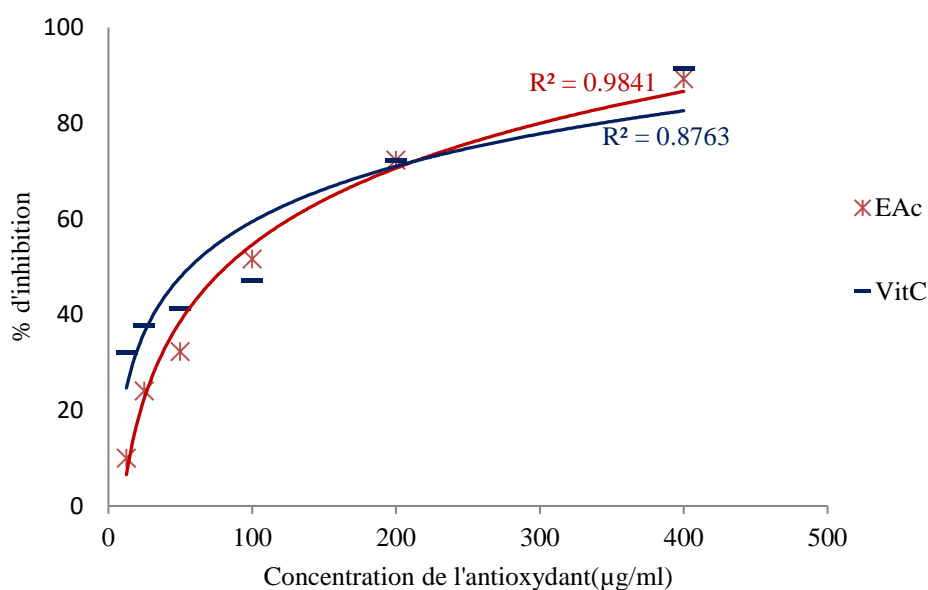
### 3.7- Evaluation de l'activité antioxydante

L'AO exprime la capacité de réduction des radicaux libres. A travers l'étude bibliographique, il apparait clairement qu'une seule méthode n'est pas suffisante pour caractériser les potentialités antioxydantes des principes actifs. De ce fait, il s'avère que l'utilisation de plusieurs tests d'évaluation des AO, est plus qu'indispensable pour la fiabilité des résultats. A cet effet, trois méthodes ont été utilisées pour évaluer l'AO *in vitro* de l'EAc d'*A. creber* à savoir : DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur de fer.

### 3.7.1- Test DPPH

L'AO de l'EAc d'*A. creber* vis-à-vis du radical DPPH<sup>\*</sup> a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la décoloration de la solution radicalaire DPPH<sup>\*</sup> à 517nm. Lorsqu'il est piégé par des substances antiradicalaires, la forme réduite (DPPH-H) attribue à la solution une coloration jaune pâle. En effet, cette décoloration est représentative de la capacité des composés de l'EAc à piéger ce radical libre.

Une gamme de concentration de l'EAc analysé a été réalisée allant de 12.5 à 400 µg/mL. Les résultats du pouvoir antioxydant exprimé en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH ont révélé que l'EAc d'*A. creber* a une activité antioxydante dose dépendante, le pourcentage d'inhibition du DPPH<sup>\*</sup> augmente avec l'augmentation des concentrations de l'extrait (figure 20). A une concentration de 400 µg/mL, l'EAc d'*A. creber* a montré une activité importante avec un pourcentage d'inhibition de  $89,82 \pm 0,32\%$ . Cette activité est proche de celle de l'acide ascorbique, utilisé comme antioxydant de référence, qui a révélé un pourcentage d'inhibition de  $91,39 \pm 0,21\%$  à la même concentration.

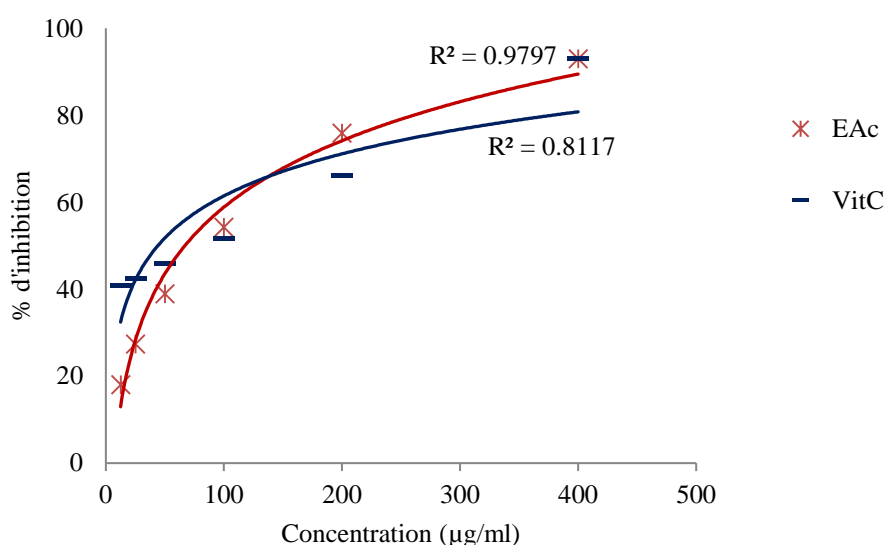


**Figure 20** Pourcentages d'inhibition du radical libre DPPH<sup>\*</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'*A. creber* et de l'acide ascorbique : EAc ; Extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber*, VitC ; Acide ascorbique (Vitamine C).

### 3.7.2- Test ABTS

Dans ce test, l'AO de l'EAc d'*A. creber* a été évaluée spectrophotométriquement en suivant la réduction du radical cation ABTS<sup>•+</sup>.

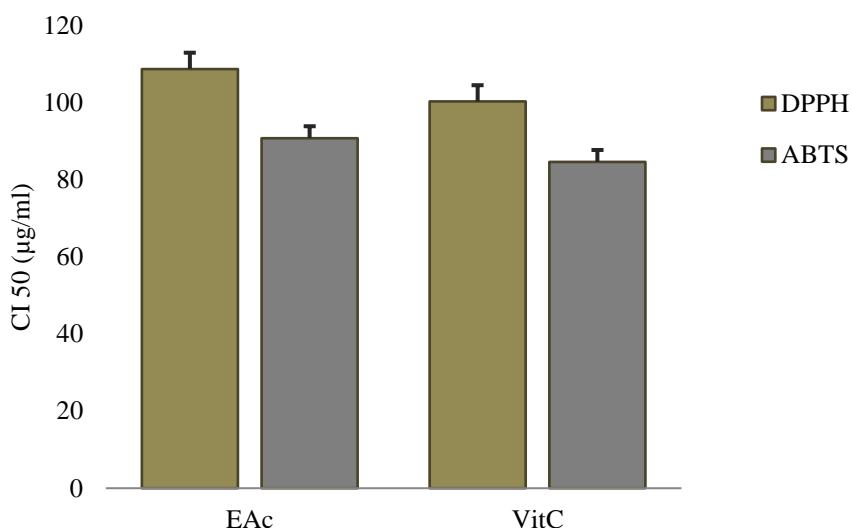
Une gamme de concentration a été faite allant de 12,5 à 400 µg/mL. La figure 21 montre que le radical cation ABTS<sup>•+</sup> est inhibé de manière dose dépendante par l'EAc d'*A. creber*. Comme pour le test DPPH, à une concentration de 400 µg/mL l'EAc a montré une activité antiradicalaire importante ( $92,93 \pm 0,30\%$ ), très proche de celle de l'acide ascorbique  $93,04 \pm 0,46\%$ . Cela indique l'efficacité de l'EAc d'*A. creber* à réduire le radical ABTS<sup>•+</sup>.



**Figure 21** Pourcentages d'inhibition du radical ABTS<sup>•+</sup> en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'*A. creber* et de l'acide ascorbique. EAc : Extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber*, VitC : Acide ascorbique (Vitamine C).

### 3.7.3- CI50 sur les radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup>

Pour mieux caractériser l'AO, la concentration de l'EAc nécessaire pour inhiber 50% des radicaux libres (DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup>), a été calculée par régression linéaire des pourcentages d'inhibition calculés en fonction des différentes concentrations de l'EAc (figure 22). Les CI50 de l'EAc d'*A. creber* et de l'acide ascorbique ont été déterminés pour les deux tests DPPH et ABTS.



**Figure 22** Valeurs de CI50 de l'extrait d'*A. creber* et de l'acide ascorbique par la méthode de piégeage du radical DPPH<sup>•</sup> et celle du radical ABTS<sup>•+</sup>. EAc : Extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber*, VitC : Acide ascorbique (Vitamine C).

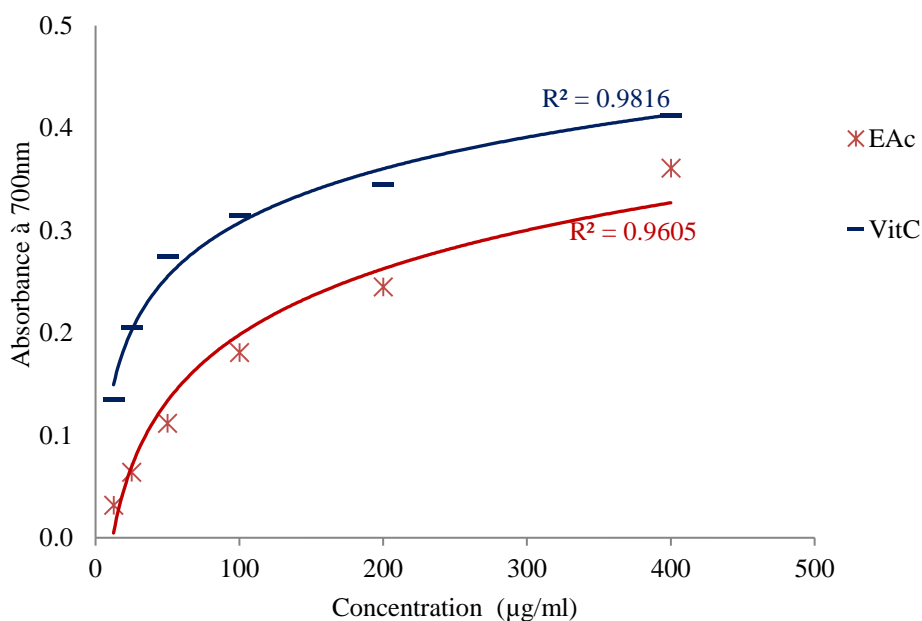
Dans les deux tests, l'extrait d'*A. creber* a montré des CI50 proches de celle de l'antioxydant naturel, l'acide ascorbique avec des valeurs respectives de  $108,76 \pm 1,02 \mu\text{g}/\text{mL}$  et  $100,33 \pm 1,14 \mu\text{g}/\text{mL}$  (test DPPH), et  $90,82 \pm 0,61 \mu\text{g}/\text{mL}$  et  $84,66 \pm 0,95 \mu\text{g}/\text{mL}$  (test ABTS).

### 3.7.4- Pouvoir réducteur du fer

Cette technique permet de mesurer la réduction du fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) en présence d'un antioxydant. Le  $\text{Fe}^{2+}$  peut être évalué en mesurant l'augmentation de la densité de la couleur bleu-verte dans le milieu réactionnel à 700 nm.

En effet, la même gamme de concentration utilisée précédemment, pour les tests DPPH et ABTS, a été utilisée pour évaluer le pouvoir réducteur du fer de l'EAc d'*A. creber*. Les valeurs obtenues ont été comparées avec l'absorbance de l'acide ascorbique. L'augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur (figure 23).

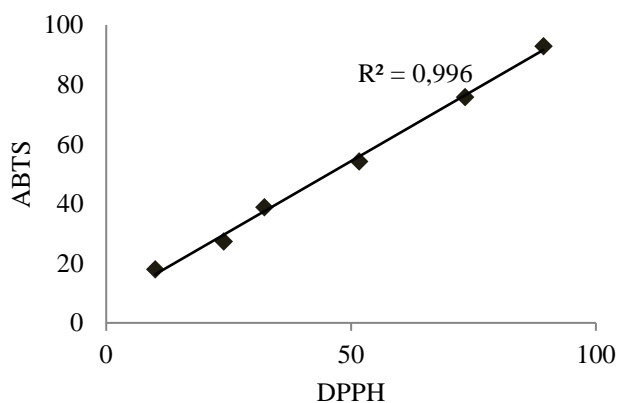
Les résultats obtenus ont montré que l'augmentation de la réduction du fer est proportionnelle aux concentrations utilisées. Pour les concentrations 12,5- 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , l'acide ascorbique a représenté un pouvoir réducteur supérieur par rapport à l'EAc d'*A. creber*. Cependant, à la concentration de 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , le pouvoir réducteur de l'extrait ( $A=0,361$ ) est légèrement inférieur par rapport à l'acide ascorbique ( $A=0,412$ ). Ceci dénote d'un pouvoir réducteur plus important de l'EAc d'*A. creber*.



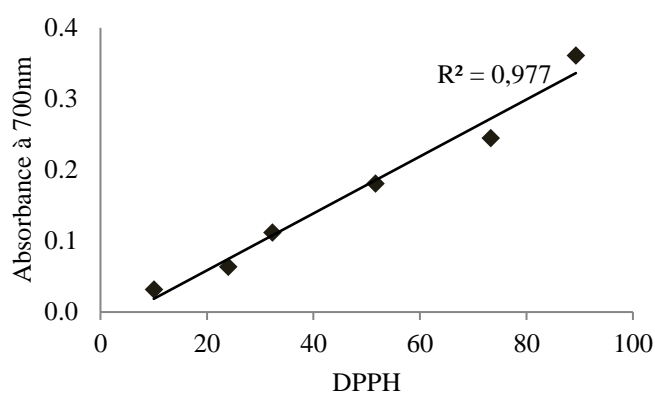
**Figure 23** Pouvoir réducteur en fonction des différentes concentrations de l'extrait d'*A. creber* et de l'acide ascorbique. EAc : Extrait d'*A. creber*, VitC : Acide ascorbique (Vitamine C).

### 3.7.5- Corrélation entre les tests DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur de fer

Une étude a été faite statistiquement pour déterminer une éventuelle relation entre les AO obtenues par les trois tests (DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur). Cette analyse a montré une très bonne corrélation positive entre les trois techniques utilisées (figure 24, 25 et 26) comme le démontre les valeurs du coefficient de détermination ( $R^2$  0,977, 0,986, 0,996).

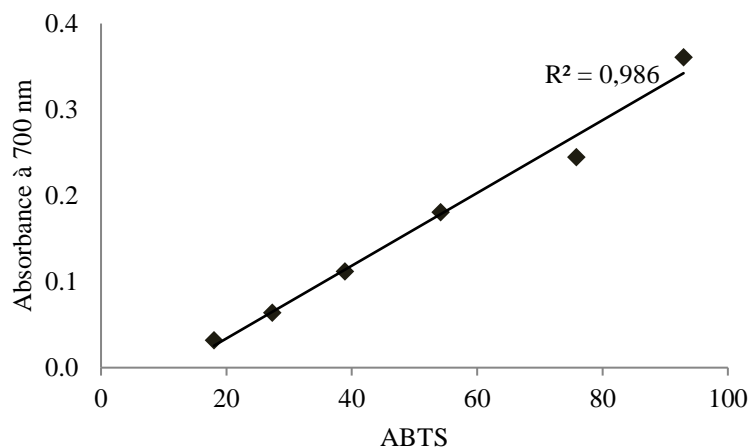


**Figure 24** Corrélation entre le test DPPH et ABTS



**Figure 25** Corrélation entre le test DPPH et le pouvoir réducteur de fer



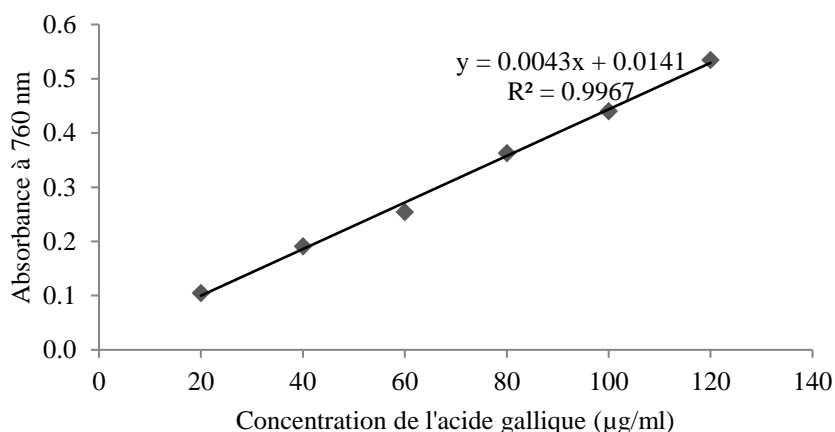


**Figure 26** Corrélation entre le test ABTS et le pouvoir réducteur du fer

### 3.7.6- Dosage des polyphénols totaux

L'EAc d'*A. creber* a été analysé quantitativement par spectrophotomètre UV-visible pour son contenu en PT. En effet, le dosage des PT a été effectué par la méthode de Folin-Ciocalteu. En présence des polyphénols, le complexe Folin-Ciocalteu change sa couleur du jaune au bleu, ce qui permet de mesurer l'intensité de la couleur à une longueur d'onde de 760 nm. Par la suite, la teneur en PT a été calculée à partir de l'équation de régression linéaire de la courbe d'étalonnage élaborée par une solution standard de l'acide gallique. La formule de la régression linéaire de cette courbe est de  $y = 0,004 x + 0,014$  avec un coefficient de détermination  $R^2$  égal à 0,996 (figure 27).

Les résultats sont exprimés en milligrammes d'équivalent en acide gallique par gramme d'extrait sec (mg EAG/g). L'EAc d'*A. creber* a révélé une teneur très élevée en PT ( $85,76 \pm 0,96$  mg EAG/g).

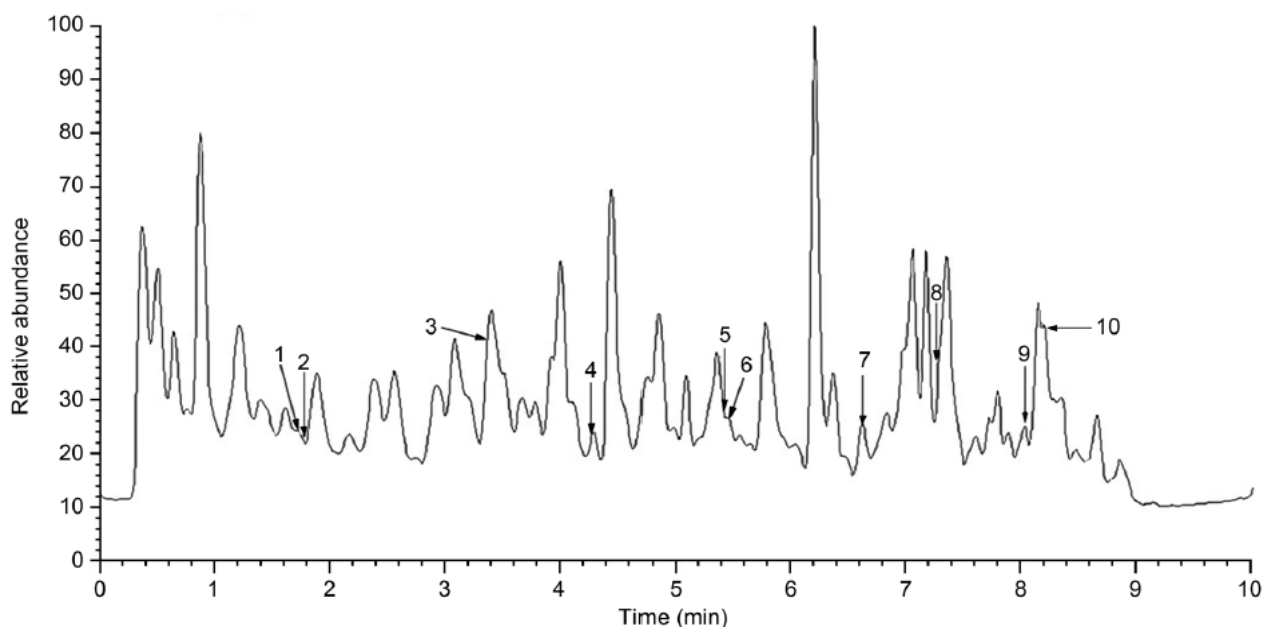


**Figure 27** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

### 3.8- Identification des métabolites par UHPLC- HRMS/MS

A la fin de la période de fermentation, l'extraction des molécules bioactives a été faite par l'acétate d'éthyle. L'extrait brut obtenu a été analysé par UHPLC HRMS/MS. Le choix de cette méthode d'analyse a été motivé par l'opportunité de non seulement séparer les molécules existant dans l'extrait mais aussi de déterminer leurs formules brutes, leurs masses expérimentales exactes et les masses de leurs fragments. Les analyses en couplage LC-MS<sup>n</sup> a fourni deux types de spectres : des spectres ioniques totaux donnant la composition ionique des pics chromatographiques et des spectres de fragmentations MS<sup>2</sup> pour les composés majoritaires détectés. Donc, l'identification de ces molécules s'est basée essentiellement sur deux paramètres ; la masse mono-isotopique et l'observation de fragmentations caractéristiques.

L'analyse des données obtenues a permis de donner les formules brutes des 10 métabolites détectés (C1-C10) et de proposer le nom de cinq métabolites comme étant: Asperlactone (**C1**), Emodine (**C5**), Stérigmatocystine (**C7**), Deoxybrévianamide E (**C9**) et Acide norsolorinique (**C10**). Le chromatogramme reconstruit à partir des courants ioniques extraits (XIC) les plus abondants est illustré dans la figure 28. Les ions de fragmentation obtenus par MS<sup>2</sup> sont répertoriés dans l'annexe 4.



**Figure 28** Chromatogramme de courants ioniques extraits (XIC) les plus abondants de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber* par la technique de UHPLC-HRMS. **1** : Asperlactone, **2** : Composé 2, **3** : composé 3, **4** : composé 4, **5** : émodine, **6** : composé 6, **7** : stérigmatocystine, **8** : composé 8, **9** : deoxybrévianamide E, **10** : acide norsolorinique.

Le tableau 9 présente tous les métabolites qui ont été identifiés avec l'ensemble des données collectées ayant permis leur identification. Ce tableau comprend également à titre indicatif les données de spectrométrie de masse de 5 métabolites non identifiés : Ces molécules ont montré des masses mono isotopiques correspondant, selon la littérature, à l'aspergillomarasmine A, Aspionène, Ophiboline A, Gliotoxine et Citrinine. Cependant, les spectres de fragmentations obtenues par MS<sup>2</sup> n'ont pas été similaires à ceux décrites dans la littérature pour ces mêmes molécules, ce qui signifie que *A. creber* isolé dans ce travail ne produit pas ces molécules présumées, en revanche, il s'agit très probablement des nouvelles molécules.

**Tableau 9** Métabolites d'*Aspergillus creber* identifiés par UHPLC-HRMS/MS

Pic N°	Tr	Adduction	Masse calculée (m/z)	Masse théorique (m/z)	Δppm	MS/MS	Formule brute	Molécule proposée	Références
1	1.73	[M+H] <sup>+</sup>	185.08081	185.08084	-0.162	141.05444, 113.05948	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub>	Asperlactone	(Vishwanath et al. 2009)
2	1.78	[M+Na] <sup>+</sup>	211.06121	211.06108	0.616	195.03455, 133.02816	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	NI	-
3	3.38	[M+H] <sup>+</sup>	308.10992	308.10884	3.505	280.95587, 145.10104	C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	NI	-
4	4.28	[M+H] <sup>+</sup>	327.04734	327.04677	1.743	309.18594, 191.15396	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	NI	-
5	5.42	[M+H] <sup>-</sup>	269.04590	269.04555	1.301	ND	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	Emodine	(Lehner et al. 2012; Micheluz et al. 2016 ; Sulyok et al. 2007)
6	5.49	[M+H] <sup>+</sup>	251.09145	251.09140	0.199	233.09526, 204.09319	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	NI	-
7	6.62	[M+H] <sup>+</sup>	325.07053	325.07066	-0.400	ND	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Stérigmatocystine	(Lehner et al. 2012; Micheluz et al. 2016)
8	7.27	[M+Na] <sup>+</sup>	423.25041	423.25058	-0.402	405.27911, 239.14821	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>4</sub>	NI	-
9	8.04	[M+H] <sup>+</sup>	352.20352	352.20195		ND	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	Déoxybrevianamide E	(Lehner et al. 2012; Micheluz et al. 2016)
10	8.24	[M+H] <sup>-</sup>	369.09892	369.09798	2.547	ND	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>	Acide norsolorinique	(Micheluz et al. 2016)

Tr : temps de rétention ;

[M+H]<sup>+</sup>: mode positif;

[M+H]<sup>-</sup>: mode negative;

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem ;

ND : non déterminé ;

NI : non identifié.

### 3.8.1- Identification du composé C1

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique (tr=1,73 min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  185,08 et un adduit de sodium  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  207,06 ce qui correspond à une formule brute  $C_9H_{12}O_4$  (Figure 29). La comparaison des spectres de fragmentation obtenus par  $MS^2$  de cet ion et celle de la littérature indique que ce composé est l'asperlactone.

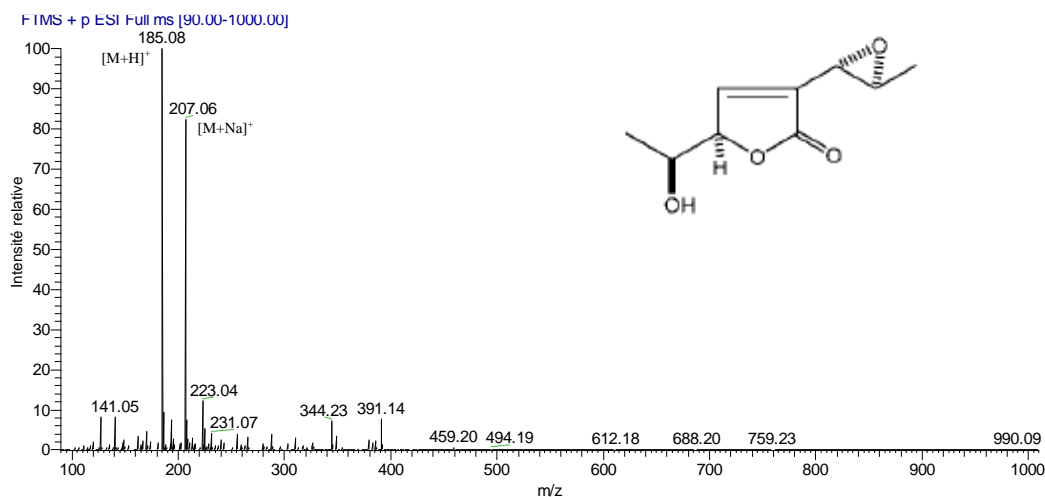


Figure 29 Spectre de masse MS en mode positif du composé C1

### 3.8.2- Identification du composé C2

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique (tr=1,78 min) contenant un ion majoritaire à  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  211,09 et une formule brute  $C_9H_{16}O_4$  (Figure 30). Ces données caractérisent la molécule de l'aspionène. Cependant, la fragmentation de cet ion donne des fragments différents à ceux décrits dans la littérature.

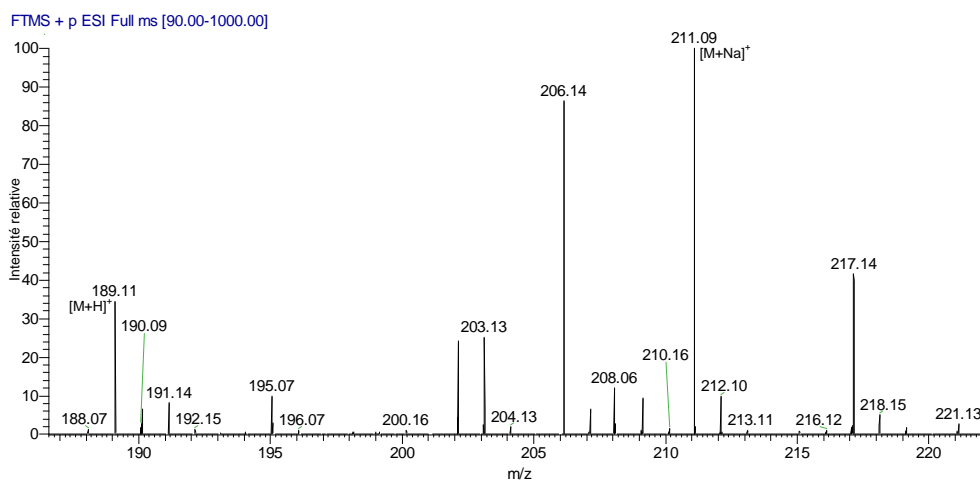


Figure 30 Spectre de masse MS en mode positif du composé C2

### 3.8.3- Identification du composé C3

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=3,38$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  308,10 ce qui correspond à une formule brute  $C_{10}H_{17}N_3O_8$  (figure 31). Cette masse correspond à celle de l'aspergillomarasmine A. La comparaison des spectres de fragmentation générés par cet ion et celle de la littérature indique qu'il s'agit d'une molécule différente.

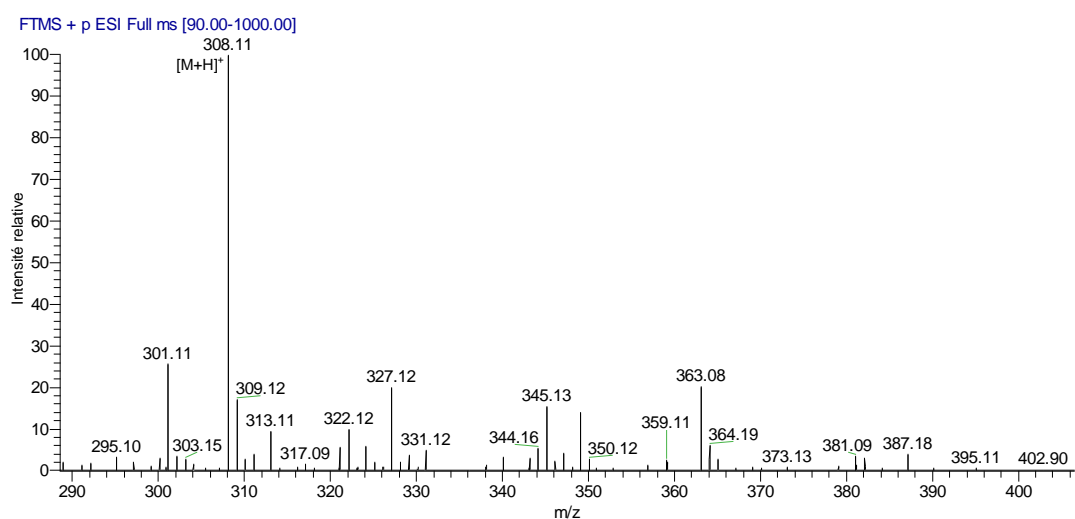


Figure 31 Spectre de masse MS en mode positif du composé C3

### 3.8.4- Identification du composé C4

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=4,28$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  327,05 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{13}H_{14}H_2O_4S_2$  (figure 32). Cette masse correspond à celle de la Gliotoxine. Cependant, les spectres de fragmentation obtenus par  $MS^2$  de cet ion sont différents à ceux mentionnés dans la littérature ce qui signifie qu'il s'agit d'une autre molécule.

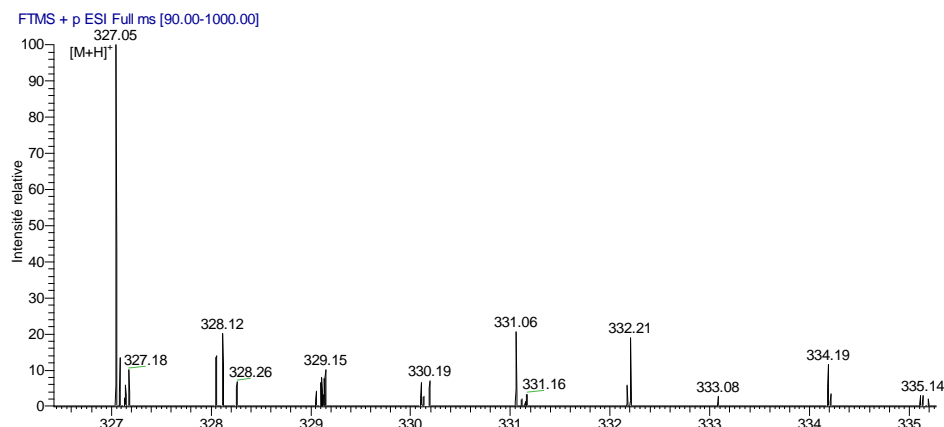


Figure 32 Spectre de masse MS en mode positif du composé C4

### 3.8.5- Identification du composé C5

L'analyse MS en mode négatif a montré un pic chromatographique ( $t_r=5,42$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^-$  de  $m/z$  269,05 ce qui correspond à une formule brute  $C_{15}H_{10}O_5$  (figure 33). Cette masse mono isotopique correspond à celle de l'émodyne avec 1,301ppm.

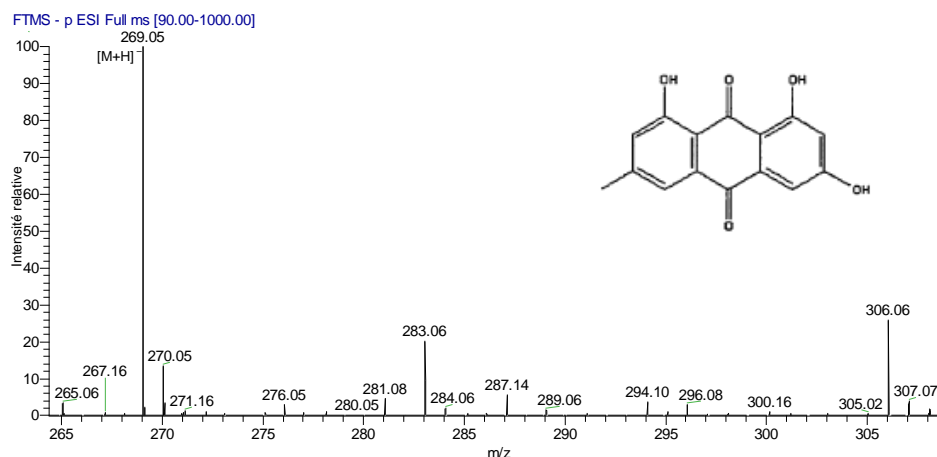


Figure 33 Spectre de masse MS en mode négatif du composé C5

### 3.8.6- Identification du composé C6

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=5,49$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  251,09 et un adduit de sodium  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  273,07 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{13}H_{14}O_5$  (figure 34). Cette masse correspond à celle de la citrinine. Cependant la fragmentation de cet ion donne des masses différentes à celles décrites pour la citrinine.

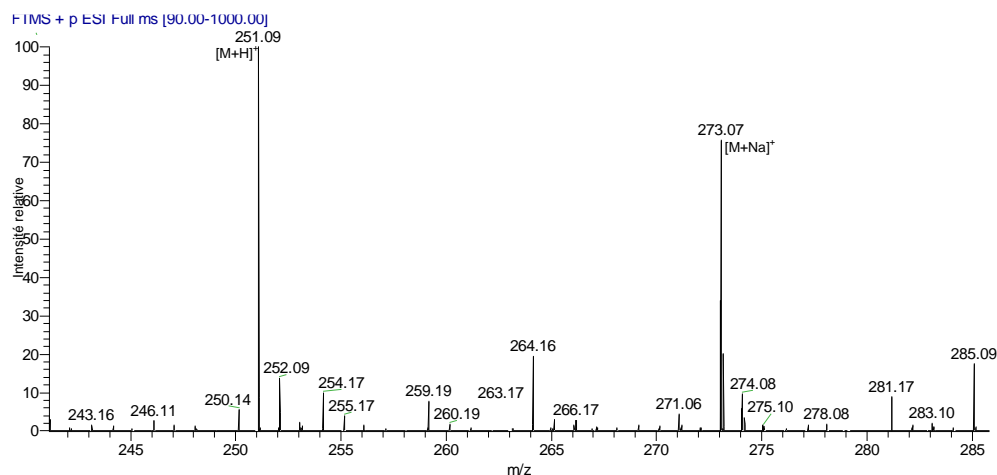


Figure 34 Spectre de masse MS en mode positif du composé C6

### 3.8.7- Identification du composé C7

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=6,62$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  325,07 et un adduit de sodium de 347,05 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{18}H_{12}O_6$  (figure 35). Cette masse est correspond à celle de la stérigmatocystine (STC).

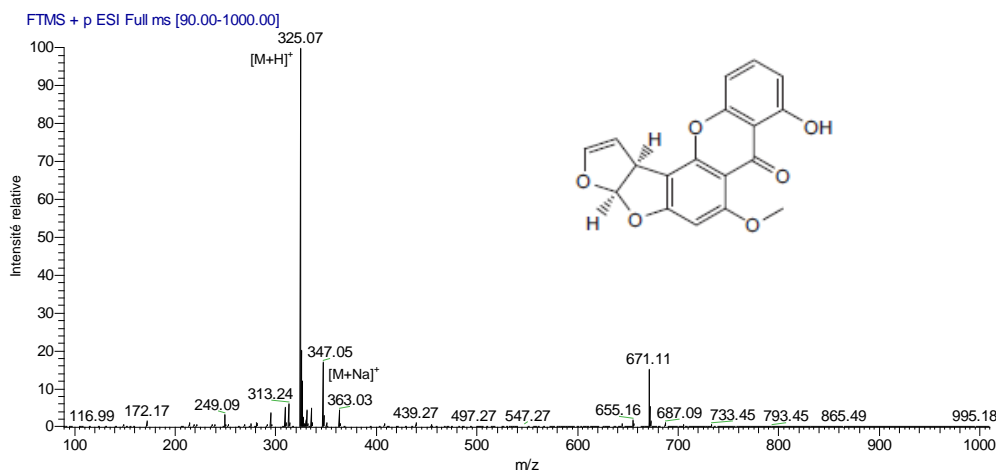


Figure 35 Spectre de masse MS en mode positif du composé C7

### 3.8.8- Identification du composé C8

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=7,27$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+Na]^+$  de  $m/z$  423,25 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{25}H_{36}O_4$  (figure 36). L'étude des fragments générés par cet ion indique que ce composé est l'ophiobolin A. La comparaison des spectres de fragmentation obtenus par LC-MS<sup>2</sup> de cet ion et celle de la littérature indique que ce n'est pas l'ophioboline A.

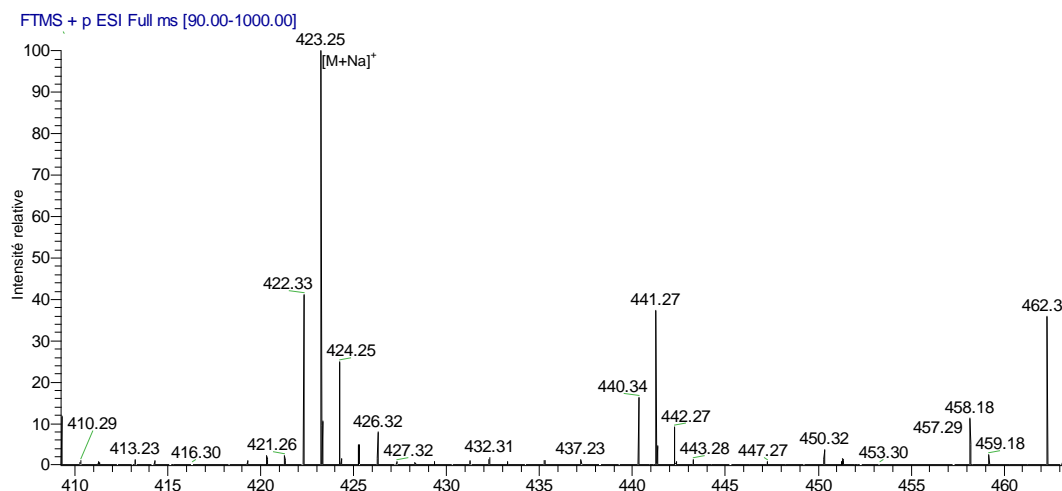


Figure 36 Spectre de masse MS en mode positif du composé C8



### 3.8.9- Identification du composé C9

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=8,04$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  352,20 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{21}H_{25}N_3O_2$  (figure 37). Cette masse correspond à celle de la deoxybrévianamide E.

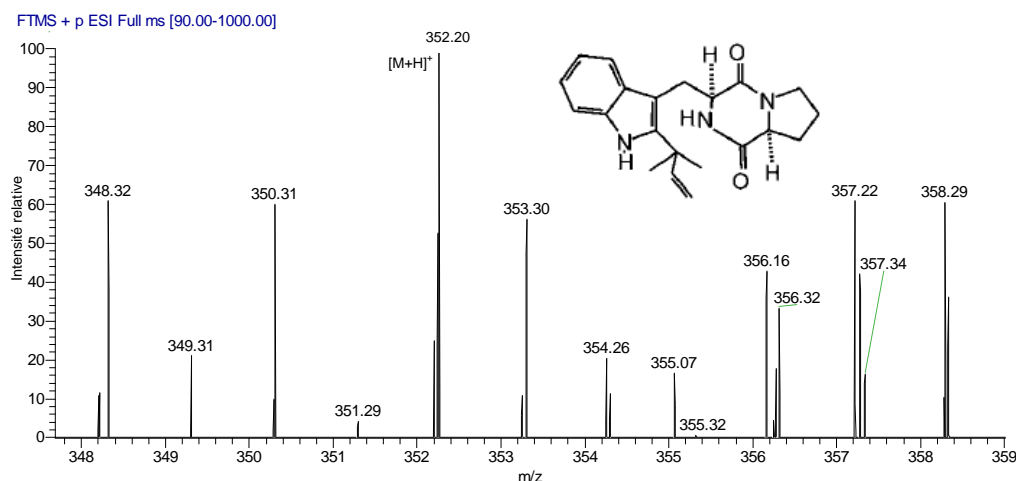


Figure 37 Spectre de masse MS en mode positif du composé C9

### 3.8.10- Identification du composé C10

L'analyse MS en mode positif a montré un pic chromatographique ( $t_r=8,24$  min) contenant un ion majoritaire à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  369,1 ce qui correspond à une composition élémentaire  $C_{20}H_{18}O_7$  (figure 38). Cette masse correspond à celle de l'acide norsolorinique.

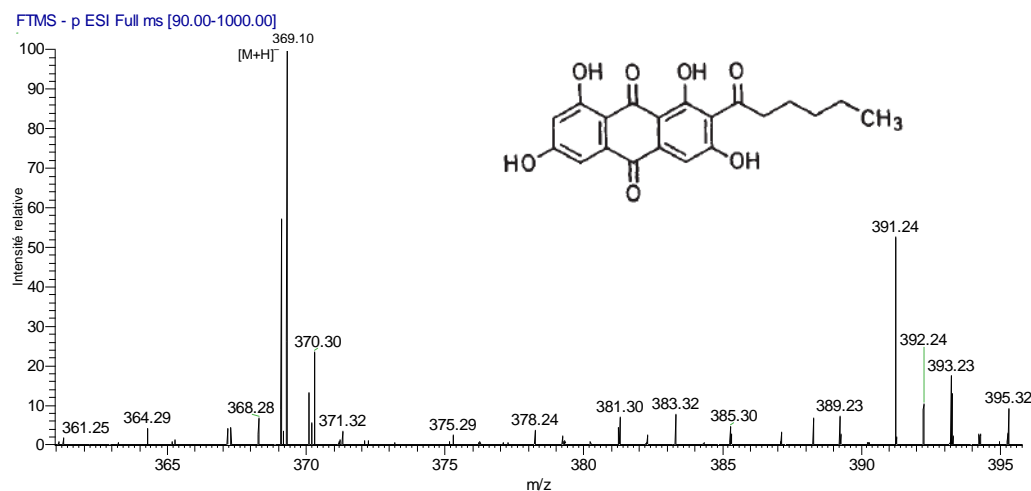


Figure 38 Spectre de masse MS en mode positif du composé C1

De ce fait, les activités antimicrobienne et antioxydante développées par notre souche d'*A. creber*, peut être expliquées par sa capacité de production d'une gamme de métabolites bioactifs. **Il est à noter, que la production de l'émodyne, la STC, la déoxybrevianamide E et l'acide norsolorinique par *A. creber* est déjà décrite dans la littérature. Cependant, la production de l'asperlactone par une souche appartenant à la section *Versicolores* et notamment par *A. creber* est décrite pour la première fois dans ce travail (Sakhri et *al.*, 2019).**

# Discussion

## **4- Discussion**

Les champignons filamenteux ont la capacité de produire une très grande diversité de métabolites secondaires qui ont servi comme substances à activité biologique (Keller et *al.*, 2005 ; Coleman et *al.*, 2011). A nos jours, la production de ces métabolites est devenue l'un des activités les plus importantes de la biotechnologie sur le plan industriel. En effet, les champignons filamenteux ont fourni à l'industrie pharmaceutique un nombre considérable de molécules thérapeutiques (Chiang et *al.*, 2009; Khan et *al.*, 2014; Meyer et *al.*, 2016; Wang, 2017). De ce fait, plusieurs travaux ont été réalisés sur ces organismes dont la présente étude qui a été consacrée à la recherche d'éventuels effets antimicrobiens et antioxydants, dus à la sécrétion des substances bioactives, d'une souche fongique appartenant au genre *Aspergillus*.

Le choix d'étudier une souche appartenant au genre *Aspergillus* a été fait suite aux études bibliographiques montrant que les espèces appartenant à ce genre sont les producteurs les plus puissants de substances bioactives d'origine fongique (Dewi et *al.*, 2012; Bai et *al.*, 2014). Ces espèces sont réputées pour leur importance médicale et économique. En effet, plusieurs espèces d'*Aspergillus* sont utilisées à l'échelle industrielle pour la production des molécules d'intérêt thérapeutique, Agricole et agro-alimentaire (Palencia et *al.*, 2010; Meyer et *al.*, 2016; Theoblad et *al.*, 2018).

Les céréales sont des substrats naturellement favorables au développement fongique. Le maïs grain est la céréale la plus appréciée en alimentation animale grâce à sa richesse en énergie. Cependant, le mauvais stockage de cette céréale pourrait entraîner le développement de moisissures dont les espèces d'*Aspergillus* qui sont des contaminants typiques des céréales de stockage (Dedi et Diomonde, 2017). Si de très nombreuses études ont rapporté l'effet néfaste des moisissures de stockage, les enquêtes sur la capacité de ces organismes à produire des substances d'intérêt sont plus rares. En effet, l'acide mycophénolique, l'immunosuppresseur le plus important à nos jours (Reguira et *al.*, 2011), a été extrait à partir d'une culture de *Penicillium brevicompactum* (actuellement *Penicillium stoloniferum*) isolée à partir du maïs moisi (Bentley, 2000). En Algérie, l'utilisation du maïs dans l'alimentation animale est considérée, de loin, comme une préférence. Néanmoins, la mycoflore associée à cette denrée est encore mal connue ou peu développée et par conséquent, il n'y a pas assez de références à ce propos. De ce fait, la réflexion à développer cette recherche a mûri et exploitée par l'étude

des souches d'*Aspergillus* associées à cet aliment et la sélection de celles qui manifestent le pouvoir de produire de substances bioactives.

Sur le volet mycologique, l'analyse des échantillons de maïs grain, de production locale, destiné à l'alimentation de la volaille, a abouti à l'isolement de 251 isolats fongiques, malgré qu'au cours du prélèvement d'échantillons, aucune trace apparente de contamination n'a été constatée ni dans les lieux de stockage ni sur les grains de maïs. En plus, la surface de ces grains a également été désinfectée lors de l'isolement. Ce résultat signifie que les moisissures isolées étaient intrinsèques aux grains (Dedi et Diomande, 2017).

Les différents isolats obtenus appartiennent aux différents genres dont 61,67% présentant une morphologie caractéristique des *Aspergillus*. Les espèces appartenant à ce genre sont largement distribuées dans la nature grâce à leur capacité de produire un grand nombre de spores aéroportées facilement transmissibles par le courant d'air, de plus, la majorité de ces espèces n'ont pas de besoins nutritionnels particuliers (Bennett, 2007). La prédominance du genre *Aspergillus* dans la mycoflore du maïs stocké a été mise en évidence dans plusieurs études antérieures (Niaz et Dawar, 2009; Dubale et al., 2014; Tsedaley et Adugna, 2016).

En outre, il a été constaté la grande prévalence d'*Aspergillus flavus* (53,52% de l'ensemble des *Aspergillus* isolés) suivi par *A. niger* (14,08%) ce qui est en accord avec les travaux de Ghiasian et al., (2004); Magnoli et al., (2006); Dubale et al., (2014) et Ismail et al., (2020) qui ont démontré que ces deux espèces sont des contaminants majeurs du maïs.

Parmi les 155 isolats d'*Aspergillus*, seuls 5 isolats ont été retenus sur la base de plusieurs considérations : leurs caractéristiques culturelles peu communes ; élimination des *Aspergillus* section *Flavi* qui sont réputés pour leurs pouvoirs de produire les aflatoxines dont l'aflatoxine B1 considérée comme étant le cancérigène naturel le plus puissant (Rank et al., 2011) ; éloignement de l'*A. niger* pour son étude massive et en particulier pour son exploitation dans la production d'enzymes à l'échelle industrielle (Ibrahim et al., 2015 ; Ahmed et al., 2016 ; Mukherjee et al., 2019; Asrat et Girma, 2018); en outre, *Aspergillus* section *Nidulantes*, en l'occurrence, *Emericella nidulans* est l'espèce fongique la plus utilisée comme un organisme modèle pour l'étude de la génétique et la biologie de la cellule fongique (Romsdahl et Wang, 2019). Pour ces considérations, les espèces appartenant aux sections *Flavi*, *Nigri* et *Nidulantes* ne sont pas retenues pour la suite de ce travail.

L'ensemble d'isolats d'*Aspergillus* considérés, en l'occurrence AS1, AS2a, AS2b, AS3 et AS4 ont fait l'objet d'un criblage de l'activité antimicrobienne en utilisant la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis des germes pathogènes ce qui a permis de sélectionner une seule souche sur les 5 souches testées. Cette souche présente, *in vitro*, un effet inhibiteur remarquable sur tous les microorganismes test utilisés, il s'agit de l'isolat AS1. Selon Compaore et *al.*, (2016), le développement des zones de lyse par les isolats fongiques prouve l'élaboration et l'excrétion de substances bioactives qui diffusent dans le milieu solide en inhibant la croissance des microorganismes test.

L'étude morphologique de la souche AS1 sélectionnée pour son pouvoir antimicrobien, a montré qu'elle présente des colonies peu extensives, de croissance lente et de couleur, d'abord, blanche puis de couleur variée au sein de la même colonie. Sous microscope, le thalle est cloisonné, la tête aspergillaire est bisériée et les conidies sont rondes, de couleur verte et à paroi rugueuse. Ces résultats corroborent ceux de Jurjevic et *al.*, (2012), et confirment l'appartenance de cet isolat à la section *Versicolores*.

Historiquement, l'identification des *Aspergillus* s'est basée sur les caractéristiques morphologiques des colonies et les examens microscopiques (Diba et *al.*, 2007; Bennett, 2007; Negri et *al.*, 2014). Cependant, ces caractères morphologiques ne sont pas toujours suffisants pour différencier les espèces appartenant à la même section. Pour y parvenir, les méthodes moléculaires sont, de plus en plus, utilisées pour faciliter l'identification précise de ces espèces (Pryce et *al.*, 2003). Dans le présent travail, les caractères morphologiques observés, n'étaient pas suffisants pour distinguer les espèces de la section *Versicolores* en raison des ressemblances morphologiques des colonies et des fructifications. Pour ce faire, une approche moléculaire s'avérait nécessaire pour aller au bout de leur identification.

L'identification moléculaire des champignons au niveau de l'espèce a été basée principalement sur l'utilisation de régions ITS de l'ADN ribosomal qui sont des gènes hautement conservés et qui existent sous forme de copies multiples dans le génome fongique (Jeager et *al.*, 2000). Ces dernières années, le gène de la calmoduline a été considéré comme important pour l'identification des espèces d'*Aspergillus*. La calmoduline est une petite protéine acide présente dans toutes les cellules eucaryotes dont le gène codé, CALM, est hautement conservé (Simão et Gomes, 2001). Certains rapports ont, même, déclaré qu'il devrait être utilisé comme gène principal pour l'identification des espèces d'*Aspergillus* (Hong et *al.*, 2005; Ashtiani et *al.*, 2017). Par ailleurs, plusieurs auteurs ont utilisé ce gène pour l'identification des espèces

d'*Aspergillus*; Varga et al., (2011) ont analysé une partie de ce gène pour distinguer entre les espèces de la section *Flavi*, Palumbo et al., (2015) ont analysé ce même gène pour différencier entre quatre espèces de la section *Nigri*, en outre, Ashtiani et al., (2017) ont utilisé ce gène pour spécifier entre les espèces des trois sections *Flavi*, *Nigri* et *Fumigati*.

De ce fait, l'approche moléculaire a été empruntée pour la caractérisation de la souche d'*Aspergillus* sélectionnée. Pour ce faire, les services de la DSMZ ont été sollicités. Leur technique reposait sur l'analyse d'un fragment d'ADN ribosomal y compris les séquences ITS et une partie du CALM. Cette analyse a montré que l'isolat sélectionnée est *Aspergillus creber* avec un pourcentage de similarité de 99% en comparaison aux souches d'*Aspergillus* enregistrées au niveau de la banque GenBank.

*A. creber* est une espèce appartenant à *Aspergillus* section *Versicolores*. Cette espèce a été décrite pour la première fois par Jurjevic et al., (2012). Avant l'utilisation des méthodes moléculaires pour l'identification des espèces fongiques, les isolats appartenant à la section *Versicolores* ont été communément reconnus comme *A. versicolor* (Despot et al., 2016). Actuellement, la section *Versicolores* comprend 17 espèces (Despot et al., 2017), parmi lesquelles, *A. versicolor* et *A. sydowii* sont les espèces les plus rapportées et les plus étudiées (Siqueira et al., 2016). En raison de sa récente identification, peu d'informations sont disponibles concernant l'espèce *A. creber*. Selon Libert et al., 2017, cette espèce est difficile à distinguer, morphologiquement et génétiquement, d' *A. sydowii* et *A. versicolor*. *Aspergillus creber* était l'espèce la plus fréquemment isolée dans les échantillons d'air intérieur aux États-Unis (Jurjevic et al., 2012), il a été aussi isolé dans des librairies des livres stockés en Italie (Micheluz et al., 2015) et même du milieu marin (Fouillaud et al., 2017). Selon la littérature fouillée, cette souche n'a jamais été isolée à partir des céréales notamment à partir du maïs grain, **ce qui constitue une première pour le présent travail.**

Afin d'accroître la productivité des molécules bioactives, il est avantageux de sélectionner un milieu qui permet une bonne production de ces dernières. A cet effet, quatre milieux de cultures ont été choisis en fonction des données bibliographiques comme étant les milieux les plus utilisés pour la production des métabolites secondaires fongiques.

La culture de la souche d'*A. creber* sur différents milieux de culture en l'occurrence : PDB, MEB, SAB et CYB a permis de sélectionner le milieu CYB comme étant le milieu le plus adapté pour la production des substances antimicrobiennes. Ce milieu est largement employé

et recommandé par plusieurs auteurs (Frisvad, 2012; Grijseels et al., 2017; Khan et al., 2019; Leon et al., 2019).

La bonne activité antimicrobienne obtenue à partir du filtrat de CYB peut être expliquée par l'utilisation de l'extrait de levure (5g/l) comme source d'azote et comme un inducteur en induisant la production des métabolites secondaire (Grijseels et al., 2017). La composition de milieu de culture a une influence considérable sur la production des métabolites secondaires. Généralement, les sources de carbone et d'azote sont les composants majeurs qui influencent significativement la production des métabolites secondaires microbiens (Ruiz et al., 2010; Singh et al., 2017). Selon Brzonkalik et al., (2012) et Dinarvand et al., (2013), le rapport C/N est l'un des facteurs importants qui affectent les produits de la fermentation.

D'autre part, le milieu CYA contient le saccharose (30g/l) comme source de carbone, alors que les milieux PDB, MEB et SAB contiennent le glucose (20g/l) comme seule source de carbone. Du coup, il est possible de mettre l'hypothèse de l'effet glucose. A cause de son assimilation rapide, le glucose exerce une répression catabolique (effet glucose) chez la plupart des microorganismes producteurs d'AB (Compaore et al., 2016). En effet, plusieurs métabolites secondaires réprimés par le glucose ont été relatés dans la littérature. Il s'agit par exemple de la production de la céphalosporine C par *Acremonium chrysogenum* (Sanchez et Demain, 2002) et de la pénicilline par *Penicillium chrysogenum* (Campaore et al., 2016). Par ailleurs, il est rapporté que le saccharose est la meilleure source de carbone pour la production de biomasse et de métabolites bioactives par *A. terreus* (Jawaid et al., 2019).

La cinétique de production des substances bioactives par *A. creber* suivie sur le milieu CYB pendant 20 jours a révélé que l'activité la plus importante est enregistrée après 15 jours d'incubation ce qui signifie que les productions maximales d'antimicrobiens par *A. creber* coïncident avec la fin de la phase stationnaire et le début de la phase de déclin comme c'est le cas pour la majorité des microorganismes (Calvo et al., 2002 ; Elias et al., 2006). Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs qui ont utilisé une période d'incubation de 15 jours pour la production des substances bioactives par les différentes espèces d'*Aspergillus* (Slack et al., 2009; Chu et al., 2011; Soni et Prakash, 2011; Da-Silva et al., 2017).

La biosynthèse des métabolites secondaires microbiens est, directement, liée aux conditions de culture, la biomasse présente dans la phase de production, la durée d'incubation, la température et le pH (Elias et al., 2006; Pan et al., 2019). Pour les *Aspergillus*, les conditions



de culture varient de 25°C à 30°C pour la température et de 6 à 7 pour le pH (Leon et *al.*, 2019).

Après la production des substances bioactives, leur extraction a été faite par l'acétate d'éthyle. L'emploi d'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction a été motivé par de nombreuses études réalisées sur la recherche de substances bioactives à partir des *Aspergillus* (Choudhary et *al.*, 2004; Busi et *al.*, 2009; Lee et *al.*, 2010; Prabavathy et Nachiyar, 2012; Kalyani et Hemalatha, 2017). L'acétate d'éthyle est un solvant de polarité moyenne ce qui conduit à l'extraction des composés biologiques polaires et non polaires (Pattanaik et Mandalia, 2011).

L'étude des activités biologiques de la souche d'*A. creber* a été faite sur l'extrait brut de l'acétate d'éthyle. En effet, trois activités biologiques ont été testées en l'occurrence, l'activité antibactérienne, l'activité anti-Candida et l'activité antioxydante. De plus, le taux de PT de cet extrait a été aussi évalué.

L'exploitation des résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait d'*A. creber*, vis-à-vis des souches bactériennes cliniques multirésistantes à Gram positif, en l'occurrence SABL et SERM, et vis-à-vis des souches bactériennes cliniques à Gram négatif ; *E. coli* résistante à l'ampicilline, *K. pneumoniae* résistante à l'ampicilline et à la pipéracilline, *P. aeruginosa* résistante aux carbapénèmes et *S. typhi* résistante à l'ampicilline, a montré qu'il y avait une plus forte activité sur les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif, qui étaient moins sensibles, voire, insensibles dans le cas d'*E. coli* et *P. aeruginosa*. Ces résultats corroborent ceux de plusieurs auteurs qui ont étudié l'activité antibiotique des différentes espèces d'*Aspergillus*. En effet, les études réalisées par Al-Shaibani et *al.*, (2013) et Shaaban et *al.*, (2013) sur le filtrat d'*A. niger* et l'extrait d'*A. fumigatus* respectivement, ont indiqué que les activités antimicrobiennes les plus importantes ont été enregistrées contre des bactéries à Gram positif. Wang et *al.*, (2016), ont montré que l'extrait brut de trois souches d'*Aspergillus* testées n'avait aucune activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif testées (*E. coli* et *Ralstonia solanacearum*). Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que ces deux groupes de bactéries diffèrent morphologiquement, car les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe qui est une membrane polysaccharide portant les composants structurels lipopolysaccharides, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles, contrairement aux bactéries à Gram positif, lesquelles sont plus sensibles car ils ont seulement une couche de peptidoglycane extérieure (Valle Jr et *al.*, 2015). Ces résultats pourraient s'expliquer aussi par l'hypothèse, selon laquelle, les principes actifs

agissant sur les bactéries à Gram négatif, notamment *E. coli* et *P. aeruginosa*, sont absents dans l'EAc ou s'y trouvaient à des concentrations trop faibles pour provoquer une zone d'inhibition (Compoaore et al., 2016). Par ailleurs, l'étude faite par Fawzy et al., 2011 a rapporté que les extraits extracellulaires d'*Aspergillus flavus* var. *Columinaris* et *A. niger* avaient une activité antibactériennes contre les bactéries à Gram négatif mais aucune activité n'a été enregistrée contre les bactéries à Gram positif ce qui est en contradiction avec cette étude. En outre, Kalyani et Hemalatha, 2017, ont rapporté que toutes les bactéries test à Gram positif et à Gram négatif ont montré une sensibilité à l'extrait brut d'*A. niger*.

Sur un autre volet, l'extrait d'*A. creber* a également montré une meilleure activité anti-Candida sur les levures pathogènes testées, en l'occurrence *C. albicans* et *C. glabrata*. Ces résultats sont en contradiction avec ceux rapportés par des études antérieures qu'ont montré que les métabolites sécrétés par *A. versicolor*, l'espèce la plus étudiée de la section *Versicolores*, n'a aucune action inhibitrice sur *C. albicans* (Zhuang et al., 2011; Song et al., 2012; Ebada et al., 2018). Cette divergence peut être expliquée par la capacité de la souche d'*A. creber* de produire des substances anti-Candida inhibant la synthèse de l'ergostérol qui constitue la cible privilégiée des substances antifongiques (Martins et al., 2015).

La comparaison des valeurs de CMI, développaient, particulièrement, vis-à-vis des germes sensibles à l'EAc avec les diamètres des zones d'inhibition, obtenues par la méthode de diffusion sur gélose, confirme les résultats obtenus et l'efficacité antimicrobienne de l'extrait d'*A. creber*. En effet, *C. albicans* et les bactéries à Gram positif (SABL et SERM) se sont avérés les plus sensibles avec des valeurs de CMI égale à 0,325 mg/mL et 0,625 mg/mL respectivement.

L'inhibition du développement des germes test par l'EAc d'*A. creber* confirme sa capacité de production de substances à activité antimicrobienne. En effet, le groupe d'*Aspergillus* est connu pour sa capacité à produire une large variété de composés antimicrobiens qui ont des valeurs thérapeutiques élevées (Elaasser et al., 2011; Yadav et al., 2014). Cependant, aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature sur l'effet antimicrobien d'*A. creber* ce qui **confirme l'originalité de ce travail.**

Par ailleurs, les résultats obtenus sont très intéressants du fait que cette souche (*A. creber*) a montré une importante activité antibactérienne vis-à-vis des SAPB et SERM qui occupent une place importante en pathologie nosocomiale (Knafl et al., 2017). En effet, ces souches

constituent une source de préoccupation majeure de la communauté scientifique due à leur capacité de s'adapter à toutes les conditions environnementales et, notamment, d'acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques (Miragaia et al., 2002; Dumitrescu et al., 2010). Cette situation rend la prise en charge des infections dues à ces Cocci à Gram positif très difficile et nécessite à la recherche de nouvelles molécules anti-staphylocoques. Actuellement, les SAPB constituent plus de 90 % des souches de *S. aureus* hospitalières (Salem et al., 2016) alors que 75 à 90% des isolats de *S. epidermidis* hospitaliers sont résistants à la méticilline (Otto, 2009).

Ainsi, il est important de signaler la forte activité anti-*Candida albicans* exercée par l'EAc d'*A. creber* du fait que *C. albicans* est la cause la plus fréquente d'infections fongiques nosocomiales (Martins et al., 2015). De plus, certaines souches de *Candida albicans* ont, même, développé des résistances aux antifongiques considérés jusqu'à présent comme le seul arsenal thérapeutique (Tati et al., 2016).

**D'après la littérature fouillée, le présent travail est le premier à avoir caractérisé l'activité antimicrobienne d'*A. creber* en particulier son activité antibactérienne à l'égard des bactéries à Gram positif multirésistante, en l'occurrence *Staphylococcus aureus* producteur de  $\beta$ -lactamase et *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline et son activité anti- *Candida albicans*.**

En plus de leur capacité à produire des substances antimicrobiennes, les champignons filamenteux ont, aussi, montré une capacité à produire des molécules douées d'activité antioxydante (Sugiharto et al., 2016; Abo-Elmagd, 2014). Il a été rapporté que l'AO ne devrait pas être conclue sur la base d'un seul test (Arora et Chandra, 2010; Nwobodo et al., 2017). De ce fait, une gamme de tests spectrophotométriques a été adoptée pour évaluer le pouvoir antioxydant des produits naturels. Dans cette étude, l'AO de l'EAc d'*A. creber* a été évaluée en déterminant sa capacité de piégeage des radicaux libres par les tests DPPH et ABTS et sa capacité de réduction ferrique. En effet, le choix particulier de tester l'AO par ces trois tests a résidé dans la simplicité de la mise en œuvre de ces méthodes et leur bonne reproductibilité (Kim et al., 2013, Zampini et al., 2010). Le principe de ces méthodes est basé sur la génération d'un radical synthétique coloré (le radical DPPH $\cdot$  dans le test DPPH et le radical cation ABTS $^{+\cdot}$  dans le test ABTS) ou un composé redox-actif; ensuite la capacité d'un échantillon biologique à piéger le radical ou à réduire le composé redox-actif est surveillée par spectrophotomètre (Floegel et al., 2011).

Les données présentées dans cette étude ont montré que l'extrait d'*A. creber* a une excellente activité de piégeage des radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> et un puissant pouvoir réducteur. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez d'autres *Aspergillus* tels que *Aspergillus candidus* (Yen et al., 2001); *Aspergillus ssp.* (Arora et Chandra, 2010) et *Aspergillus fumigatus* (Arora et Chandra, 2011) ainsi que à de nombreux champignons filamenteux de différentes sources (Abo-Elmagd, 2014; Kumaresan et al., 2015; Sharma 2015; Smith et al., 2015; Sugiharto et al., 2016).

Par ailleurs, les AO démontrées par l'EAc d'*A. creber* peut être considérées comme légèrement moins puissantes, par rapport à l'antioxydant de référence utilisé, en l'occurrence l'acide ascorbique. Cela peut être dû à la quantité ou à la pureté des composés actifs dans l'EAc d'*A. creber* (Dhankhar et al., 2012).

Ces résultats ont été aussi confirmés par les valeurs IC50. L'IC50 est la quantité d'antioxydant requise pour piéger 50% des radicaux libres (Koudali et al., 2014). Plus la valeur d'IC50 est petite, plus l'AO d'un composé est importante. En effet, l'extrait d'*A. creber* neutralisent les radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> à un IC50 de  $108,76 \pm 1,02 \mu\text{g/ mL}$  et  $90,82 \pm 0,61 \mu\text{g/ mL}$  respectivement montrant une activité très importante qui est très proche de celle de l'acide ascorbique qui stabilise les radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> à un IC50 de  $100,33 \pm 1,14 \mu\text{g/ mL}$  et  $84,66 \pm 0,95 \mu\text{g/mL}$  respectivement. En outre, des corrélations significatives ont également été trouvées entre les tests DPPH, ABTS et le pouvoir réducteur. Ces résultats indiquent que la souche d'*A. creber* exploitée dans ce travail est capable de synthétiser des molécules à activité antioxydante et par conséquent, elle peut aussi servir comme **source potentielle d'antioxydants naturels**.

Le dosage de la teneur des polyphénols totaux (PT) a été fait en utilisant la méthode de Folin-Ciocalteu, couramment utilisée pour évaluer la teneur en PT en raison de sa simplicité et reproductibilité (Murthy et al., 2011). Peu de travaux concernant les teneurs en PT des extraits fongiques ont été réalisés. L'EAc d'*A. creber* a montré une teneur en PT très élevée (86,53 mg GAE/g) que celle trouvée chez d'autres champignons filamenteux. En effet, Sugiharto et al., 2016 ont rapporté que la teneur en PT des extraits d'*Acremonium charticola* et de *Rhizopus oryzae* était 26,25 mg EAG/g et 16,08 mg EAG/g respectivement. Cependant, l'extrait de *Penicillium chrysogenum* et *P. fumiculosum* se sont révélés moins riche en polyphénols (2,859 mg EAG/g et 2,109 EAG/g respectivement) (Jakovljević et al., 2014).

Dans la littérature, beaucoup d'études montrent que les propriétés antioxydantes des extraits fongiques sont fortement liées à sa teneur en PT (Abdel-Monem et *al.*, 2013; Jakovljević et *al.*, 2014 ; Smith et *al.*, 2015; Sugiharto et *al.*, 2016 ; Nwobodo et *al.*, 2017). De ce fait, la forte inhibition des radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> et le puissant pouvoir réducteur de l'EAc d'*A. creber* pourraient contribuer à sa teneur élevée en PT. Le potentiel antioxydant des composés polyphénoliques est dû à leurs propriétés redox, qui leur permettent d'agir comme agents réducteurs, des donneurs d'hydrogène ou d'électron et des chélateurs de métaux (Abo-Elmagd, 2014; Ladoh Yemeda et *al.*, 2014).

**D'après la littérature consultée, le présent travail est le premier à avoir caractérisé l'AO et le taux de PT d'*A. creber* ce qui procure à ce travail une autre originalité.**

Afin d'interpréter les activités antimicrobienne et antioxydante de l'EAc d'*A. creber*, la purification et la caractérisation des substances contenant dans cet extrait s'avérait indispensables. En effet, dans cette étude l'analyse de l'extrait d'*A. creber* a été faite par la technique de chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution de type Exactive en mode tandem (UHPLC-HRMS/MS).

Au premier lieu, l'analyse de l'extrait d'*A. creber* par LC-MS a permis de séparer les composants de cet extrait et d'enregistrer les spectres de masse de chaque pic chromatographique. Les résultats issus de cette analyse a permis d'identifier 10 pics chromatographiques à la base de leur spectre de masse. En effet, les molécules détectées ont données des masses mono isotopiques de l'ion [M+H]<sup>+</sup> égale à 185.08081, 308.1099 ; 327.04734 ; 251.09145 ; 325.07053 et 352.20352 pour les composés C1, C3 ; C4 ; C6 ; C7 et C9 respectivement, des masse mono isotopiques de l'ion [M+Na]<sup>+</sup> égale à 211.06121 et 423.25041 pour les composés C2 et C8 respectivement et des masses mono isotopiques de l'ion [M+H]<sup>-</sup> égale à 269.04590 et 369.09892 pour les composés C5 et C10 respectivement. La comparaison des spectres de masse obtenus à ceux de la base de données (disponible au niveau du laboratoire de chimie alimentaire université de Naples, Italie) également obtenus par le même spectromètre a permis d'identifier les molécules de C1 jusqu'à C10 comme étant : asperlactone, aspionène, aspergillomarasmine A, gliotoxine, émodine, citrinine, stérigmatocystine, ophioboline A, deoxybrévianamide E et acide norsolorinique respectivement.

Afin de confirmer cette identification, une analyse par spectrométrie de masse en mode tandem (MS/MS) a été faite. Cette analyse a permis la fragmentation des ions majoritaires à chaque temps d'analyse donnant des informations sur les fragmentations des composés et donc sur leur structure. En effet, pour les ions moléculaires des composants C1, C2, C3, C4, C6 et C8 des fragments en mode d'ionisation positif ont été observés.

La comparaison des spectres de fragmentation obtenus par MS/MS de la molécule présumée asperlactone (C1) a révélé la présence d'ions fragments majoritaires (141.05444, 113.05948) identiques à ceux décrits dans la littérature (Vishwanath et *al.*, 2009) ce qui confirme que la souche *A. creber* est capable de produire de l'asperlactone. **En effet, aucune étude, à notre connaissance, n'a révélé la production de ce métabolite par cette souche ou par d'autres souches d'*Aspergillus* section *Versicolores*.**

Pour les molécules C2, C3, C4, C6 et C8 présumées d'être Aspionène, aspergillomarasmine A, gliotoxine, citrinine et ophioboline A respectivement, les spectres de fragmentation obtenus sont différents de ceux trouvés dans la littérature ce qui laisse supposer qu'il s'agit des nouvelles molécules avec des formules brutes respectives :  $C_9H_{16}O_4$ ,  $C_{10}H_{17}N_3O_8$ ,  $C_{13}H_{14}H_2O_4S_2$ ,  $C_{13}H_{14}O_5$  et  $C_{25}H_{36}O_4$  et dans les données spectrométriques sont mentionnées dans la partie résultats. Il est intéressant de signaler, qu'aucune molécule n'a été trouvée dans la littérature avec les caractéristiques citées.

Pour les composés C6, C7, C9, C10 aucune fragmentation n'a été observée dans les conditions utilisées ce qui peut être due à la trop faible quantité de composés collectés. De ce fait, l'identification de ces molécules a été faite en se basant sur la masse moléculaire et les informations fournies par la littérature. En effet, ces molécules ont été identifiées comme étant émodine ( $C_{15}H_{10}O_5$ ); stérigmatocystine ( $C_{18}H_{12}O_6$ ); deoxybrévianamide E ( $C_{21}H_{25}N_3O_2$ ) et acide norsolorinique ( $C_{20}H_{18}O_7$ ) (Sulyok et al. 2007 ; Lehner et al. 2012; Micheluz et al. 2016 ). La production de l'émodine, la deoxybrévianamide E et l'acide norsolorinique par *A. creber* a été montrée par le seul travail trouvé dans la littérature (Micheluz et al., 2015). Cependant, la production de STC a été signalée dans quelques études décrivant les espèces de la section *Versicolores* comme productrices de la STC (Jurjevic et al., 2012; Jurjevic et al., 2013). Jurjevic et al., (2013), a décrit *A. creber* comme un producteur mineur de la STC du fait de la faible quantité produite par cette espèce. La STC est un métabolite fongique polycétide principalement produit par *A. versicolor* (Ježak et al., 2016). C'est le précurseur de l'aflatoxine B1 mais sa toxicité est inférieure à celle-ci (Piontek et al., 2016).

En conclusion, les activités antimicrobienne et antioxydante d'*A. creber* peut être expliquées par l'action de l'une de ces molécules retrouvées dans l'extrait de culture de cette souche, ou à l'effet synergique de plusieurs molécules à la fois. En effet, l'asperlactone (3- (1,2-époxypropyl)-5-(1-hydroxyéthyl)-5-furane-2-one) est un métabolite fongique polycétide produit par *Aspergillus melleus* (Garson et Staunton, 1984), *Aspergillus ochraceus* (Torres et al., 1998) et *Aspergillus westerdijkiae* (Bacha et al., 2009). Dans cette étude la production de ce métabolite a été aussi observée chez *A. creber* (Sakhri et al., 2019). L'activité biologique de l'asperlactone a été établie pour la première fois par Balcells et al., (1995) ; c'était le premier métabolite fongique qui a montré une activité insecticide *in vivo*. Ensuite, l'asperlactone a été rapporté comme un puissant agent antimicrobien et antifongique (Torres et al., 1998, Chen et al., 2014). Selon Torres et al., 1998, la bioactivité de l'asperlactone est due au groupement époxyde. En effet, l'élimination de ce groupement conduit à la disparition de ses activités bactéricide et fongicide.

Aussi, l'émodyne est un dérivé anthraquinone couramment isolé des plantes supérieures et de nombreuses espèces fongiques telles que *A. wentii* (Wells et al., 1975), *A. terreus* (Dewi et al., 2010) et *A. ochraceus* (Lu et al., 2010). Plusieurs études ont rapporté la bioactivité de ce métabolite. Hatano et al., 1999 ont rapporté l'activité antibactérienne de l'émodyne vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* résistante à la méthiciline. De plus, Kim et al. 2004 ont rapporté l'activité antifongique de l'émodyne vis-à-vis des moisissures phytopathogènes. L'activité antioxydante de l'émodyne a été aussi rapportée (Izhaki, 2002). En outre, de nombreuses études ont montré l'activité anticancéreuse de l'émodyne (Wang et al., 2007 ; Lin et al., 2009 ; Wu et al., 2016; Zhao et al., 2017 ; Cheshmi et al., 2017). D'autre part, peu d'étude ont rapporté l'activité biologique de l'acide norsolorinique qui est un métabolite typique d'*A. versicolor* (Micheluz et al., 2016). Wang et al., 2008 ont établi l'activité anticancéreuse, *in vitro*, de l'acide norsolorinique. En outre, la desoxybrévianamide E qui est un métabolite fongique appartenant à la famille des brevianamides (Schkeryantz et al., 1999) et malgré les nombreuses activités attribuées aux membres de cette familles d'alcaloïdes, notamment des activités antibactériennes, insecticides et antitumorales (Kato et al., 2011 ; Xu et al., 2017), aucun rapport n'a été trouvé dans la littérature décrivant la bioactivité de cette molécule.

# Conclusion et Perspectives



## 5- Conclusion et perspectives

Les *Aspergillus* constituent une source fiable pour plusieurs principes actifs reconnus par leurs propriétés thérapeutiques. Le présent travail avait pour double objectif d'évaluer les activités biologiques d'une souche d'*Aspergillus* peu, ou non encore, étudiée et d'identifier ses métabolites secondaires biologiquement actifs.

L'exploration des échantillons de maïs grain destiné à l'alimentation de la volaille a aboutit à l'isolement de 155 isolats fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, représentés essentiellement par quatre sections : *Aspergillus* section *Flavi*, section *Nigri*, section *Nidulantes* et section *Versicolores*. Parmi ces souches d'*Aspergillus*, cinq isolats ont été retenues en s'appuyant sur des caractéristiques phénotypiques peu communes. En effet, de nombreuses souches obtenues sont conservées dans la collection de notre laboratoire pour des études ultérieures. Il ressort de cet isolement que les *Aspergillus* sont des contaminants naturels des céréales stockées.

Un criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne, par la méthode des cylindres d'agar, des isolats considérés a permis de sélectionner une seule souche, pour la suite du travail, pour sa forte activité antimicrobienne vis-à-vis de tous les germes test pathogènes. L'identification macroscopique et microscopique de la souche sélectionnée suivie par des tests moléculaires a révélé qu'il s'agit d'*Aspergillus creber*. Les séquences de la souche identifiée ont été enregistrées au niveau de la base de données GenBank sous les numéros d'accès MH796366 et MH796367. D'après la littérature consultée, ce travail est le premier à avoir permis l'isolement d'une souche d'*A. creber* à partir des céréales, notamment à partir du maïs grain.

La culture de la souche d'*A. creber* sur des milieux de culture submergés recommandés pour la production des métabolites secondaires fongiques (CYB, MEB, PDB et SAB) a permis de conclure que CYB est le milieu le plus adapté pour la production des substances antimicrobiennes par cette souche. Ainsi, la cinétique de production de ces substances sur le milieu CYB a permis de démontrer qu'une période d'incubation de 15 jours est optimale pour atteindre les maxima de production.

D'autre part, la forte activité inhibitrice de l'extrait d'acétate d'éthyle d'*A. creber* vis-à-vis de la levure *Candida albicans* et les bactéries *Staphylococcus aureus* producteur de  $\beta$ -lactamase,

*S. epidermidis* résistant à la méticilline a permis de déduire que cette souche est capable de produire des substances antimicrobiennes intéressantes. En effet, *A. creber* pourrait être considéré comme une nouvelle source de substances naturelles à activité antifongique notamment sur *Candida albicans* et à activité antibiotique notamment sur des bactéries multi-résistantes à Gram positif, activités non encore décrites auparavant pour cette espèce.

En outre, l'extrait d'*A. creber* a montré une bonne activité antiradicalaire en pigeant les radicaux DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> et un puissant pouvoir réducteur. En effet, l'extrait d'*A. creber* a montré des CI50 très proche de CI50 de l'antioxydant de référence, l'acide ascorbique. En plus, un meilleur taux de PT a été enregistré en comparaison avec toutes les études précédentes. Ces résultats témoignent de la bonne capacité antioxydante de l'extrait d'*A. creber* et ont permis de considérer cette souche comme une source d'antioxydants naturels. A notre connaissance, l'étude de l'activité antioxydante d'*Aspergillus creber* est une première, d'après la littérature consultée, aucun travail n'a évoqué l'activité biologique de cette espèce.

Sur un autre volet, la purification et la caractérisation des molécules produites par *A. creber* par la technique UHPLC-HRMS/MS ont démontré la capacité d'*A. creber*, sélectionné dans le présent travail, à produire une variété de molécules bioactives de nature différente incluant des polycétides, des anthraquinones et des alcaloïdes. Parmi ces molécules, cinq molécules biologiquement actives ont été identifiées, il s'agit de l'asperlactone, émodyne, stérigmatocystine, déoxybrévinamide E et l'acide norsolorinique, en plus de cinq autres molécules, dont les caractéristiques chromatographiques et spectrales révélées dans ce travail, n'ont pas été identifiées ce qui laisse supposer qu'il s'agissait, très probablement, de nouvelles molécules. Ces composés jouent certainement un rôle important dans les activités précédemment démontrées. A notre connaissance, la mise en évidence de la production d'asperlactone par *A. creber* est une première, en effet, aucune étude n'a mentionné la capacité de cette espèce à produire ce composé.

De façon générale, ce travail ne constitue, bien évidemment, qu'un premier pas vers une meilleure connaissance scientifique de l'espèce fongique *A. creber* comme une nouvelle source de PN bioactifs. Il faudra donc, mener une investigation plus approfondie sur les métabolites produits par cette espèce.

A l'issue de ce modeste travail, plusieurs constatations pourraient, d'ores et déjà, servir de points de départ pour des recherches futures à savoir :

- Caractérisation complète de la structure chimique de chacune des molécules extraites dans ce travail et qui n'ont pas été totalement identifiées ;
- Tester les molécules isolées, *in vivo*, sur différents modèles biologiques, afin d'identifier leurs applications thérapeutiques et/ou en agriculture ;
- Optimisation de la production de ces molécules par *A. creber*.

# Abstract

## Abstract

The present work aims to evaluate some biological activities of a strain of *Aspergillus* and to identify its bioactive molecules potentially interesting. The exploration of corn samples destined to poultry feed allowed the isolation of 155 fungal strains belonging to the genus *Aspergillus*. One strain was selected, *in vitro*, by agar diffusion method, for its strong antimicrobial activity. Morphological and molecular identification of the selected isolate showed that it is *Aspergillus creber*. Preliminary test of the production of bioactive substances on different submerged culture media revealed that the Czapeck Yeast Broth (CYB) medium is the most favourable medium for this production. After the production of these molecules, the extraction was carried out using ethyl acetate. Study of the antimicrobial activity of ethyl acetate extract has shown that *A. creber* has a high activity against *Candida albicans*, with an MIC value of 0.325 mg / mL, followed by the multiresistant Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus* producing  $\beta$ -lactamase and *Staphylococcus epidermidis* resistant to methicillin with an MIC value of 0.625 mg / mL. Gram-negative bacteria were found to be more resistant with an MIC value ranging from 2.5 to 5 mg / mL. In addition, *A. creber* extract showed a significant capacity to trap free radicals DPPH  $\cdot$  and ABTS  $\cdot^+$  with IC50 values of  $108.76 \pm 1.02 \mu\text{g} / \text{mL}$  and  $90.82 \pm 0.61 \mu\text{g} / \text{mL}$  respectively. *A. creber* extract showed also a powerful reducing power. The determination of total polyphenols by the Folin-Ciocalteu method showed a significant content of polyphenolic compounds estimated at 85.76 mg EGA / g. It is important to emphasize, that this work is the first one to have shown the ability of *A. creber* to produce molecules with antimicrobial and antioxidant activities. The chromatographic analysis of *A. creber* extract by ultra high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (UHPLC-HRMS / MS) allowed the identification of five known molecules as asperlactone, emodin, sterigmatocystin, deoxybrevianamide E and norsolorinic acid, in addition to five other molecules which seem to be close to the known molecules but with some differences demonstrated in this work. Thus, it is probably that are novel molecules. To our knowledge, the demonstration of the production of asperlactone by *A. creber*, is a first, no study has mentioned the ability of the species of *Aspergillus* section *Versicolores*, in particular *A. creber*, to produce this compound. These results are promising and are considered to be a remarkable advance in the research of natural bioactive substances.

**Key words:** *Aspergillus creber*, Antimicrobial activity, bioactive substances, antioxidant activity, UHPLC-HRMS / MS, *Versicolores*.

ملخص

## ملخص

يهدف العمل الحالي لتقييم الأنشطة البيولوجية المحتملة لسلسلة من *Aspergillus* وتحديد الجزيئات النشطة المفرزة و المثيرة للاهتمام. لقد أتاح تحليل عينات من حبوب الذرة المخصصة لتغذية الدواجن لعزل 155 سلالة فطرية تنتمي إلى جنس *Aspergillus* تم اختيار سلالة واحدة بواسطة تقنية نشر الأجار ، نظرا لنشاطها القوي المضاد للميكروبات. كما أظهر الدراسة المورفولوجية والجزيئية للعزلة المختارة أنها *Aspergillus creber*. كشف الاختبار الأولي لإنتاج المواد النشطة بيولوجيًا على وسائط مغذية مختلفة أن الوسط Czapeck Yeast Broth (CYB) هو الوسط الأكثر ملاءمة لهذا الإنتاج. بعد إنتاج هذه الجزيئات تم استخلاصها بواسطة خلاط الإيثيل. أظهرت دراسة النشاط المضاد للميكروبات لمستخلص خلاط الإيثيل أن سلالة *A. creber* تمتلك نشاطًا عاليًا ضد *Candida albicans* ، بقيمة MIC 0.325 مجم / مل ، تليها البكتيريا متعددة المقاومة إيجابية الجرام ، *Staphylococcus aureus* التي تنتج  $\beta$ -lactamase و *Staphylococcus epidermidis* مقاومة للميثيسيلين بقيمة 0.625 ملغم / مل. أما البكتيريا سالبة الجرام فقد كانت أكثر مقاومة مع قيمة MIC تتراوح من 2.5 إلى 5 ملغ / مل. من جهة أخرى ، فقد أظهرت *A. creber* قدرة كبيرة على اصطياد الجذور الحرة DPPH• و ABTS•+ بقيم  $108.76 \pm 1.02$  ميكروغرام / مل و  $90.82 \pm 0.61$  ميكروغرام / مل على التوالي ، بالإضافة إلى قدرة الاختزال. أظهر تقييم البوليفينول الكلي بواسطة طريقة Folin-Ciocalteu محتوى كبيرًا من مركبات البوليفينوليك المقدر بـ 85.76 مغ EGA / غ . و تجدر الإشارة على أن هذا العمل هو الأول من نوعه الذي أظهر قدرة *A. creber* على إنتاج جزيئات ذات نشاط مضاد للميكروبات ومضاد للأوكسدة. إن التحليل الكروماتوجرافي للمستخلص بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الكفاءة إلى جانب قياس الطيف الكتلي عالي الدقة (UHPLC-HRMS / MS) سمح بالكشف على وجود خمسة جزيئات معروفة في ، asperlactone ، emodin ، sterigmatocystin ، deoxybrévianamide E وحمض norsolorinic ، بالإضافة إلى خمسة جزيئات أخرى تبدو قريبة من جزيئات معروفة ولكن مع بعض الاختلافات الموضحة في هذا العمل، مما يرجح احتمالية أنها جزيئات جديدة. على حد علمنا ، فإن إنتاج asperlactone من قبل *A. creber* هو الأول ، ولم تذكر أي دراسة سابقة قدرة الأنواع من جنس *Aspergillus* قسم *Versicolores* ، ولا سيما *A. creber* ، على إنتاج هذا المركب. هذه النتائج واعدة وتعتبر تقدمًا ملحوظًا في البحث عن المواد الطبيعية النشطة بيولوجيًا.

**الكلمات المفتاحية** *Aspergillus* ، النشاط المضاد للميكروبات ، المواد النشطة بيولوجيا ، النشاط المضاد للأوكسدة *Versicolores* ، UHPLC-HRMS/ MS

# Références



## Références

- Abd El-Ghany T.M. and El-Sheikh H.H (2016). *Mycology*, OMICS eBooks, USA, 133p.
- Abdel-Monem, N., Abdel-Azeem, A. M., El Ashry, E. S. H., Ghareeb, D. A., & Nabil-Adam, A. (2013). Assessment of secondary metabolites from marine-derived fungi as antioxidant. *Open Journal of Medicinal Chemistry*, 3(03), 60.
- Abo-Elmagd, H. I. (2014). Evaluation and optimization of antioxidant potentiality of *Chaetomium madrasense* AUMC 9376. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 12(1), 21-26
- Ahmed, I., Zia, M. A., Hussain, M. A., Akram, Z., Naveed, M. T., & Nowrouzi, A. (2016). Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(2), 148-154.
- Ait Mimoune, N., Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., Bouti, K., Sabaou, N., & Riba, A. (2018). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in dried figs and nuts in Algeria. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11(2), 119-125.
- Al-Shaibani, A. B., & Al-Shakarchi, F. I. (2013). Extraction and characterization of antibacterial compound from *Aspergillus niger*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 16(4), 167-174.
- Ali, T., Ali, I., Khan, N. A., Han, B., & Gao, J. (2018). The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. *BioMed research international*, 2018.
- Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fifty years of drug discovery from fungi. *Fungal Diversity*, 50 (1), 3.
- Amina, B., Sana, G., Atef, J., Laid, D., & Noredine, K. C. (2017). Antibacterial activity of *Aspergillus* isolated from different Algerian ecosystems. *African Journal of Biotechnology*, 16(32), 1699-1704.
- Arora, D. S., & Chandra, P. (2010). Assay of antioxidant potential of two *Aspergillus* isolates by different methods under various physio-chemical conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(3), 765-777.
- Arora, D. S., & Chandra, P. (2011). Antioxidant activity of *Aspergillus fumigatus*. *ISRN pharmacology*, 2011.
- Ashtiani, N. M., Kachuei, R., Yalfani, R., Harchegani, A. B., & Nosratabadi, M. (2017). Identification of *Aspergillus* sections *Flavi*, *Nigri*, and *Fumigati* and their differentiation using specific primers. *Infez Med*, 25(2), 127-132.
- Asrat, B., & Girma, A. (2018). Isolation, production and characterization of amylase enzyme using the isolate *Aspergillus niger* FAB-211. *International Journal of Biotechnology Mol Biol Res*, 9(2), 7-14.
- Astoreca, A. L., Dalcero, A. M., Pinto, V. F., & Vaamonde, G. (2011). A survey on distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in poultry feeds. *International journal of food microbiology*, 146(1), 38-43.

Atehnkeng, J., Ojiambo, P. S., Donner, M., Ikotun, T., Sikora, R. A., Cotty, P. J., & Bandyopadhyay, R. (2008). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* species isolated from maize kernels from three agro-ecological zones in Nigeria. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 74-84.

Azzoune, N., Mokrane, S., Riba, A., Bouras, N., Verheecke, C., Sabaou, N., & Mathieu, F. (2016). Contamination of common spices by aflatoxigenic fungi and aflatoxin B1 in Algeria. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 8(1), 137-144.

**B**acha, N., Dao, H. P., Atoui, A., Mathieu, F., O'Callaghan, J., Puel, O., ... & Lebrihi, A. (2009). Cloning and characterization of novel methylsalicylic acid synthase gene involved in the biosynthesis of isoasperlactone and asperlactone in *Aspergillus westerdijkiae*. *Fungal Genetics and Biology*, 46(10), 742-749.

Bacha, N. (2009). Caractérisation des polycétones synthases intervenant dans la biosynthèse d'ochratoxine A, d'acide pénicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *Aspergillus westerdijkiae* (Doctoral dissertation, Institut National Polytechnique de Toulouse).

Bai, Z. Q., Lin, X., Wang, Y., Wang, J., Zhou, X., Yang, B., ... & Liu, Y. (2014). New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia*, 95, 194-202.

Balcells, M., Canela, R., Coll, J., Sanchís, V., & Torres, M. (1995). Effect of fungal metabolites and some derivatives against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Nezara viridula* (L.). *Pesticide science*, 45(4), 319-323.

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*, 6(2), 71-79.

Belmessikh, A., Boukhalfa, H., Mechakra-Maza, A., Gheribi-Aoulmi, Z., & Amrane, A. (2013). Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 44(3), 377-385.

Bennett, S. E. B. J. W. (2007). An overview of the genus *Aspergillus*. In *The Aspergilli* (pp. 23-34). CRC Press.

Bentley, R. (2000). Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chemical Reviews*, 100(10), 3801-3826.

Blackwell, M. (2011). The Fungi: 1, 2, 3... 5.1 million species?. *American journal of botany*, 98(3), 426-438.

Botton, B., Breton, A., Fèvre, M., Guy, P., Larpent, J. P., & Veau, P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.

Bouti, K., Verheecke-Vaessen, C., Mokrane, S., Meklat, A., Djemouai, N., Sabaou, N., ... & Riba, A. (2019). Polyphasic characterization of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from animal feeds in Algeria. *Journal of Food Safety*, e12743.

Bouyahya, A., Abrini, J., Et-Touys, A., Lagrouh, F., Dakka, N., & Bakri, Y. (2018). Analyse phytochimique et évaluation de l'activité antioxydante des échantillons du miel marocain. *Phytothérapie*, 16(S1), S220-S224.

Brakhage, A. A. (2005). Systemic fungal infections caused by *Aspergillus* species: epidemiology, infection process and virulence determinants. *Current drug targets*, 6(8), 875-886.

Bruneton, J. (2009). Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales (4e éd.). *Tec & Doc/Lavoisier, Paris*, 841-842.

Brzonkalik, K., Hümmer, D., Sylđatk, C., & Neumann, A. (2012). Influence of pH and carbon to nitrogen ratio on mycotoxin production by *Alternaria alternata* in submerged cultivation. *AMB express*, 2(1), 28.

Busi, S., Peddikotla, P., Upadyayula, S. M., & Yenamandra, V. (2009). Isolation and Biological Evaluation of Two Bioactive Metabolites from *Aspergillus gorakhpurensis*. *Records of Natural Products*, 3(3).

**C**alvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), 447-459.

Cano, N., Barnoud, D., Schneider, S. M., Vasson, M. P., Hasselmann, M., & Leverve, X. (Eds.). (2006). *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. Springer Science & Business Media.

Cantrell, S. A., Casillas-Martinez, L., & Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological research*, 110(8), 962-970.

Chabasse, D., Bouchara, J. P., De Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., & Penn, P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. *Cahier de formation BIOFORMA*, 25(160), 19.

Chassagne, F., Cabanac, G., Hubert, G., David, B., & Marti, G. (2019). The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products®. *Phytochemistry Reviews*, 18(3), 601-622.

Chen, X. W., Li, C. W., Cui, C. B., Hua, W., Zhu, T. J., & Gu, Q. Q. (2014). Nine new and five known polyketides derived from a deep sea-sourced *Aspergillus sp.* 16-02-1. *Marine drugs*, 12(6), 3116-3137.

Cheshmi, F., Kazerouni, F., Omrani, M. D., Rahimipour, A., Shanaki, M., Dehghan-Nayeri, N., ... & Kalkhoran, M. R. (2017). Effect of Emodin on Expression of VEGF-A and VEGFR\_2 Genes in Human Breast Carcinoma MCF-7 Cell. *International Journal of Cancer Management*, 10 (7).

Chiang, Y. M., Lee, K. H., Sanchez, J. F., Keller, N. P., & Wang, C. C. (2009). Unlocking fungal cryptic natural products. *Natural product communications*, 4(11), 1934578X0900401113.

Choudhary, M. I., Musharraf, S. G., Mukhmoor, T., Shaheen, F., Ali, S., & Rahman, A. U. (2004). Isolation of bioactive compounds from *Aspergillus terreus*. *Zeitschrift für Naturforschung B*, 59 (3), 324-328.

Chu, D., Peng, C., Ding, B., Liu, F., Zhang, F., Lin, H., & Li, Z. (2011). Biological active metabolite cyclo (L-Trp-L-Phe) produced by South China Sea sponge *Holoxea sp.* associated fungus *Aspergillus versicolor* strain TS08. *Bioprocess and biosystems engineering*, 34(2), 223-229.

Chung, Y. C., Chang, C. T., Chao, W. W., Lin, C. F., & Chou, S. T. (2002). Antioxidative activity and safety of the 50 ethanolic extract from red bean fermented by *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(8), 2454-2458.

Clinical Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards—Ninth Edition.

Coleman, J. J., Ghosh, S., Okoli, I., & Mylonakis, E. (2011). Antifungal activity of microbial secondary metabolites. *PloS one*, 6(9).

Compaore, H., Sawadogo-Lingani, H., Savadogo, A., Dianou, D., & Traore, A. S. (2016). Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 10(1), 198-210.

**D**a Silva, I. P., Brissow, E., Kellner Filho, L. C., Senabio, J., de Siqueira, K. A., Vandresen Filho, S., ... & Junior, P. A. S. (2017). Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*-F7, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(3), 62.

Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 74(3), 417-433.

Dedi, J. K. É., & Diomande, B. Y. (2017). Caractérisation de la mycoflore de grains de maïs (*Zea mays*) destinés à la préparation d'aliments composés pour la volaille. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(6), 2594-2603.

Delarras, C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Éditions Médicales Internationales, Lavoisier*.

Despot, D. J., Kocsubé, S., Bencsik, O., Kecskeméti, A., Szekeres, A., Vágvölgyi, C., ... & Klarić, M. Š. (2016). Species diversity and cytotoxic potency of airborne sterigmatocystin-producing *Aspergilli* from the section *Versicolores*. *Science of the Total Environment*, 562, 296-304.

Despot, D. J., Kocsubé, S., Bencsik, O., Kecskeméti, A., Szekeres, A., Vágvölgyi, C., ... & Klarić, M. Š. (2017). New sterigmatocystin-producing species of *Aspergillus* section *Versicolores* from indoor air in Croatia. *Mycological progress*, 16(1), 63-72.

Després, J. (2012). *L'univers des champignons*. Les Presses de l'Université de Montréal.

Devaraju, R., & Satish, S. (2011). Endophytic Mycoflora of L. and Studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic sp. *Society of Applied Sciences*, 2, 75-79.

Dewi, R. T., Minarti, A. D., & Mulyani, H. (2010). Emodin, an anthraquinone from ethyl acetate extract of *Aspergillus terreus* koji.

Dewi, R. T., Tachibana, S., Itoh, K., & Ilyas, M. (2012). Isolation of Antioxidant Compounds from *Aspergillus Terreus* LS01. *J Microbial Biochem Technol* 4: 010-014. doi: 10.4172/1948-5948.10000

Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.

Dhankhar, S., Kumar, S., Dhankhar, S., & Yadav, J. P. (2012). Antioxidant activity of fungal endophytes isolated from *Salvadora oleoides* Decne. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4(2), 380-385.

Díaz-Godínez, G. (2015). Fungal bioactive compounds: An overview. *Biotechnonology of bioactive compounds: sources and applications*. Chichester, West Sussex, 195-223.

Diba, K., Kordbacheh, P., Mirhendi, S. H., Rezaie, S., & Mahmoudi, M. (2007). Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. *Pakistan journal of medical sciences*, 23(6), 867.

Dinarvand, M., Rezaee, M., Masomian, M., Jazayeri, S. D., Zareian, M., Abbasi, S., & Ariff, A. B. (2013). Effect of C/N ratio and media optimization through response surface methodology on simultaneous productions of intra-and extracellular inulinase and invertase from *Aspergillus niger* ATCC 20611. *BioMed research international*, 2013.

Dubale, B., Solomon, A., Geremew, B., Sethumadhava, R. G., & Waktole, S. (2014). Mycoflora of grain maize (*Zea mays* L.) stored in traditional storage containers (Gombisa and sacks) in selected woredas of Jimma zone, Ethiopia. *African journal of food, agriculture, nutrition and development*, 14(2).

Dudonne, S., Vitrac, X., Coutiere, P., Woillez, M., & Mérillon, J. M. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(5), 1768-1774.

Dumitrescu, O., Dauwalder, O., Boisset, S., Reverdy, M. É., Tristan, A., & Vandenesch, F. (2010). Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus*-Les points-clés en 2010. *Médecine/Sciences*, 26(11), 943-949.

Duran, R., Cary, J. W., & Calvo, A. M. (2010). Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2(4), 367-381.

**E**bada, S. S., El-Neketi, M., Ebrahim, W., Mándi, A., Kurtán, T., Kalscheuer, R., ... & Proksch, P. (2018). Cytotoxic secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* KU258497. *Phytochemistry Letters*, 24, 88-93.

Elaasser, M. M., Abdel-Aziz, M. M., & El-Kassas, R. A. (2011). Antioxidant, antimicrobial, antiviral and antitumor activities of pyranone derivative obtained from *Aspergillus candidus*. *J. Microbiol. Biotech. Res*, 1(4), 5-17.

Elias, B. C., Said, S., de Albuquerque, S., & Pupo, M. T. (2006). The influence of culture conditions on the biosynthesis of secondary metabolites by *Penicillium verrucosum* Dierck. *Microbiological research*, 161(3), 273-280.

Emri, T., Majoros, L., Tóth, V., & Pócsi, I. (2013). Echinocandins: production and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(8), 3267-3284.

Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, 4(2016), 90-101.

**F**awzy, G. A., Al-Taweel, A. M., & Melake, N. A. (2011). In vitro antimicrobial and anti-tumor activities of intracellular and extracellular extracts of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* var. *columinaris*. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(1), 980.

Floegel, A., Kim, D. O., Chung, S. J., Koo, S. I., & Chun, O. K. (2011). Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *Journal of food composition and analysis*, 24(7), 1043-1048.

Fouillaud, M., Venkatachalam, M., Llorente, M., Magalon, H., Cuet, P., & Dufossé, L. (2017). Biodiversity of pigmented fungi isolated from marine environment in La Réunion island, Indian ocean: New resources for colored metabolites. *Journal of Fungi*, 3(3), 36.

Friedman, D. Z., & Schwartz, I. S. (2019). Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. *Journal of Fungi*, 5(3), 67.

Frisvad, J. C. (2012). Media and growth conditions for induction of secondary metabolite production. In *Fungal Secondary Metabolism* (pp. 47-58). Humana Press, Totowa, NJ.

**G**an, R. Y., Kuang, L., Xu, X. R., Zhang, Y., Xia, E. Q., Song, F. L., & Li, H. B. (2010). Screening of natural antioxidants from traditional Chinese medicinal plants associated with treatment of rheumatic disease. *Molecules*, 15(9), 5988-5997.

Garson, M. J., Staunton, J., & Jones, P. G. (1984). New polyketide metabolites from *Aspergillus melleus*: structural and stereochemical studies. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1021-1026.

Gauche, É., & Hausswirth, C. (2006). Stress oxydant, complémentation nutritionnelle en antioxydants et exercice.

Gerke, J., & Braus, G. H. (2014). Manipulation of fungal development as source of novel secondary metabolites for biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(20), 8443-8455.

Ghiasian, S. A., Kord-Bacheh, P., Rezayat, S. M., Maghsood, A. H., & Taherkhani, H. (2004). Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia*, 158(1), 113-121.

Gilbert, T., Drai, J., & Bonnefoy, M. (2013). Stress oxydant et maladie d'Alzheimer. In *Traité sur la maladie d'Alzheimer* (pp. 175-194). Springer, Paris.

Goudable, J., & Favier, A. (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition clinique et métabolisme*, 11(2), 115-120.

Grigoraş, C. G. (2012). Valorisation des fruits et des sous-produits de l'industrie de transformation des fruits par extraction des composés bioactifs (Doctoral dissertation, Université d'Orléans).

Grijseels, S., Nielsen, J. C., Nielsen, J., Larsen, T. O., Frisvad, J. C., Nielsen, K. F., ... & Workman, M. (2017). Physiological characterization of secondary metabolite producing *Penicillium* cell factories. *Fungal biology and biotechnology*, 4(1), 8.

Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Nutrition and Food Sciences*, 3(3), 174-179.

Guezlane-Tebibel, N., Bouras, N., Mokrane, S., Benayad, T., & Mathieu, F. (2013). Aflatoxigenic strains of *Aspergillus* section *Flavi* isolated from marketed peanuts (*Arachis hypogaea*) in Algiers (Algeria). *Annals of microbiology*, 63(1), 295-305.

Gugnani, H. C. (2003). Ecology and taxonomy of pathogenic *Aspergilli*. *Front Biosci*, 8(1-3), 346.

Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*, (edn) Dunod. Paris.

**H**arvey, A. (2000). Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug discovery today*, 5(7), 294-300.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1· 5 million species estimate revisited. *Mycological research*, 105(12), 1422-1432.

Healey, K. R., & Perlin, D. S. (2018). Fungal resistance to echinocandins and the MDR phenomenon in *Candida glabrata*. *Journal of Fungi*, 4(3), 105.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F., Eriksson, O. E., ... & Lumbsch, H. T. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological research*, 111(5), 509-547.

Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perović-Ottstadt, S., Lin, W. H., Wray, V., ... & Ebel, R. (2004). New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Journal of Natural Products*, 67(9), 1532-1543.

Hochberg, M., Kohen, R., & Enk, C. D. (2006). Role of antioxidants in prevention of pyrimidine dimer formation in UVB irradiated human HaCaT keratinocytes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60(5), 233-237.

Hoffmeister, D., & Keller, N. P. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural product reports*, 24(2), 393-416.

Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2005). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, 97(6), 1316-1329.

Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. In *Advances in applied microbiology* (Vol. 86, pp. 199-249). Academic Press.

**I**brahim, D., Welosamy, H., & Lim, S. H. (2015). Effect of agitation speed on the morphology of *Aspergillus niger* HFD5A-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*, 6(3), 265.

Ismail, M. A., El-Maali, N. T. A., Omran, G. A., & Nasser, N. M. (2020). Biodiversity of mycobiota in peanut seeds, corn and wheat grains with special reference to their aflatoxigenic ability. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(4), 314-319.

Izhaki, I. (2002). Emodin—a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155(2), 205-217.

**J**ahangirian, H., Haron, M. J., Shah, M. H., Abdollahi, Y. A. D. O. L. L. A. H., Rezayi, M. A. J. I. D., & Vafaei, N. A. Z. A. N. I. N. (2013). Well diffusion method for evaluation of antibacterial activity of copper phenyl fatty hydroxamate synthesized from canola and palm kernel oils. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 8(3), 1263-1270.

Jakovljević, V. D., Milićević, J. M., Stojanović, J. D., Solujić, S. R., & Vrvic, M. M. (2014). Antioxidant activity of ethanolic extract of *Penicillium chrysogenum* and *Penicillium fumiculosum*. *Hemjska industrija*, 68(1), 43-49.

Jawaid, K., Shafique, M., Versiani, A., Muhammed, H., Naz, S. A., & Jabeen, N. (2019). Antimicrobial potential of newly isolated *Aspergillus terreus* MK-1: An approach towards new antibiotics. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 69(1), 18-23.

Jaeger, E. E., Carroll, N. M., Choudhury, S., Dunlop, A. A., Towler, H. M., Matheson, M. M., ... & Lightman, S. (2000). Rapid Detection and Identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Fusarium* Species in Ocular Samples Using Nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(8), 2902-2908.

Jezak, K., Kozajda, A., Sowiak, M., Brzezniccki, S., Bonczarowska, M., & Szadkowska-Stanczyk, I. (2016). The capability of fungi isolated from moldy dwellings to produce toxins.

Jurjevic, Z., Peterson, S. W., & Horn, B. W. (2012). *Aspergillus* section *Versicolores*: nine new species and multilocus DNA sequence based phylogeny. *IMA fungus*, 3(1), 59.

Jurjević, Ž., Peterson, S. W., Solfrizzo, M., & Peraica, M. (2013). Sterigmatocystin production by nine newly described *Aspergillus* species in section *Versicolores* grown on two different media. *Mycotoxin research*, 29(3), 141-145.

**K**acem-Chaouche, N., Dehimat, L., Meraihi, Z., Destain, J., Kahlat, K., & Thonart, P. (2013). Decommissioned dates: chemical composition and fermentation substrate for the production of extracellular catalase by an *Aspergillus phoenicis* mutant. *Agriculture and Biology Journal of North America*.

Kacem-Chaouche, N., Destain, J., & Thonart, P. (2005). Study of catalase production by an *Aspergillus phoenicis* mutant strain in date flour extract submerged cultures. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 9(3), 173-178.

Kalyani, P., & Hemalatha, K. P. J. (2017). In vitro antimicrobial potential of *Aspergillus niger* (MTCC-961). *Int J Chemtech Res*, 10(4), 430-435.

Kato, H., Nakamura, Y., Finefield, J. M., Umaoka, H., Nakahara, T., Williams, R. M., & Tsukamoto, S. (2011). Study on the biosynthesis of the notoamides: pinacol-type rearrangement of the isoprenyl unit in deoxybrevianamide E and 6-hydroxydeoxybrevianamide E. *Tetrahedron letters*, 52(51), 6923-6926.



- Keller, N. P., Turner, G., & Bennett, J. W. (2005). Fungal secondary metabolism—from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 937-947.
- Kerzaon, I. (2009). Métabolites bioactifs d'Ascomycètes marins: déréplication, isolement, identification et étude de production (Doctoral dissertation, Nantes).
- Khan, A. A., Bacha, N., Ahmad, B., Lutfullah, G., Farooq, U., & Cox, R. J. (2014). Fungi as chemical industries and genetic engineering for the production of biologically active secondary metabolites. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(11), 859-870.
- Khan, S. U., Ahmad, B., Khan, I., Rauf, S., Azam, S., & Ullah, I. (2019). Optimization of Growth Conditions for the Maximum Production of Secondary Metabolites from *Trichoderma harzianum* and their Biological Activities. *Pharmacology*, 15(3), 351-360.
- Kim, M. J., John, K. M., Choi, J. N., Lee, S., Kim, A. J., Kim, Y. M., & Lee, C. H. (2013). Changes in secondary metabolites of green tea during fermentation by *Aspergillus oryzae* and its effect on antioxidant potential. *Food research international*, 53(2), 670-677.
- Kim, Y. M., Lee, C. H., Kim, H. G., & Lee, H. S. (2004). Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(20), 6096-6100.
- Kirk, P. M., Canon, P. F., Minter, D. W., & Staplers, J. A. (2008). Dictionary of the Fungi 10th Edition CABI.
- Knafl, D., Tobudic, S., Cheng, S. C., Bellamy, D. R., & Thalhammer, F. (2017). Dalbavancin reduces biofilms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(4), 677-680.
- Kocić-Tanackov, S., Dimić, G., Tanackov, I., Pejin, D., Mojović, L., & Pejin, J. (2012). The inhibitory effect of oregano extract on the growth of *Aspergillus spp.* and on sterigmatocystin biosynthesis. *LWT*, 49(1), 14-20.
- Koechlin-Ramonatxo, C. (2006). Oxygène, stress oxydant et suppléments antioxydantes ou un aspect différent de la nutrition dans les maladies respiratoires. *Nutrition clinique et métabolisme*, 20(4), 165-177.
- Khoudali, S., Benmessaoudleft, D., Essaqui, A., Zertoubi, M., Azzi, M., & Benaissa, M. (2014). Étude de l'activité antioxydante et de l'action anticorrosion de l'extrait méthanolique des feuilles du palmier nain (*Chamaerops humilis* L.) du Maroc. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(3), 887-898.
- Kumaresan, S., Karthi, V., Senthilkumar, V., Balakumar, B. S., & Stephen, A. (2015). Biochemical constituents and antioxidant potential of endophytic fungi isolated from the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Chennai, India. *Journal of Academia and Industrial Research*, 3(8), 355-361.

- L**adoh, Y. C. F., Dibong, S. D., Nyegue, M. A., Djembissi, T. R. P., Lenta, N. B., Mpondo, M. E., ... & Wansi, J. D. (2014). Activité antioxydante des extraits méthanoliques de *Phragmanthera capitata* (Loranthaceae) récoltée sur *Citrus sinensis*. *Journal of Applied Biosciences*, 84(1), 7636-7643.
- Laguerre, M., López-Giraldo, L. J., Lecomte, J., Pina, M., & Villeneuve, P. (2007). Outils d'évaluation *in vitro* de la capacité antioxydante. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, 14(5), 278-292.
- Lam, K. S. (2007). New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in microbiology*, 15(6), 279-289.
- Lass-Flörl, C. (2009). The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses*, 52(3), 197-205.
- Lee, Y. M., Hong, J. K., Lee, C. O., Bae, K. S., Kim, D. K., & Jung, J. H. (2010). A cytotoxic lipopeptide from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(1), 205-208.
- Lehner, S. M., Neumann, N. K. N., Sulyok, M., Lemmens, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2011). Evaluation of LC-high-resolution FT-Orbitrap MS for the quantification of selected mycotoxins and the simultaneous screening of fungal metabolites in food. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(10), 1457-1468.
- Levine, R. L. (2002). Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 32(9), 790-796.
- Libert, X., Packeu, A., Bureau, F., Roosens, N. H., & De Keersmaecker, S. C. (2017). Discrimination of three genetically close *Aspergillus* species by using high resolution melting analysis applied to indoor air as case study. *BMC microbiology*, 17(1), 84.
- Leon, L. L. D., Caceres, I., Bornot, J., Choque, E., Raynal, J., Taillandier, P., & Mathieu, F. (2019). Influence of the culture conditions on the production of NGPs by *Aspergillus tubingensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(9), 1412-1423.
- Lin, S. Y., Lai, W. W., Ho, C. C., Yu, F. S., Chen, G. W., Yang, J. S., ... & Chung, J. G. (2009). Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways. *Anticancer Research*, 29(1), 327-335.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews*, 4(8), 118.
- Lu, P., Zhao, X., & Cui, T. (2010). Full Length Research Paper Production of emodin from *Aspergillus ochraceus* at preparative scale. *African journal of biotechnology*, 9(4).
- M**agnoli, C., Hallak, C., Astoreca, A., Ponsone, L., Chiacchiera, S., & Dalcerro, A. M. (2006). Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in commercial corn kernels in Argentina. *Mycopathologia*, 161(1), 53.
- Marc, F., Davin, A., Deglene-Benbrahim, L., Ferrand, C., Baccaunaud, M., & Fritsch, P. (2004). Méthodes d'évaluation du potentiel antioxydant dans les aliments. *M/S: médecine sciences*, 20(4), 458-463.

- Marques, V., De Araújo, D., Machado, S. E. F., Ebinuma, V. C. S., Duarte, C. D. A. L., Converti, A., & Porto, A. L. F. (2018). Production of  $\beta$ -lactamase inhibitors by *Streptomyces* species. *Antibiotics*, 7(3), 61.
- Martins, N., Barros, L., Henriques, M., Silva, S., & Ferreira, I. C. (2015). Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. *Industrial Crops and Products*, 74, 648-670.
- Merghache, D., Boucherit-Atmani, Z., & Boucherit, K. (2012). Évaluation de l'activité antifongique de différents extraits de la cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*). *Phytothérapie*, 10(4), 215-221.
- Meyer, V., Andersen, M. R., Brakhage, A. A., Braus, G. H., Caddick, M. X., Cairns, T. C., ... & Krappmann, S. (2016). Current challenges of research on filamentous fungi in relation to human welfare and a sustainable bio-economy: a white paper. *Fungal biology and biotechnology*, 3(1), 6.
- Micheluz, A., Manente, S., Tigini, V., Prigione, V., Pinzari, F., Ravagnan, G., & Varese, G. C. (2015). The extreme environment of a library: xerophilic fungi inhabiting indoor niches. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 99, 1-7.
- Micheluz, A., Sulyok, M., Manente, S., Krska, R., Varese, G. C., & Ravagnan, G. (2016). Fungal secondary metabolite analysis applied to Cultural Heritage: the case of a contaminated library in Venice. *World Mycotoxin Journal*, 9(3), 397-407.
- Migdal, C., & Serres, M. (2011). Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *médecine/sciences*, 27(4), 405-412.
- Mimoune, N. A., Riba, A., Verheecke, C., Mathieu, F., & Sabaou, N. (2020). Fungal contamination and mycotoxin production by *Aspergillus spp.* in nuts and sesame seeds. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(4), 301-305.
- Miragaia, M., Couto, I., Pereira, S. F., Kristinsson, K. G., Westh, H., Jarløv, J. O., ... & de Lencastre, H. (2002). Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence of geographic dissemination. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 430-438.
- Mukherjee, R., Paul, T., Soren, J. P., Halder, S. K., Mondal, K. C., Pati, B. R., & Mohapatra, P. K. D. (2019). Acidophilic  $\alpha$ -amylase production from *Aspergillus niger* RBP7 using potato peel as substrate: a waste to value added approach. *Waste and biomass valorization*, 10(4), 851-863.
- Murthy, N. K., Pushpalatha, K. C., & Joshi, C. G. (2011). Antioxidant activity and phytochemical analysis of endophytic fungi isolated from *Lobelia nicotianifolia*. *J Chem Pharm Res*, 3(5), 218-225.
- N**CCLS Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition. *NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4)*.
- Negri, C. E., Gonçalves, S. S., Xafranski, H., Bergamasco, M. D., Aquino, V. R., Castro, P. T. O., & Colombo, A. L. (2014). Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. *Journal of clinical microbiology*, 52(10), 3633-3640.
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D. J., König, C. C., Valiante, V., ... & Brakhage, A. A. (2015). Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Frontiers in microbiology*, 6, 299.

Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products*, 79(3), 629-661.

Niaz, I., & Dawar, S. (2009). Detection of seed borne mycoflora in maize (*Zea mays* L.). *Pak. J. Bot*, 41(1), 443-451.

Nielsen, J. C., & Nielsen, J. (2017). Development of fungal cell factories for the production of secondary metabolites: linking genomics and metabolism. *Synthetic and systems biotechnology*, 2(1), 5-12.

Nwobodo, D. C., Ugwu, M. C., & Okoye, F. B. C. (2017) Screening of Endophytic Fungal Secondary Metabolites from *Garcinia kola* and *Cola nitida* for Antioxidant Properties.

**O**'Brien, H. E., Parrent, J. L., Jackson, J. A., Moncalvo, J. M., & Vilgalys, R. (2005). Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(9), 5544-5550.

Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in microbiology*, 11(6), 272-279.

Oldham, K. M., & Bowen, P. E. (1998). Oxidative stress in critical care: is antioxidant supplementation beneficial?. *Journal of the American Dietetic Association*, 98(9), 1001-1008.

Otto, M. (2009). *Staphylococcus epidermidis*—the 'accidental' pathogen. *Nature reviews microbiology*, 7(8), 555-567.

**P**alencia, E. R., Hinton, D. M., & Bacon, C. W. (2010). The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins*, 2(4), 399-416.

Palumbo, J. D., & O'Keeffe, T. L. (2015). Detection and discrimination of four *Aspergillus* section *Nigri* species by PCR. *Letters in applied microbiology*, 60(2), 188-195.

Pan, R., Bai, X., Chen, J., Zhang, H., & Wang, H. (2019). Exploring structural diversity of microbe secondary metabolites using OSMAC strategy: A literature review. *Frontiers in microbiology*, 10, 294.

Patel, U., Yan, Y. P., Hobbs, F. W., Kaczmarczyk, J., Slee, A. M., Pompliano, D. L., ... & Bobkova, E. V. (2001). Oxazolidinones mechanism of action: inhibition of the first peptide bond formation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37199-37205.

Pattanaik, B. N., & Mandalia, H. C. (2011). Ethyl acetate: properties, production processes and applications-A review. *IJCRR*, 3, 23-40.

Pavithra, N., Sathish, L., & Ananda, K. (2012). Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences (JPBMS)*, 16(16), 2014.

Penesyan, A., Gillings, M., & Paulsen, I. T. (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20(4), 5286-5298.

- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2928.
- Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. *Mycologia*, *100*(2), 205-226.
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*, *4*(2), 89.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry*, *30*(1), 11-26.
- Piontek, M., Łuszczynska, K., & Lechów, H. (2016). Occurrence of the toxin-producing *Aspergillus versicolor* Tiraboschi in residential buildings. *International journal of environmental research and public health*, *13*(9), 862.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage* (Vol. 519). New York: Springer.
- Prabavathy, D., & Nachiyar, C. V. (2012). Study on the antimicrobial activity of *Aspergillus sp.* isolated from *Justicia adathoda*. *Indian Journal of Science and Technology*, *5*(9), 3317-3320.
- Prescott, Willey J., Sherwood L. M., Woolverton C., (2013). *Microbiologie*. 4<sup>ème</sup> édition, de boeck, Paris, 1070p.
- Pryce, T. M., Palladino, S., Kay, I. D., & Coombs, G. W. (2003). Rapid identification of fungi by sequencing the ITS1 and ITS2 regions using an automated capillary electrophoresis system. *Medical mycology*, *41*(5), 369-381.
- R**ank, C., Nielsen, K. F., Larsen, T. O., Varga, J., Samson, R. A., & Frisvad, J. C. (2011). Distribution of sterigmatocystin in filamentous fungi. *Fungal Biology*, *115*(4-5), 406-420.
- Rank, C., Klejnstrup, M. L., Petersen, L. M., Kildgaard, S., Frisvad, J. C., Held Gotfredsen, C., & Ostenfeld Larsen, T. (2012). Comparative chemistry of *Aspergillus oryzae* (RIB40) and *A. flavus* (NRRL 3357). *Metabolites*, *2*(1), 39-56.
- Rao, P. S., Kalva, S., Yerramilli, A., & Mamidi, S. (2011). Free radicals and tissue damage: Role of antioxidants. *Free radicals and antioxidants*, *1*(4), 2-7.
- Regueira, T. B., Kildegaard, K. R., Hansen, B. G., Mortensen, U. H., Hertweck, C., & Nielsen, J. (2011). Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, *77*(9), 3035-3043.
- Rezaire, A. (2012). *Activité anti-oxydante, et caractérisation phénolique du fruit de palmier amazonien Oenocarpus bataua (patawa)* (Doctoral dissertation, Antilles-Guyane).
- Riba, A., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2008). Mycoflora and ochratoxin A producing strains of *Aspergillus* in Algerian wheat. *International journal of food microbiology*, *122*(1-2), 85-92.

Riba, A., Bouras, N., Mokrane, S., Mathieu, F., Lebrihi, A., & Sabaou, N. (2010). *Aspergillus* section *Flavi* and aflatoxins in Algerian wheat and derived products. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10), 2772-2777.

Romsdahl, J., & Wang, C. C. (2019). Recent advances in the genome mining of *Aspergillus* secondary metabolites (covering 2012–2018). *MedChemComm*, 10(6), 840-866.

Roussel, A. M. (2009). Qui manque d'antioxydants, et comment le savoir?. *Cahiers de nutrition et de diététique*, 44(5), 230-236.

Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., ... & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: regulation by the carbon source. *Critical reviews in microbiology*, 36(2), 146-167.

**S**akhri, A., Kacem Chaouche, N., Catania, M. R., Ritieni, A., & Santini, A. (2019). Chemical Composition of *Aspergillus creber* Extract and Evaluation of its Antimicrobial and Antioxidant Activities. *Polish Journal of Microbiology*, 68(3), 309-316.

Salem, M. L. O., Ghaber, S. M., Baba, S. E. W. O., & Maouloud, M. M. O. (2016). Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus aureus* communautaires dans la région de Nouakchott (Mauritanie). *The Pan African Medical Journal*, 24.

Samson, R. A., Hoekstra, E. S., & Frisvad, J. C. (2004). *Introduction to food-and airborne fungi* (No. Ed. 7). Centraal bureau voor Schimmel cultures (CBS).

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraeken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Varga, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78, 141-173.

Sanchez, S., & Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906.

Saurav, K., & Kannabiran, K. (2013). Bioactivity guided extraction of 5-(2, 4-dimethylbenzyl) pyrrolidin-2-one from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. and its anti-*Aspergillus* activity against drug resistant clinical isolates. *Der Pharmacia Lettre*, 5(3), 178-184.

Schkeryantz, J. M., Woo, J. C., Siliphaivanh, P., Depew, K. M., & Danishefsky, S. J. (1999). Total synthesis of gypsetin, deoxybrevianamide E, brevianamide E, and tryprostatin B: Novel constructions of 2, 3-disubstituted indoles. *Journal of the American Chemical Society*, 121(51), 11964-11975.

Shaaban, M., Nasr, H., Hassan, A. Z., & Asker, M. S. (2013). Bioactive secondary metabolites from endophytic *Aspergillus fumigatus*: Structural elucidation and bioactivity studies. *Revista latinoamericana de química*, 41(1), 50-60.

Sharma, S. K. (2015). Optimized extraction and antioxidant activities of polysaccharides from two entomogenous fungi. *J Bioanal Biomed*, 7(6), 180-187.

Shen, B. (2000). Biosynthesis of aromatic polyketides. In *Biosynthesis* (pp. 1-51). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Shwab, E. K., & Keller, N. P. (2008). Regulation of secondary metabolite production in filamentous ascomycetes. *Mycological research*, *112*(2), 225-230.
- Siddiquee, S. (2018). Recent advancements on the role of biologically active secondary metabolites from *Aspergillus*. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 69-94). Elsevier.
- Simão, R. D. C. G., & Gomes, S. L. (2001). Structure, Expression, and Functional Analysis of the Gene Coding for Calmodulin in the *Chytridiomycete Blastocladiella emersonii*. *Journal of bacteriology*, *183*(7), 2280-2288.
- Simpson, A. G., & Roger, A. J. (2002). Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. *Current Biology*, *12*(20), R691-R693.
- Simpson, A. G., & Roger, A. J. (2004). The real 'kingdoms' of eukaryotes. *Current biology*, *14*(17), R693-R696.
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for fermentation medium optimization: an in-depth review. *Frontiers in microbiology*, *7*, 2087.
- Siqueira, J. P. Z., Sutton, D. A., García, D., Gené, J., Thomson, P., Wiederhold, N., & Guarro, J. (2016). Species diversity of *Aspergillus* section *Versicolores* in clinical samples and antifungal susceptibility. *Fungal biology*, *120*(11), 1458-1467.
- Slack, G. J., Puniani, E., Frisvad, J. C., Samson, R. A., & Miller, J. D. (2009). Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *mycological research*, *113*(4), 480-490.
- Smith, H., Doyle, S., & Murphy, R. (2015). Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. *Food chemistry*, *185*, 389-397.
- Smith, H. A. (2014). Production of antimicrobials and antioxidants from filamentous fungi (Doctoral dissertation, National University of Ireland Maynooth).
- Song, F., Liu, X., Guo, H., Ren, B., Chen, C., Piggott, A. M., ... & Liu, X. (2012). Brevianamides with antitubercular potential from a marine-derived isolate of *Aspergillus versicolor*. *Organic letters*, *14*(18), 4770-4773.
- Soni, N., & Prakash, S. (2011). *Aspergillus Niger* metabolites efficacies against the mosquito larval (*Culex Quinquefasciatus*, *Anopheles Stephensi* and *Aedes Aegypti*) population after column chromatography. *American Journal of Microbiology*, *2*(1), 15-20.
- Steenkamp, E. T., Wright, J., & Baldauf, S. L. (2006). The protistan origins of animals and fungi. *Molecular biology and evolution*, *23*(1), 93-106.
- Sticher, O. (2008). Natural product isolation. *Natural product reports*, *25*(3), 517-554.
- Sugiharto, S., Yudiarti, T., & Isroli, I. (2016). Assay of antioxidant potential of two filamentous fungi isolated from the Indonesian fermented dried cassava. *Antioxidants*, *5*(1), 6.

Sulyok, M., Krska, R., & Schuhmacher, R. (2007). A liquid chromatography/tandem mass spectrometric multi-mycotoxin method for the quantification of 87 analytes and its application to semi-quantitative screening of moldy food samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(5), 1505-1523.

Sahn, S. (2015). Analysis of Secondary Metabolites from *Aspergillus fumigatus* and *Penicillium nalgiovense*. *Acta Universitatis Upsaliensis*, 57.

**T**ati, S., Davidow, P., McCall, A., Hwang-Wong, E., Rojas, I. G., Cormack, B., & Edgerton, M. (2016). *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal candidiasis. *PLoS pathogens*, 12(3).

Tessier, F., & Marconnet, P. (1995). Radicaux libres, systèmes antioxydants et exercice. *Science & sports*, 10(1), 1-13.

Theobald, S., Vesth, T. C., Rendsvig, J. K., Nielsen, K. F., Riley, R., de Abreu, L. M., ... & Hoof, J. B. (2018). Uncovering secondary metabolite evolution and biosynthesis using gene cluster networks and genetic dereplication. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.

Torres, M., Balcells, M., Sala, N., Sanchis, V., & Canela, R. (1998). Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide science*, 53(1), 9-14.

Tsedaley, B., & Adugna, G. (2016). Detection of fungi infecting maize (*Zea mays* L.) seeds in different storages around Jimma, Southwestern Ethiopia. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7, 1-6.

Turkoglu, A., Duru, M. E., Mercan, N., Kivrak, I., & Gezer, K. (2007). Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphureus* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 101(1), 267-273.

**V**alle Jr, D. L., Andrade, J. I., Puzon, J. J. M., Cabrera, E. C., & Rivera, W. L. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian pacific journal of tropical biomedicine*, 5(7), 532-540.

Varga, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). Two new aflatoxin producing species, and an overview of *Aspergillus* section *Flavi*. *Studies in Mycology*, 69, 57-80.

Vega, K., & Kalkum, M. (2011). Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. *International journal of microbiology*, 2012.

Vishwanath, V., Sulyok, M., Labuda, R., Bicker, W., & Krska, R. (2009). Simultaneous determination of 186 fungal and bacterial metabolites in indoor matrices by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395(5), 1355-1372.

**W**ang, H. (2017). *Secondary Metabolites from Fungi: Diversity Enhancement, Structure Elucidation and Bioactivity* (Doctoral dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Wang, X. D., Gu, L. Q., & Wu, J. Y. (2007). Apoptosis-inducing activity of new pyrazole emodin derivatives in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 1113-1116.



- Wang, C. C., Chiang, Y. M., Kuo, P. L., Chang, J. K., & Hsu, Y. L. (2008). Norsolorinic acid inhibits proliferation of T24 human bladder cancer cells by arresting the cell cycle at the G0/G1 phase and inducing a FAS/membrane-bound FAS ligand-mediated apoptotic pathway. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(11), 1301-1308.
- Wang, Y., Zheng, J., Liu, P., Wang, W., & Zhu, W. (2011). Three new compounds from *Aspergillus terreus* PT06-2 grown in a high salt medium. *Marine drugs*, 9(8), 1368-1378.
- Wang, X., Duan, L., Yang, S., Zhou, Z., & Dun, B. (2016). Fast identification of the antibacterial in *Aspergillus* species. *Periodicum biologorum*, 118(4), 425-430.
- Wang, H. (2017). Secondary Metabolites from Fungi: Diversity Enhancement, Structure Elucidation and Bioactivity (Doctoral dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
- Webb, B. J., Ferraro, J. P., Rea, S., Kaufusi, S., Goodman, B. E., & Spalding, J. (2018, August). Epidemiology and clinical features of invasive fungal infection in a US health care network. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 5, No. 8, p. ofy187). US: Oxford University Press.
- Wells, J. M., Cole, R. J., & Kirksey, J. W. (1975). Emodin, a toxic metabolite of *Aspergillus wentii* isolated from weevil-damaged chestnuts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30(1), 26-28.
- Whittaker, R. H. (1969). New concepts of kingdoms of organisms. *Science*, 163(3863), 150-160.
- Wu, R. N., Chen, B. M., Liang, X. S., Shi, Q., Chen, S. Z., Guo, G. H., & Yu, J. (2016). Emodin combined with cisplatin inhibits proliferation and promotes apoptosis in esophageal carcinoma cell line EC-9706 via increasing reactive oxygen species. *Int J Clin Exp Med*, 9(7), 12772-12779.
- X**u, X., Zhang, X., Nong, X., Wang, J., & Qi, S. (2017). Brevianamides and mycophenolic acid derivatives from the deep-sea-derived fungus *Penicillium brevicompactum* DFFSCS025. *Marine drugs*, 15(2), 43.
- Y**adav, M., Yadav, A., Kumar, S., Sharma, D., & Yadav, J. P. (2014). Evaluation of in vitro antimicrobial potential of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. *Int J Pharm Pharm Sci*, 6(5), 208-11.
- Yala, D., Merad, A. S., Mohamedi, D., & Ouar Korich, M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91(1), 5-12.
- Yen, G. C., & Chen, H. Y. (1995). Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 43(1), 27-32.
- Yen, G. C., Chang, Y. C., Sheu, F., & Chiang, H. C. (2001). Isolation and characterization of antioxidant compounds from *Aspergillus candidus* broth filtrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(3), 1426-1431.
- Youcef-Ali, M. (2014). Etude de l'activité anti-*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides (Doctoral dissertation, Université des Frères Mentouri, Constantine).

**Z**ampini, I. C., Ordoñez, R. M., & Isla, M. I. (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, *11*(3), 1159-1163.

Zhao, C., Wu, Y., Li, F., & Jin, X. (2017). Emodin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis in human esophageal cancer cell line ECA109. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, *16*(4), 781-785.

Zhuang, Y., Teng, X., Wang, Y., Liu, P., Wang, H., Li, J., ... & Zhu, W. (2011). Cyclopeptides and polyketides from coral-associated fungus, *Aspergillus versicolor* LCJ-5-4. *Tetrahedron*, *67*(37), 7085-7089.

# Annexes

# Annexe 1

## Composition des milieux de cultures

### Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC)

Glucose	10g
Peptone	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.5g
Agar	15g
Rose Bengal	25mg
Dichloran	2mg
Chloramphénicol	100mg
Eau distillée	1000mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min; le pH final est de 5.5 à 5.8. Le milieu est stocké à l'abri de la lumière (Pitt et Hocking, 2009).

### Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre	250g
Glucose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1000mL

- ✓ Laver la pomme de terre non pelée ;
- ✓ Couper en cubes dans 500 mL ;
- ✓ Porter à ébullition pendant 30 – 45 min ;
- ✓ D'autre part, faire fondre l'agar dans 500 mL d'eau distillée ;
- ✓ Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar ;
- ✓ Ajouter le glucose ;
- ✓ Compléter le volume à 1000 mL ;
- ✓ Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min.

La préparation de PD liquide (**PDB**) est la même, sauf qu'il n'ya pas l'ajout de l'agar.

### Gélose nutritive

Peptone	10g
Extrait de viande	5g
Chlorure de sodium	5g
Gélose	15g
Eau distillée	1000mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 7.2

### **Yeast-extract-Peptone-Glucose-Agar (YPG)**

Extrait de levure	10g
Glucose	20g
Peptone	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 5 (Guiraud, 1998)

### **Czapek concentré**

NaNO <sub>3</sub>	30g
KCl	5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1g
Eau distillée	100mL

### **Czapek Yeast Extract Agar (CYA)**

Czapek concentré	10mL
Sucrose	30g
Extrait de levure	5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.005g
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.01g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 6.2± 0.2 (Samson *et al.*, 2014)

La préparation de CY liquide (**CYB**) est la même, sauf qu'il n'ya pas l'ajout de l'agar.

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

Extrait de malt	20g
Peptone	1g
Glucose	20g
Agar	20g
Eau distillée	1000mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 5.6 (Pitt et Hocking, 2009)

La préparation de ME liquide (**MEB**) est la même, sauf qu'il n'ya pas l'ajout de l'agar.

### **25 % Glycérol Nitrate Agar (G25N)**

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.75g
Czapek concentré	7.5mL
Extrait de levure	3.7g
Glycérol pour analyse	250g
Agar	12g
Eau distillée	750mL

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 7.0 (Pitt and Hocking, 2009)

### **Gélose Sabouraud**

La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est

Peptone de viande (bovin ou porcin)	3
Peptone de caséine (bovin)	3
Peptone de soja	3
Extrait de levure	2
Extrait de malt	1
Glucose	19
Phosphate monopotassique	0.5
Phosphate disodique	0.5
Agar	15

Stériliser par autoclavage à 121° C pendant 15 min, pH 6.4 (Delarras, 2007).

La préparation de Sabouraud liquide (**SDL**) est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar.

## **Annexe 2**

### **Préparation des réactifs, des tampons et des colorants**

#### **Lactophénol bleu coton**

Solution saturée de bleu coton

Bleu d'aniline	10mL
Glycérol	10mL
Lactophénol	100mL
Eau	80mL

# Annexe 3

## Rapport d'analyse de la Collection Allemande des Microorganismes et des cultures cellulaires (DSMZ)

Leibniz-Institut  
DSMZ-Deutsche Sammlung von  
Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH



### Culture ID: 18-096

Sent by Afaf Sakhri

Pure culture

Strain designation: *Aspergillus* sp.

### Identification approach:

We have performed DNA extraction and sequencing of the rDNA ITS fragment, which is the first common DNA-barcode for Fungi (Schoch *et al.* 2012) and the first part (D1/D2) of the large subunit of the rDNA operon (LSU). Furthermore we sequenced the Calmodulin (CALM) gene in part. Comparison of assembled ITS / LSU and CALM sequences was performed with GenBank, MycoID and various other databases.

### Sequence matches:

Species	Gene	GenBank Accession	Strain	Length (base pairs)	Sequence similarity (%)
<i>Aspergillus creber</i>	ITS/LSU	JQ301889	NRRL 58592 (Type)	867/868	99
<i>Aspergillus creber</i>	CALM	JN854043	NRRL 58592 (Type)	666/667	99

### Identification result:

***Aspergillus creber*** Jurjević, S.W. Peterson & B.W. Horn, IMA Fungus 3 (1): 69 (2012) [MB#800598]

*Aspergillus creber* is a member of *Versicolores* Section within the genus *Aspergillus*. The monophyletic *Versicolores* section comprises closely related *Aspergillus* species displaying similar morphological traits (Jurjevic *et al.* 2012). *A. creber* has been observed in food and indoor air samples. Furthermore it has been isolated from clinical samples (Siqueira *et al.* 2016).

PD Dr. Christiane Baschien

Curator

Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH

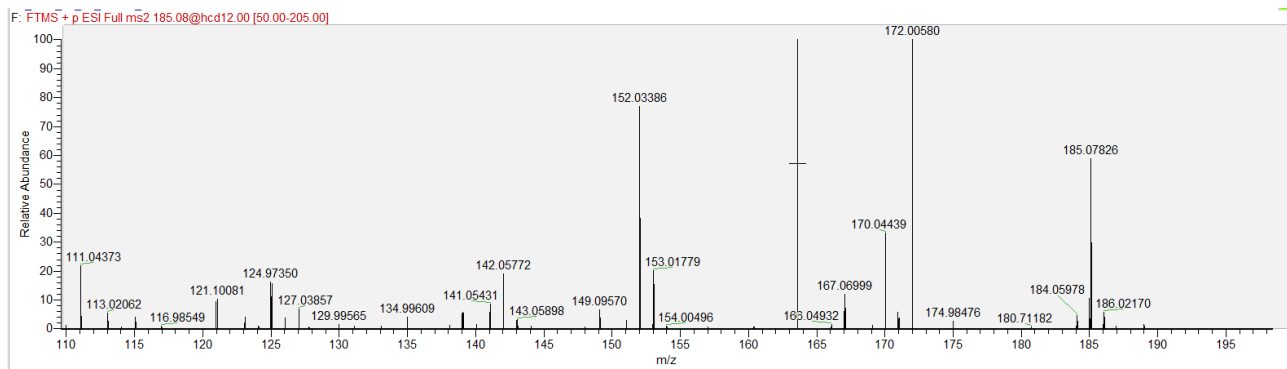
Braunschweig, 22 Mar 18



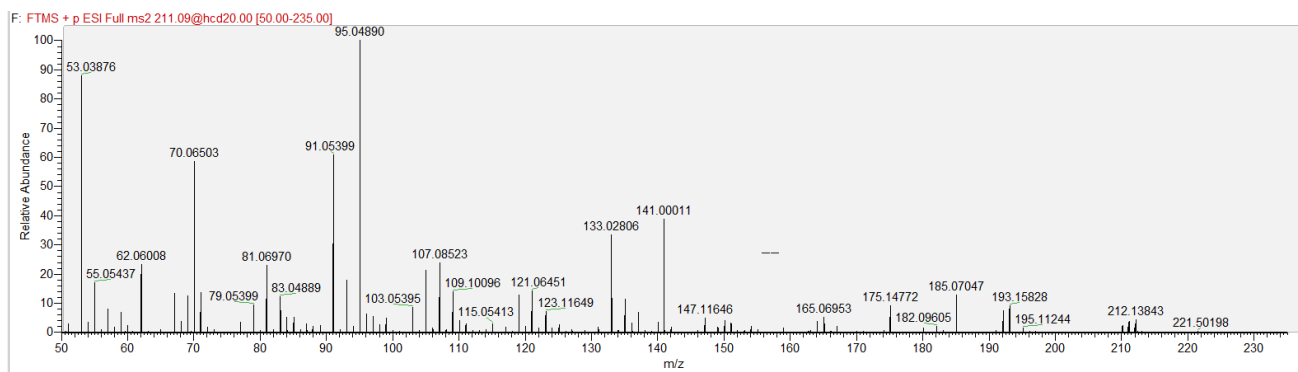
# Annexe 4

## Les spectres de fragmentation MS<sup>2</sup>

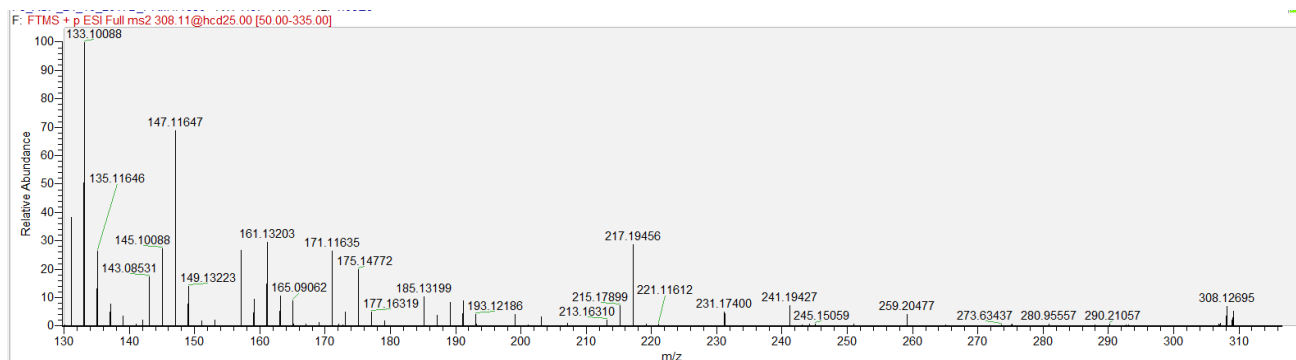
### 1. Composé C1



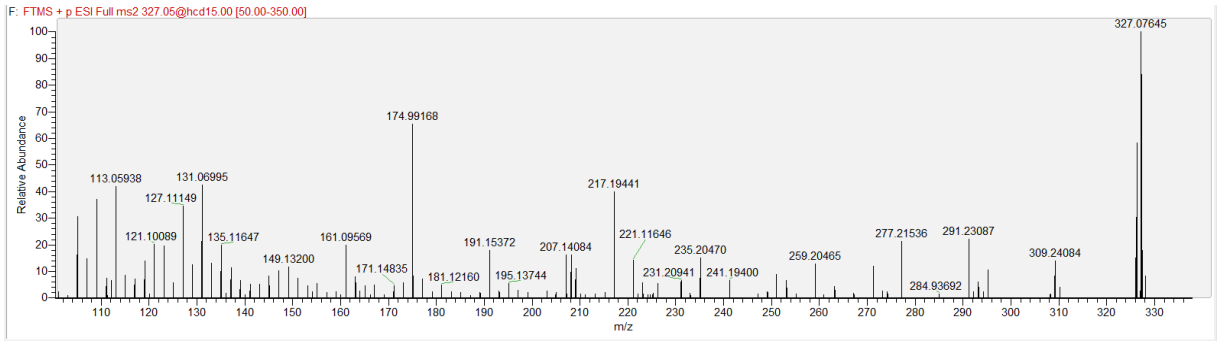
### 2. Composé C2



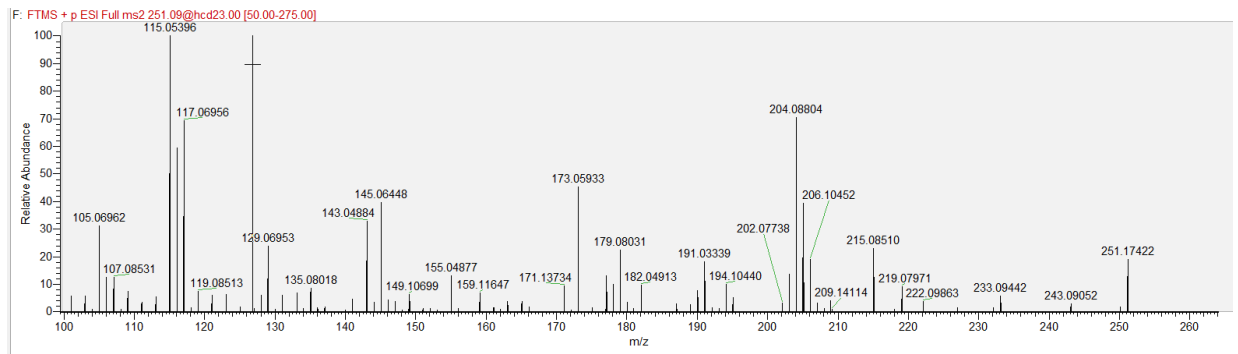
### 3. Composé C3



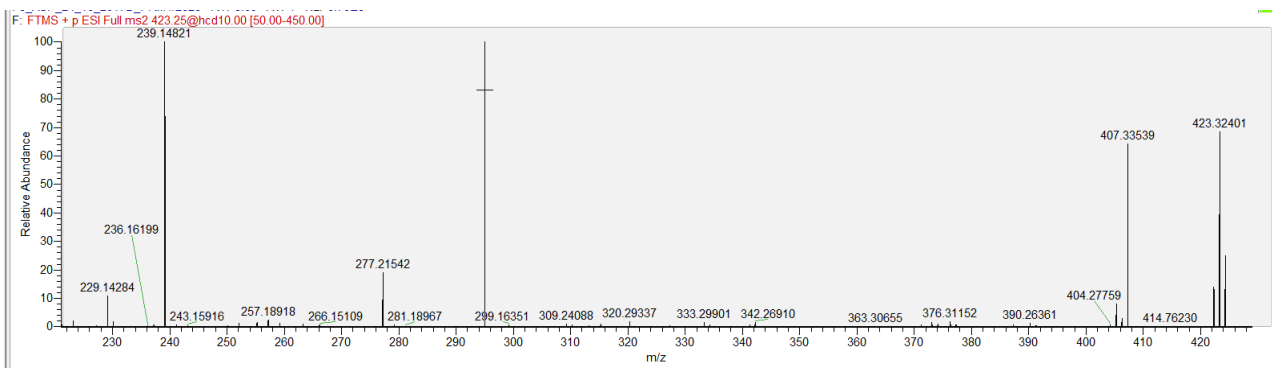
## 4. Composé C4



## 5. Composé C6



## 6. Composé C8



Nom et Prénom : SAKHRI Afaf

Date de soutenance : 07 Juillet 2020

**Thème : Exploitation et caractérisation des substances bioactives  
sécrétées par une souche d'*Aspergillus sp.***

**Résumé**

Le présent travail porte sur l'évaluation d'éventuelles activités biologiques d'une souche d'*Aspergillus* et l'identification des molécules actives potentiellement intéressantes. L'exploration des échantillons de maïs grain destinés à l'alimentation de volailles a permis d'isoler 155 souches fongiques appartenant au genre *Aspergillus*. Une seule souche a été sélectionnée, *in vitro*, par la technique de diffusion sur gélose, pour sa forte activité antimicrobienne. L'identification morphologique et moléculaire de l'isolat sélectionné a montré qu'il s'agit d'*Aspergillus creber*. Le test préliminaire de la production des substances bioactives sur différents milieux de culture submergés a révélé que le milieu Czapeck Yeast Broth (CYB) est le milieu le plus favorable à cette production. Après la production de ces molécules, l'extraction a été faite en utilisant de l'acétate d'éthyle qui s'avérait le plus approprié. L'étude de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'acétate d'éthyle a montré que la souche d'*A. creber* a une forte activité vis-à-vis de *Candida albicans*, avec une valeur de CMI de 0.325 mg/mL, suivie par les bactéries multirésistantes à Gram positif en l'occurrence, *Staphylococcus aureus* productrice de  $\beta$ -lactamase et *Staphylococcus epidermidis* résistant à la méticilline avec une valeur de CMI de 0.625 mg/mL. Les bactéries à Gram négatif se sont avérées plus résistantes avec une valeur de CMI variant de 2.5 à 5 mg/mL. En outre, l'extrait d'*A. creber* a montré une importante capacité de piégeage des radicaux libres DPPH<sup>•</sup> et ABTS<sup>•+</sup> avec des valeurs de IC50 de 108,76±1,02  $\mu$ g/mL et 90,82 ± 0,61  $\mu$ g/mL respectivement, en plus d'un puissant pouvoir réducteur. Le dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu a montré une teneur importante en composés poly-phénoliques estimée à 85.76 mg EGA/g. **Il est important de mettre en exergue, que le présent travail est le premier à avoir montré l'aptitude d'*A. creber* à produire des molécules à activité antimicrobienne et antioxydante.**

L'analyse chromatographique de l'extrait par chromatographie liquide à ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (UHPLC-HRMS/MS) a permis de mettre en évidence la présence de cinq molécules connues en l'occurrence, asperlactone, émodine, stérigmatocystine, deoxybrévianamide E et acide norsolorinique, en plus de cinq autres molécules qui semblent être proches à des molécules connues mais avec certaines différences montrées dans ce travail, ce qui laisse supposer qu'il s'agit, probablement, de nouvelles molécules. A notre connaissance, la mise en évidence de la production d'asperlactone par *A. creber*, est une première, aucune étude n'a mentionné la capacité des espèces du genre *Aspergillus* section *Versicolores*, notamment *A. creber*, à produire ce composé. Ces résultats sont prometteurs et sont considérés comme une avancée remarquable dans le domaine de la recherche des substances naturelles bioactives.

**Mots clés :** *Aspergillus creber*, Activité antimicrobienne, substances bioactives, activité antioxydante, UHPLC-HRMS/MS, *Versicolores*.

**Laboratoire de Recherche :** Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)

**Président de jury :** Mr. HAMIDECHI M. A.

Pr. Univ. Frères Mentouri, Constantine1

**Directeur de thèse :** Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Pr. Univ. Frères Mentouri, Constantine1

**Examineurs :** Mr. HAZZELLAH D.

Pr. Univ. Ferhat Abbes, Sétif

Mr. RIBA A.

Pr. Univ. M'Hamed Bougara, Boumerdes

Mr. SIFOUR M.

Pr. Univ. Mohamed Seddik Ben Yahia, Jijel

Mme. BAHRI F.

M.C.A. Univ. Frères Mentouri, Constantine1