

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة محمد الصديق بن يحيى جيجل

Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie
Département de
Microbiologie Appliquée
et Sciences Alimentaires



كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم: الميكروبيولوجيا التطبيقية
وعلوم التغذية

Mémoire de Master

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée

Thème :

Production de la cystine par *Penicillium chrysogenum* et perspectives d'utilisation pour la prévention des maladies et des altérations causées par les moisissures phyto-pathogènes et d'altération.

Membres du Jury :

Présidente : Dr. AMIRA S.

Examineur : Mr. BOUDJERDA Dj.

Promotrice : Dr. AKROUM S.

Présenté par :

M^{elle} KAIBA Badia

M^{elle} BOUDJATIT Sara

M^{elle} BIROUCHE Bochra

Année Universitaire : 2020-2021.

Numéro d'ordre (bibliothèque) :

Remerciements

Tout d'abord nous rendons grâce à Dieu le Tout Puissant et le Miséricordieux.

Nous voudrions adresser toute notre gratitude à notre promotrice, le Dr AKROUM, pour les directives qu'elle nous a données afin de réaliser ce travail, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexions.

Nous remercions aussi les membres du Jury, la présidente Dr. AMIRA et l'examineur Mr. BOUDJERDA pour avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail et apporter leurs précieuses remarques afin de l'améliorer.

Nous désirons aussi remercier les enseignants du département de microbiologie appliquée et des sciences alimentaires, université de Jijel pour la qualité de l'enseignement qu'ils nous ont donné durant de notre formation en licence et en Master.

De même, nous tenons à remercier vivement tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au succès de ce projet de fin d'études.

Nous remercions nos chers parents, famille ; KAIBA, BIROUCHE et BOUDJAATIT, qui ont toujours été là pour nous soutenir, et nous remercions nos frères et sœurs pour leurs encouragements.

Enfin, à tous ces intervenants, nous présentons nos remerciements, notre respect et notre gratitude.

Dédicace

Je dédie ce projet :

A ma chère mère,

A mon cher père,

Qui n'ont jamais cessé de formuler des prières à mon égard, de me soutenir et de m'épauler pour que je puisse atteindre mes objectifs.

A mes frères

A mes chères sœurs

Pour leur soutien moral et leurs précieux conseils tout au long de mes études.

A mes chères camarades et amies Bochra et Sara, qui ont réalisé ce travail avec moi

Pour leur sympathie et leur sérieux.

A mes chères amies, Nissa et Sama et Assia,

Pour leur aide et supports dans les moments difficiles et pour leur indéfectible soutien et leur patience infinie.

A tous mes autres amies,

A tous.

** Badia**

Dédicace

Je dédie ce travail aux :

Deux personnes les plus chères du monde qui souffrent nuit et jour, les deux qui me donnent du courage, de la confiance, de l'amour de la vie

À mes parents

À mes sœurs

Pour leur soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études

A Mes frères

*A mes amies, mes sœurs dans la vie et les études : **Maissa, Ferail, Fatima, Badia et Sara***

*A La famille **Birouche** et à la famille **Bouchtoute***

À tous

Bohra

Dédicace

A mon père Pour sa patience avec moi et son encouragement.

A ma source de bonheur, ma mère.

Je dédie aussi ce modeste travail :

A mes frères et sœurs, À mes belles sœurs

*Ma grand-mère **Aicha***

A tous les autres membres de ma famille

*Aux camarades qui ont réalisé ce travail avec moi **Bochra et Badia,***

Pour leur sincérité, sérieux et leur sympathie.

*A mes amies, **Saliha, Amal, Meriem, Hadjer, Kaokabe, Asma, Hayat, Ahlame, Amina, Khawla, Samira, Salwa, Lamia, Marwa, Massouda et***

Hoda

Pour leur aide et soutien dans les moments difficiles et Pour leur indéfectible présence.

****Sara****

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Introduction	1
Partie bibliographique	3
Chapitre 1 : Généralités sur <i>Penicillium chrysogenum</i>	3
1. <i>Penicillium chrysogenum</i>	3
1.1. Définition	3
1.2. Taxonomie	3
1.3. Habitat naturel.....	4
1.4. Les conditions de croissances	4
a. La Température	4
b. pH.....	4
c. Activité de l'eau (Aw).	4
2. Molécules antimicrobienne produites par <i>Penicillium chrysogenum</i>	5
2.1 Pénicilline G.....	5
2.2. La chrysogine	5
2.3. Roquefortine C.....	6
2.4. Xanthocilline X.....	6
2.5. Sorbicillinoïdes	7
2.6. Cystine	7
3. Les facteurs qui déclenchent la production des molécules antifongiques	8
3.1. L'agitation.....	8

3.2. Le dioxyde de carbone dissout.....	8
3.3. Le pH.....	8
3.4. La température	8
3.5. La source de carbone.....	8
3.6. La source d'azote	8
3.7. Les acides gras et les nanoparticules.....	9
Chapitre 2 : Les moisissures phyto-pathogènes et la lutte biologique.....	10
1. Les espèces phyto-pathogènes	10
1.1. <i>Alternaria alternata</i>	10
1.2. <i>Alternaria tenuissima</i>	11
1.3. <i>Aspergillus flavus</i>	11
1.4. <i>Aspergillus fumigatus</i>	12
1.5. <i>Geotrichum candidum</i>	12
1.6. <i>Penicillium digitatum</i>	13
2. La lutte biologique	13
2.1. Les agents de lutte biologique.....	13
a. Les bactéries.....	14
b. Les champignons.....	14
2.2. Les avantages de la lutte biologique	14
Matériel et méthode	16
1. Matériel et appareillage utilisés	16
2. Isolement et purification des moisissures	17
2.1 <i>Penicillium chrysogenum</i>	17
2.2. Les moisissures phyto-pathogènes.....	17
3. Identification des moisissures isolées et purifiées	19
3.1. <i>Penicillium chrysogenum</i>	19
3.1.1. Observation macroscopique.....	19

3.1.2. Observation microscopique.....	19
3.2. Moisissures phyto-pathogènes	19
3.2.1 Observation macroscopique.....	19
3.2.2. Observation microscopique.....	19
4. Activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur les phyto-pathogènes	20
4.1. Test de l'activité par affrontement des moisissures	20
4.2. Test de l'activité par la méthode des puits	20
5. Dosage de la pénicilline dans les cultures de <i>P. chrysogenum</i>	21
5.1. Dosage par spectrophotométrie.....	21
5.2. Evaluation du taux par HPLC	22
6. Dosage de la cystine dans les cultures de <i>P. chrysogenum</i>	22
6.1. Dosage par spectrophotométrie.....	21
6.2. Evaluation du taux par HPLC.	22
Résultats	24
1. Isolement et identification de <i>P. chrysogenum</i>	24
1.1. Observation microscopique.....	24
1.2. Observation macroscopique	24
2. Identification des moisissures phyto-pathogènes.....	25
3. Activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur les phyto-pathogènes	31
3.1. Test de l'activité par affrontement des moisissures	31
3.2. Test de l'activité antifongique par la méthode des puits.....	34
4. Dosage de la pénicilline dans les cultures de <i>P. chrysogenum</i>	40
4.1. Dosage par spectrophotométrie.....	40
4.2. Evaluation du taux par HPLC	41
5. Dosage de la cystine dans les cultures de <i>P. chrysogenum</i>	42
5.1. Dosage par spectrophotométrie.....	43
5.2. Evaluation du taux par HPLC	44

Discussion	46
Conclusion	50
Références bibliographiques	51

Liste des figures :

Figure 1 : <i>P. chrysogenum</i> après 14 jours d'incubation à 24±0,5°C sur milieu PDA.....	4
Figure 2 : Structure moléculaire de la pénicilline G.....	5
Figure 3 : Structure moléculaire de la chrysogine	5
Figure 4 : Structure moléculaire de la roquefortine C.....	6
Figure 5 : Structure moléculaire de la xanthocilline X	6
Figure 6 : Schéma de la structure du sorbicillinoïde	7
Figure 7 : Structure moléculaire de la cystine	8
Figure 8 : Différents aspects des altérations causées par <i>Alternaria alternata</i> sur les tomates	10
Figure 9 : Mildiou des feuilles causées par <i>Alternaria tenuissima</i>	11
Figure 10 : Altération des plants de maïs causée par <i>Aspergillus flavus</i>	12
Figure 11 : Exemple des altérations causées par <i>G. candidum</i> chez les fraisières.....	12
Figure 12 : Altérations du citron par <i>P. digitatum</i>	13
Figure 13 : Exemples d'échantillons de plantes infectées utilisés pour le prélèvement des moisissures phyto-pathogènes.	18
Figure 14 : Exemples d'échantillons de fruits et légumes utilisés pour le prélèvement des moisissures phyto-pathogènes.	18
Figure 15 : Observation microscopique de <i>P. chrysogenum</i> au grossissement x40.....	24
Figure 16 : Observation macroscopique de <i>P. chrysogenum</i> sur les différents milieux de culture après 7 jours d'incubation	25
Figure 17 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>P. digitatum</i> après 7 jours d'incubation.....	26
Figure 18 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>P. glabrum</i> après 7 jours d'incubation	26
Figure 19 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Alternaria alternata</i> après 7 jours d'incubation.....	27

Figure 20 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Alternaria rosae</i> après 7 jours d'incubation.....	27
Figure 21 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Alternaria tenuissima</i> après 7 jours d'incubation.....	28
Figure 22 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Geotrichum candidum</i> après 7 jours d'incubation.....	28
Figure 23 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> après 7 jours d'incubation.....	29
Figure 24 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus fumigatus</i> après 7 jours d'incubation.....	29
Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique d' <i>Aspergillus flavus</i> après 7 jours d'incubation.....	30
Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>Rhizomucor pusillus</i> après 7 jours d'incubation.....	30
Figure 27 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>Alternaria alternata</i>	31
Figure 28 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>R. pusillus</i>	31
Figure 29 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>P. glabrum</i>	32
Figure 30 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>S. sclerotiorum</i>	32
Figure 31 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>Aspergillus flavus</i>	33
Figure 32 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>P. digitatum</i>	33
Figure 33 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>G. candidum</i>	33
Figure 34 : résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Alternaria rosae</i>	33
Figure 35 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i>	34
Figure 36 : Résultats de l'affrontement entre <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Alternaria tenuissima</i>	34
Figure 37 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Alternaria alternata</i> ..	35
Figure 38 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>R. pusillus</i>	35
Figure 39 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>P. glabrum</i>	36
Figure 40 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>S. sclerotiorum</i>	36

Figure 41 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Aspergillus flavus</i>	37
Figure 42 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>P. digitatum</i>	38
Figure 43 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>G. candidum</i>	38
Figure 44 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Alternaria rosae</i>	38
Figure 45 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Aspergillus fumigatus</i>	39
Figure 46 : Résultats de l'activité antifongique de <i>P. chrysogenum</i> sur <i>Alternaria tenuissima</i>	39
Figure 47 : Courbe d'étalonnage pour de la pénicilline G	40
Figure 48 : Chromatogramme de la solution étalon de la pénicilline G	41
Figure 49 : Chromatogrammes obtenus pour de la pénicilline G dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3	42
Figure 50 : Courbe d'étalonnage pour de la cystine.....	43
Figure 51 : Chromatogramme de la solution étalon de la cystine	44
Figure 52 : Chromatogrammes obtenus pour de la cystine dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek.....	45

Liste des abréviations:

MEA : Malt Extract Agar.

CYA : Czapek Yeast agar.

G25N : Glycérol 25% Nitrate.

PDA : Potato Dextrose Agar.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

AMPs: Small Cysteine-rich Anti-Microbial Proteins.

PAF : Protein Anti-Fungal.

PAFB : Protein Anti-Fungal Protein B.

HIV: Human immunodeficiency virus.

MDCK: Madin Darby Canine Kidney.

H₁N₁ : Hemagglutinin 1 Neurominidase 1.

PgAFP: *P. chrysogenum* nonglycosylated Anti-Fungal Protein

Liste des tableaux :

Tableau 1 : DO obtenues pour les différentes concentrations de la pénicilline G.....40

Tableau 2 : DO obtenues pour les différentes concentrations de cystine 43

Introduction

Les moisissures sont responsables d'un grand nombre d'altérations des végétaux, ce qui provoque la dévastation de grandes surfaces des jardins, des cultures et des champs. Le fléau économique est rarement évitable à causes de ces infections fongiques. En effet, plus de 80% des maladies des plantes sont causées par des champignons qui appartiennent à toutes les classes des Mycètes sans exceptions : des Ascomycètes, des Deutéromycètes, des Zygomycètes, des Basidiomycètes, des Chytridiomycètes et des Oomycètes (De Lucca 2007). Ces champignons peuvent être présents dans le sol qui est leur habitat naturel, ou transmises aux plantes par les insectes, l'eau d'arrosage, d'autres plantes contaminées, l'utilisation de grains infectés, etc. (De Lucca 2007).

Les infections causées aux végétaux peuvent survenir au niveau des cultures (des plantes) ou après la récolte des fruits (altérations de stockage). Les principales espèces responsables des phyto-altérations et qui causent le plus de dégâts aux cultures appartiennent aux genres *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Mucor* et *Eurotium* (Masanga *et al.* 2015, El Gobashy *et al.* 2018). De plus certaines espèces peuvent même être transmises à l'homme par les plantes ou les fruits altérés comme c'est le cas d'*Aspergillus fumigatus* et *Aspergillus flavus*, lui causant ainsi différentes formes d'aspergilloses, notamment l'aspergillose invasive qui est mortelle dans 60% des cas (Latgé et Chamilos 2019). De même, plusieurs autres espèces phyto-pathogènes appartenant aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor* et *Alternaria* sont responsables d'allergies respiratoires, d'infections mycosiques et de sérieuses intoxications à cause des mycotoxines qu'elles produisent (De Lucca 2007).

Penicillium chrysogenum est une espèce qui est connue principalement pour sa grande capacité à produire les métabolites secondaires à activité antimicrobienne, comme la pénicilline, la chrysogine, la xanthocilline, la valine et la cystine (Lagashetti *et al.* 2019, Horii *et al.* 2020, West et Christina 2021). Cette production s'active quand la moisissure est cultivée dans des conditions défavorables qui déclenchent l'idiophase. Parmi les molécules produites par la moisissure, la cystine représente la molécule qui a le plus grand pouvoir antifongique, en effet elle est capable d'inhiber un grand nombre d'espèces fongiques grâce au soufre qu'elle contient dans sa structure. Elle est un précurseur de synthèse de la pénicilline G et s'active dans les mêmes conditions de synthèse que cette dernière (van der Lende *et al.* 2002).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressées à la recherche d'un moyen efficace pour limiter les infections des plantes en utilisant *P. chrysogenum*. Donc nous avons commencé par isoler plusieurs moisissures phyto-pathogènes à partir des plantes, des fruits et des légumes infectés, puis nous les avons confronté à *P. chrysogenum*. Dans un deuxième temps, nous avons placé cette moisissure dans des conditions qui activent la synthèse des métabolites secondaires et nous avons testé à nouveau l'activité antifongique sur les phyto-pathogènes isolés. Le dosage de la pénicilline G a été réalisé afin d'identifier la source de carbone, la source d'azote, le pH et la T° qui donnaient le plus de production de l'antibiotique, et par la même occasion le plus de synthèse de la cystine, vue qu'est est le précurseur de la pénicilline.

Partie bibliographique

Chapitre 1 : Généralités sur *Penicillium chrysogenum*

1. *Penicillium chrysogenum*

1.1. Définition : *Penicillium* est un genre de champignons appartenant aux Deutéromycètes ou Champignons imparfaits, il est omniprésent dans la nature. Ce genre se reproduit toujours par voie asexuée (Nguyen *et al.* 2017, Sangeetha *et al.* 2020). Il existe plus de 300 espèces de *Penicillium*, et *P. chrysogenum* est considéré comme étant un microorganisme psychrotrophique, halophile et extrêmement ubiquiste (Figure1) (Sangeetha *et al.* 2020).

1.2. Taxonomie : L'espèce *P. chrysogenum* a la classification suivante :

Règne : *Fungi*

Phylum : Ascomycota

Classe : Euecomycete

Ordre : Eurotiales

Famille : Trichomaceae

Genre : *Penicillium*

Espèce : *Penicillium chrysogenum*

En culture, *P. chrysogenum* donne un mycélium blanc qui devient grisâtre à vert foncé. Il est velouté avec une marge blanche de 2 à 3 mm et se caractérise par des gouttelettes d'exsudat souvent présentes sur le CYA et MEA. Au revers, il est beige (Palnam *et al.* 2019, Houbraken *et al.* 2020, Sangeetha *et al.* 2020, Ababutain *et al.* 2021).

Sous microscope, la moisissure affiche des conidiophores émanant du mycélium. Le plus souvent, ils sont disposés individuellement et ramifiés près de l'apex formant un appareil qui porte des conidies en forme de brosse et qui se termine par des phialides (Palnam *et al.* 2019).

Du point de vue morphologique, *P. chrysogenum* se distingue par l'organisation en pinceau. Le thalle est formé de filaments mycéliens septés qui portent des pénicilles constitués des cellules conidiogènes appelées phialides directement porté sur des métules (Figure 1). La ramification des pénicilles est majoritairement terverticillés ou tétra-verticillés et elle est souvent asymétrique (Xia 2018, Vũ *et* Trần 2017).

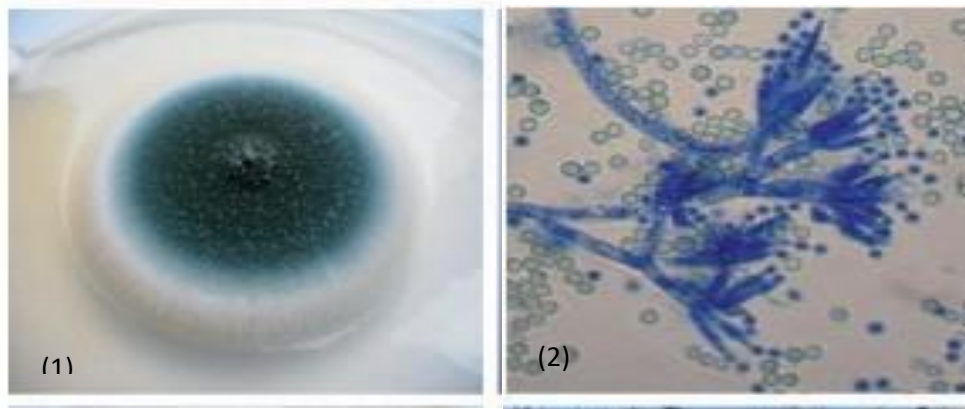


Figure 1 : *P. chrysogenum* après 14 jours d'incubation à $24\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ sur milieu PDA.

1 : aspect macroscopique, 2 : aspect microscopique (Piecuch et Ogórek 2021).

1.3. Habitat naturel : *P. chrysogenum* est un champignon assez commun que l'on peut trouver presque partout dans les régions tempérées et tropicales. Il est souvent isolé du sol, des océans, des produits alimentaires salés, des produits carnés, des environnements intérieurs tels que les archives, les tas de compost et les bâtiments humides (Horwitz 2013).

1.4. Les conditions de croissances : Même si *P. chrysogenum* supporte une large gamme de variations physico-chimiques, sa croissance est néanmoins influencée par trois facteurs importants qui sont :

a. La Température : Elle est l'un des facteurs environnementaux les plus importants qui affecte la croissance microbienne et peut provoquer des altérations dans de nombreuses voies de biosynthèse. La température optimale de *P. chrysogenum* est 25°C . Les températures inférieures à 25°C ou supérieures à 30°C entravent la croissance de l'espèce et ralentissent la croissance (Xia *et al.* 2018).

b. pH : *P. chrysogenum* préfère un pH relativement bas : allant de 4,5 à 6. Comme la plupart des champignons vivant dans des habitats divers, il devrait être considéré comme tolérant aux acides plutôt que strictement acidophile, car il est également capable de se développer à un pH neutre ou même alcalin (Yadav *et al.* 2018).

c. Activité de l'eau (A_w) : Les champignons tolèrent des A_w plus basses que les bactéries. Leur développement optimal se fait entre 0,99 et 0,85 (Carip *et al.* 2015). Chez *P. chrysogenum*, le taux de croissance le plus élevé est observé à $A_w = 0,99$ (Ponizovskaya *et al.* 2011).

2. Molécules antimicrobienne produites par *Penicillium chrysogenum*

La moisissure est capable de produire une large gamme de métabolites à activité antimicrobienne. Parmi les plus connus, nous pouvons citer :

2.1. Pénicilline G : C'est un antibiotique produit durant la phase stationnaire de la croissance. Il appartient à la classe des β -lactames (Figure 2). Il est actif sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne. C'est-à-dire en inhibant la transpeptidase requise pour la réticulation des polymères du peptidoglycane. Cela conduit à des parois cellulaires affaiblies et à l'absorption d'un excès d'eau, ce qui provoque l'éclatement des cellules. La pénicilline G est bio-synthétisée dans les peroxyosomes et est contenue et localisée dans des compartiments dits peroxyosomes (vacuoles et vésicules vacuolaires de 1 μm qui ont une forte teneur en eau) (Van den Berg 2010, Horii *et al.* 2020).

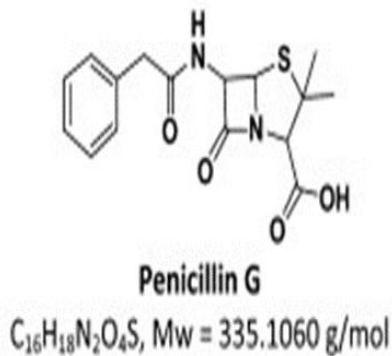


Figure 2 : Structure moléculaire de la pénicilline G (Aldeek *et al.* 2016).

2.2. La chrysogine : Ce produit est un alcaloïde isolé pour la première fois chez *Penicillium chrysogenum* (Figure 3). Il est l'un des métabolites les plus abondants dans le bouillon de culture. Ce pigment jaune est connu pour protéger le microorganisme contre les conditions environnementales défavorables, telles que les rayons ultraviolets (UV) et la présence des germes antagonistes (Wollenberg *et al.* 2017, Viggiano *et al.* 2018, Lagashetti *et al.* 2019).

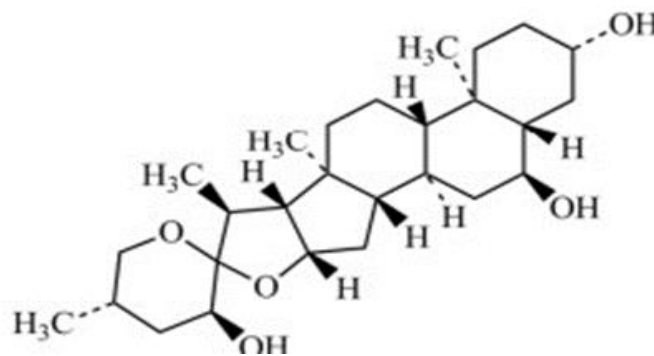


Figure 3 : Structure moléculaire de la chrysogine (Ramesh *et al.* 2019).

2.3. Roquefortine C : Les roquefortines sont produits par nombreuses espèces de *Penicillium*, y compris *P. chrysogenum*. Ils font partie du groupe des alcaloïdes indoliques prénylés et sont dérivés de l'histidyl tryptophanyl dicétopipérazine comme précurseur distinctif (Figure 4). La roquefortine C présente une activité bactériostatique contre les bactéries Gram-positives. L'inhibition de la croissance pourrait être une conséquence d'une influence de la roquefortine sur la respiration bactérienne car l'absorption d'oxygène est réduite à 50 % en présence de cet alcaloïde. La roquefortine est une mycotoxine considérée comme un composé toxique lorsqu'elle est présente dans les produits alimentaires (Fontaine *et al.* 2016, Ouchaou *et al.* 2015, Kosalková *et al.* 2015, Martín et Paloma 2016, Gober et Madeleine 2017, Polli 2017, Maragos 2020).

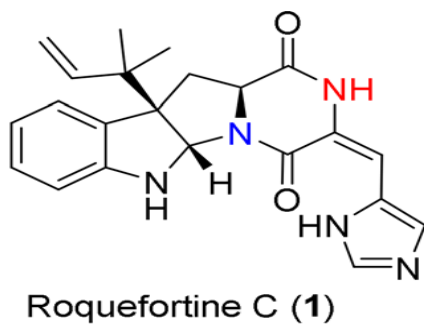


Figure 4 : Structure moléculaire de la roquefortine C (Gober et Madeleine 2016).

2.4. Xanthocilline X : La xanthocilline X a été découverte au milieu des années 1940 chez *P. chrysogenum* et est actuellement produite commercialement comme antibiotique. Cette molécule est un allergène de contact plus puissant que la pénicilline (Hubner *et al.* 2021), elle appartient à la famille des iso-nitriles (Figure 5). Elle a un large spectre d'activité antimicrobienne : un certain nombre de bactéries Gram-positives, de nombreuses bactéries Gram-négatives, des virus, des parasites et certains champignons pathogènes (Lim *et al.* 2018, West et Christina 2021).

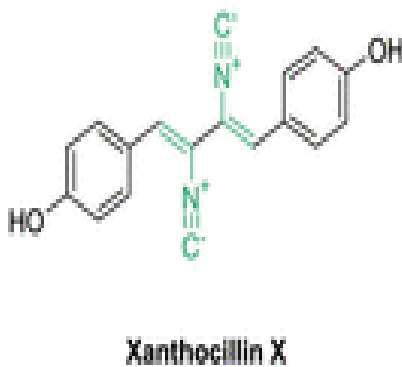


Figure 5 : Structure moléculaire de la xanthocilline X (West et Christina 2021).

2.5. Sorbicillinoïdes : Les pigments jaunes de nature sorbicillinoïdes (vertinoïdes) sont des métabolites hexacétides. La cyclisation a eu lieu à l'extrémité carboxylate qui comprend plus de 90 molécules hautement oxygénées. Beaucoup d'entre eux possèdent des systèmes bicycliques ou tricycliques qui semblent résulter de la dés-aromatisation oxydative et dimérisation/trimérisation de la sorbicilline. La présence de la sidechainsorbyl C1'-C6 est une autre caractéristique structurale de ces composés. Ils peuvent être structurellement classés en quatre groupes : sorbicillinoïdes monomères, bisorbicillinoïdes, trisorbicillinoïdes et sorbicillinoïdes hybrides. Le terme «sorbicillinoïde» a fini par englober la famille dans son ensemble et se réfère généralement à tout composé contenant le squelette carboné de la sorbicilline (Figure 6) (Meng *et al.* 2016, Marra *et al.* 2019).

Sorbicillinoïdes possèdent une activité antifongique par l'inhibition de la biosynthèse du b(1,6)-glucane et une activité antivirale en réprimant l'effet cytopathique induit par le HIV -1 et le virus grippal A (H1N1) dans les cellules MDCK. D'un autre côté, l'isobisvertinol inhibe l'accumulation des gouttelettes lipidiques dans les macrophages ce qui induit l'athérosclérose (Salo *et al.* 2016, Jadhav et Rajesh 2019).

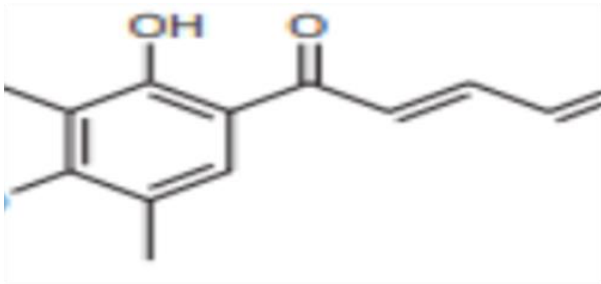


Figure 6 : Schéma de la structure du sorbicillinoïde (Salo *et al.* 2016).

2.6. Cystine : La cystine est une molécule produite en grande quantité par *P. chrysogenum* afin d'inhiber les autres moisissures présentes dans le milieu. Elle représente la substance la plus efficace pour ce rôle. Elle est formée par deux cystéines attachées. La cystéine est le seul acide aminé qui contient du soufre dans sa structure ce qui permet de former des liaisons disulfure (Figure 7). Ce minéral possède des propriétés pertinentes pour être un candidat capable de contrôler les maladies fongiques soit en agissant comme un signal précoce dirigeant la réaction de la plante hôte ou/et en agissant directement sur le développement fongique. La cystine ainsi que la cystéine peuvent causer des dommages importants au noyau, aux mitochondries, au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi des cellules fongiques (Van der Lende *et al.* 2002, Roblin *et al.* 2018, Yang *et al.* 2021).

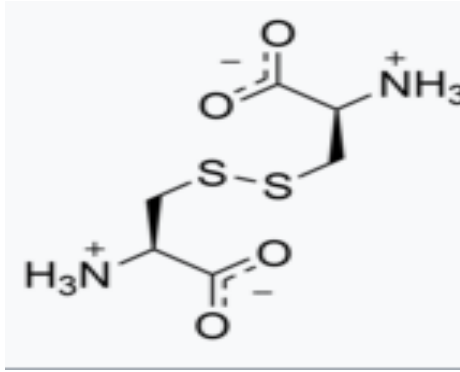


Figure 7 : Structure moléculaire de la cystine (Zhang *et al.* 2020).

3. Les facteurs qui déclenchent la production des molécules antifongiques

Les molécules antifongiques sont produites lors de l'idiophase, soit quand les conditions de culture sont défavorables car ces molécules appartiennent au métabolisme secondaire. Les principaux facteurs qui déclenchent cette production sont :

3.1. L'agitation : Elle doit être modérée dans le cas des organismes mycéliens, mais le plus important est de la maintenir constante. Le changement soudain de la vitesse d'agitation peut entraîner une forte baisse de la productivité des métabolites. Presque aucune ventilation n'est nécessaire pour former les enzymes nécessaires à la production des antibiotiques et des antifongiques (Veiter et Herwing 2019, Veiter *et al.* 2020).

3.2. Le dioxyde de carbone dissout : Le CO₂ dissout dans les cultures sous-marines inhibe le taux de croissance spécifique et le taux de production de composés. Donc il a des effets inhibiteurs sur la croissance des champignons. Les champignons préfèrent l'oxygène atmosphérique (Blombach et Takors 2015).

3.3. Le pH : Le pH du milieu de fermentation est un facteur nécessaire pour la production des métabolites secondaires ; et le pH = 7 est le plus approprié pour une meilleure production (Abbaszadeh *et al.* 2014, Jadhav 2019).

3.4. La température : C'est l'un des principaux facteurs qui déterminent les métabolites secondaires. La production est optimale quand elle est inférieure ou égale à 28°C car la croissance s'arrête et le métabolisme secondaire se déclenche (Kalai *et al.* 2014).

P. chrysogenum est un microorganisme hétérotrophe, il nécessite donc la présence de nutriments de base :

3.5. La source de carbone : Le lactose est l'une des meilleures sources de carbone pour la production de métabolites secondaires. De manière générale, les disaccharides sont la source de carbone la plus largement utilisée (Kalai *et al.* 2014).

3.6. La source d'azote : Les acides aminés sont très utilisés comme source d'azote. Et il est important de noter que la productivité dépend de l'acide aminé utilisé (Weber *et al.* 2012, de almeida *et al.* 2020).

3.7. Les acides gras et les nanoparticules : La présence des acides gras et des nanoparticules est importante pour l'augmenter la production de métabolites secondaires (de almeida *et al.* 2020).

Chapitre 2 : Les moisissures phyto-pathogènes et la lutte biologique

1. Les espèces phyto-pathogènes

Un grand nombre de microorganismes est néfaste pour les plantes, même si les moisissures demeurent les principales espèces incriminées. En effet, les infections causées par ces champignons représentent 80 % des maladies. Parmi les espèces rencontrées, nous pouvons citer :

1.1. *Alternaria alternata* : est l'espèce la plus commune du genre *Alternaria*. C'est une moisissure qui est généralement considérée comme un saprophyte naturel vivant sur les plantes, dans le sol et dans les denrées alimentaires. Elle se développe en parasite facultatif causant des taches noires sur les feuilles, les tiges et les fruits. Cette espèce est néanmoins considérée comme un pathogène faible car elle cause des dégâts limités dans les cultures (Kustrzeba-Wójcicka *et al.* 2014, Wenderoth *et al.* 2017).

Alternaria alternata cause la brûlure alternarienne des feuilles qui est une maladie destructrice des pommes de terre. Elle cause aussi la contamination sous forme des taches noires dans de nombreux fruits et légumes pendant les périodes de stockage frigorifique et de commercialisation. La tomate, les courgettes et des nombreux produits agricoles sont altérés par les mycotoxines de cette espèce (Figure 8) (Gabriel *et al.* 2016, Yang *et al.* 2017, Landschoot *et al.* 2017, Shamsi *et al.* 2019).



Figure 8 : Différents aspects des altérations causées par *Alternaria alternata* sur les tomates (Rizwana *et al.* 2021).

1.2. *Alternaria tenuissima* : est un pathogène mondial rencontré sur une grande variété de cultures, comme la fève, la tomate, le tournesol, la pomme de terre, la pastèque et le melon. Cette espèce est un important agent pathogène aérien. Elle est capable d'infecter les feuilles, les branches et les fruits, causant ainsi le mildiou, le chancre de la tige et certaines pourritures des fruits (Figure 9). Les épidémies des maladies foliaires causées par *Alternaria tenuissima* sont principalement épidémiques et sont particulièrement dévastatrices sur les feuilles de tomates (Fernández *et al.* 2015, Yang *et al.* 2018, Tralamazza *et al.* 2018, Liu *et al.* 2019, Wang *et al.* 2020)



Figure 9 : Mildiou des feuilles causées par *Alternaria tenuissima* (El Gobashy *et al.* 2018).

1.3. *Aspergillus flavus* : est un champignon filamenteux saprophyte largement répandu dans le sol avec des comportements parasitaires opportunistes envers les plantes, les animaux et les humains. *Aspergillus flavus* donne une très bonne croissance à 37°C même si les températures variant entre 12 et 48°C lui sont toutes favorables (Okoth *et al.* 2018, Rudramurthy *et al.* 2019, Wang *et al.* 2019).

Aspergillus flavus est l'agent causal le plus courant de la contamination par l'aflatoxine dans les denrées alimentaires et les aliments pour animaux. Il est aussi le principal producteur d'aflatoxine cancérigène et représente de ce fait le principal problème de sécurité des produits agricoles et médicaux (Okoth *et al.* 2018, Wang *et al.* 2019).

D'un autre côté, *Aspergillus flavus* cause des altérations à différentes plantes comme le maïs, le riz, l'orge ...etc. (Masanga *et al.* 2015) (Figure 10).



Figure 10 : Altération des plants de maïs causée par *Aspergillus flavus* (Masanga *et al.* 2015).

1.4. *Aspergillus fumigatus* : est un champignon saprotrophique à vie mycélienne végétative qui se trouve dans une grande variété de substrats, y compris le sol, le compost, les fruits, les débris organiques animaux et humains. Cette espèce est omniprésente dans l'environnement en raison de sa capacité supérieure à survivre et à se développer dans une plus large gamme de conditions environnementales. Elle est la cause d'une maladie humaine fréquente et redoutable « l'aspergillose ». De même qu'elle peut infecter différentes plantes en culture (Sugui *et al.* 2014, Berger *et al.* 2017, Hurst *et al.* 2017, Latgé *et Chamilos* 2019).

1.5. *Geotrichum candidum* : est une moisissure Deutéromycète qui est rencontrée dans plusieurs denrées alimentaires, soit comme faisant partie de leur constitution normale, soit comme contaminant. *G. candidum* peut contaminer les aliments transformés et nuire à leur qualité nutritionnelle et affecte considérablement la saveur. Elle est aussi responsable de l'altération de plusieurs fruits et légumes comme de plantes productrices (Figure 11). Elle est en effet un phyto-pathogène très répandu dans les cultures. *G. candidum* a une diversité morphologique et une large distribution écologique (Jacques *et al.* 2017, Diwan et Gupta 2020, Konuchová et Valík 2021).



Figure 11 : Exemple des altérations causées par *G. candidum* chez les fraisiers (Ma *et al.* 2018).

1.6. *Penicillium digitatum* : est une moisissure verte qui représente l'agent pathogène le plus dévastateur des agrumes (Figure 12). Elle cause la maladie de la pourriture verte et est responsable d'environ 90% des pertes de production pendant la manipulation post-récolte. Cette espèce produit des tryptoquialanines qui sont des alcaloïdes indoles majeurs sécrétés dans les vésicules extracellulaires lors de l'infection des agrumes. Ces molécules sont aussi inhibitrices de la germination des graines (Palou *et al.* 2014, Costa *et al.* 2019, Papoutsis *et al.* 2019, Costa *et al.* 2021).

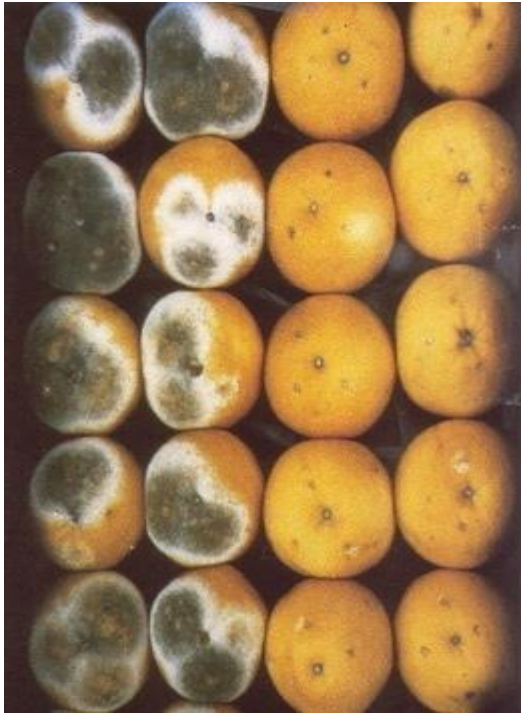


Figure 12 : Altérations du citron par *P. digitatum* (Agrios 2005).

2. La lutte biologique

Les populations de tous les organismes vivants sont, dans une certaine mesure, réduites par les actions naturelles de leurs prédateurs, parasites, agents pathogènes et antagonistes. La lutte biologique est définie comme une méthode de lutte contre les insectes, les mauvaises herbes et les maladies en utilisant des ennemis naturels. Autrement dit, la lutte biologique consiste à utiliser un organisme pour réduire un autre organisme néfaste. Cette pratique est utilisée depuis au moins 2000 ans mais l'utilisation moderne a commencé à la fin du XIXe siècle (Van Lenteren *et al.* 2017, Barratt *et al.* 18, Hajek et Eilenberg 2018).

2.1. Les agents de lutte biologique : Les agents de lutte biologique pourraient être une alternative viable aux produits chimiques dans la gestion des maladies fongiques des cultures. Il existe un large éventail de micro-organismes utilisés comme agents, principalement des isolats bactériens et fongiques. Les champignons ont un éventail d'utilisations plus important dans la lutte biologique et ils sont très commercialisés comme bio-pesticides. Ces microbes favorisent la croissance des plantes soit directement (par fixation d'azote, solubilisation du

phosphate, chélation du fer et production de phyto hormones) ou indirectement (par inhibition des phyto-pathogènes) (Diánez Martínez *et al.* 2016, Sreevidya *et al.* 2015).

a. Les bactéries : Il y a un intérêt croissant ces dernières années pour l'utilisation des bactéries endophytes comme promoteurs de croissance des plantes et comme agents de lutte biologique. Les endophytes bactériens sont capables d'atténuer ou de prévenir les effets délétères de certains organismes pathogènes. Les effets bénéfiques sur leur plante hôte semblent se produire par le biais de divers mécanismes ou par la combinaison de plusieurs mécanismes en même temps. Ces mécanismes comprennent l'antibiose, la promotion de la croissance, l'induction des défenses de l'hôte, le parasitisme, la compétition et l'interférence du signal (Eljounaidi *et al.* 2016).

Les souches des genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Agrobacterium* ont le rôle le plus important dans la lutte biologique. Par exemple : les molécules bioactives du genre *Bacillus* ont un large spectre d'activité antagoniste contre les bactéries, champignons et virus phyto-pathogènes. Ces molécules sont des lipopeptides circulaires des familles de la surfactine, de l'iturine et de la fengycine. Elles affectent les cellules cibles au niveau de la membrane (Fira *et al.* 2018).

b. Les champignons : Parmi les différents types d'espèces utilisées comme agents de lutte biologique, *Trichoderma* représente le genre le plus courant et le plus efficace. Il produit différents types de molécules de contrôle biologique qui effectuent une grande gamme d'interactions telles que l'antibiose, l'antagonisme, le mycoparasitisme et l'induction de réponses de défense des plantes. Le mycoparasitisme est causé par des métabolites secondaires produits par *Trichoderma* et par des enzymes qui dégradent la paroi cellulaire des champignons pathogènes cibles. La pénétration de ces métabolites dans la paroi cellulaire se fait par la production d'enzymes dites « CWDE » (cell wall degrading enzymes). Une fois à l'intérieur du pathogène cible, ces dernières utilisent le matériel de sa paroi cellulaire (β -1,3 glucane et chitine) comme nutriment, ce qui favorise la croissance de *Trichoderma* et détruit la cellule du pathogène (Saravanakumar *et al.* 2016, Waghunde *et al.* 2016).

2.2. Les avantages de la lutte biologique : L'utilisation de la lutte biologique classique a conduit à la protection de la biodiversité et/ou à la protection des produits récoltés dans les systèmes naturels. Elle a aidé à restaurer les systèmes naturels affectés par les espèces adventives et même à préserver les services écosystémiques.

Aussi, l'un des avantages primordiaux de la lutte biologique est qu'elle peut être de nature permanente et se propager d'elle-même. Elle permet aussi la réduction de l'utilisation des pesticides, la réduction des impacts aigus et chroniques des pesticides chimiques sur les humains et l'environnement.

La lutte biologique nécessite un faible coût de développement et assure une on contamination des produits végétaux et des récoltes pas des résidus chimiques (De Clercq *et al.* 2011).

Matériel et méthodes

1. Matériel et appareillage utilisés

Appareils

- Etuve
- Autoclave
- Incubateur-agitateur
- Spectrophotomètre
- Bain-marie
- Vortex
- pH mètre
- Plaque chauffante
- Balance
- Microscope optique
- Balance analytique
- Les tubes à essai
- Flacons
- Micropipette à 100µl
- Embouts
- Eau distillé
- Pipette graduée
- Lame
- Entonnoir

Matériel :

- Boites de Pétri
- Pipette Pasteur
- Anse de platine
- Pince
- Bécher
- Lame bistouri
- Barreau magnétique
- Bec bunsen
- Eprouvette graduée
- Spatule
- **Milieus de culture et produits :**
- Les géloses : Sabouraud, nutritive, MEA, PDA, G25N, CYA, Czapek
- Crystal violet
- Fuch sine
- Alcool
- L'eau physiologique
- Bouillon nutritif
- Cystine
- Pénicilline G
- Méthanol
- Solution de NaCl à 0,15M
- Eau distillée
- Acétonitrile

2. Isolement et purification des moisissures

2.1 *Penicillium chrysogenum*

P. chrysogenum est recherché à partir du sol car il est très répandu dans ce dernier. Pour ce fait, des échantillons du sol sont prélevés à partir de trois endroits de l'Université de Jijel. Les gros débris sont d'abord écartés, puis le prélèvement est effectué à l'aide d'une spatule à 2 cm de profondeur. Les échantillons sont placés dans une boîte de Pétri stérile et transportés au laboratoire.

La solution mère du sol est préparée en mélangeant 1 g du sol dans 10 ml d'eau distillée stérile puis en mélangeant avec le vortex. L'ensemencement de la suspension du sol se fait par étalement sur des boîtes de Pétri contenant le milieu MEA à l'aide d'une pipette Pasteur utilisée comme râteau. L'incubation se fait à 25°C pendant 7 j (El Gobashy *et al.* 2018).

2.2. Les moisissures phyto-pathogènes

Les moisissures phyto-pathogène sont isolées à partir de différentes origines : des feuilles de de rosiers blanc et rouge récoltées au niveau de l'université, des feuilles d'ail, de tomates, de néflier, de pommes de terres récupérés d'un jardin personnel, ainsi que de différentes légumes et fruits altérés (la carotte, l'orange, etc.) qui nous ont été fournis par différents marchands et agriculteurs de la région de Jijel (Figures 1 et 2).

Pour les fruits et légumes altérés, le prélèvement des moisissures est effectué à l'aide d'une anse de platine ou d'une pince stérile. L'ensemencement se fait sur des boîtes de Pétri contenant la gélose MEA ou Sabouraud et l'incubation est réalisée à 25°C pendant 7 j.

Pour les feuilles des rosiers et les plantes, avant de prélever les phyto-pathogènes, nous commençons par le rinçage des échantillons avec de l'eau distillée puis en le mettant dans des vases à montre contenant de l'alcool pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite rincés une deuxième fois puis mis sous le bec. Une fois séchés, l'ensemencement se fait en découpant de petits morceaux des plantes au niveau des altérations par des pinces stériles. L'ensemencement se fait sur la gélose MEA et l'incubation est effectuée à 25°C pendant 7 jours.

Les mycéliums apparus sur les boîtes de Pétri après incubation sont repiqués successivement jusqu'à avoir une purification complète (Masanga *et al.* 2015, El Gobashy *et al.* 2018, Ma *et al.* 2018).

Le repiquage est réalisé par prélèvement d'un fragment du mycélium ciblé à l'aide d'une anse de platine tout en évitant le contact avec les autres colonies avoisinantes. Le milieu utilisé est toujours la gélose MEA et l'incubation s'effectue dans les mêmes conditions que lors du prélèvement.

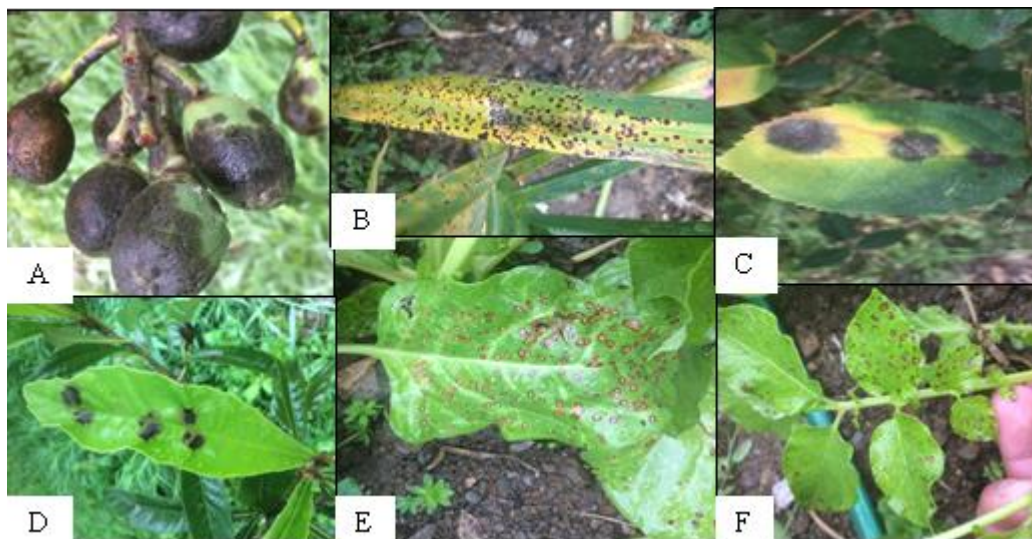


Figure 13 : Exemples d'échantillons de plantes infectées utilisés pour le prélèvement des moisissures phyto-pathogènes.

A : nèfles, B : feuilles d'ail, C : feuilles de rosier blanc, D : feuille de néflier, E : épinards, F : feuilles de pommes de terre.

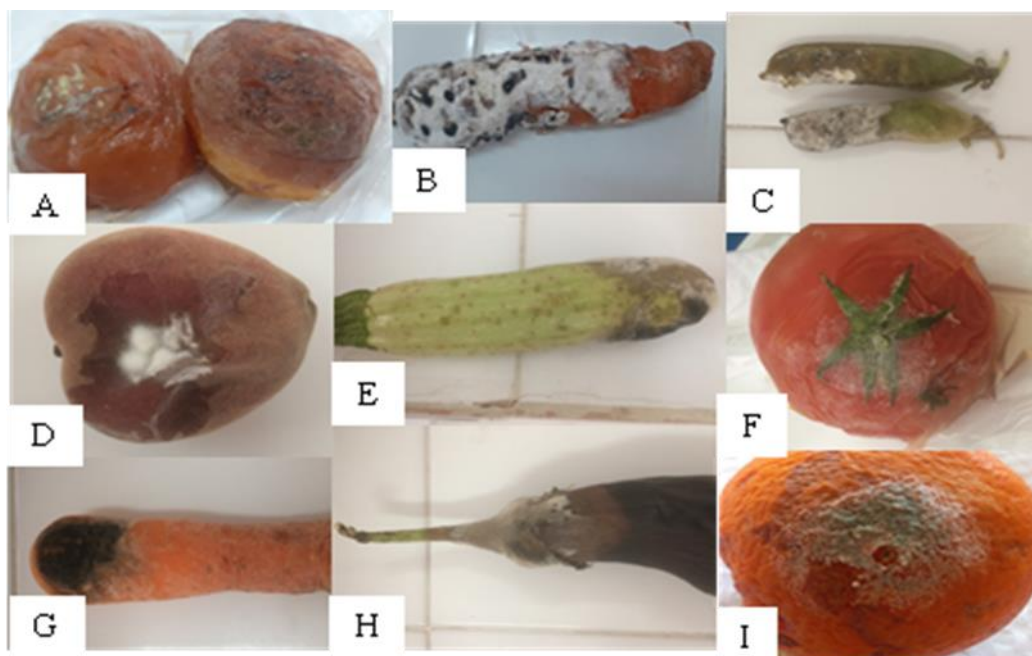


Figure 14 : Exemples d'échantillons de fruits et légumes utilisés pour le prélèvement des moisissures phyto-pathogènes.

A : abricots, B et G : carottes, C : petits pois, D : pêche, E : courgette, F : tomate, H : aubergine, I : orange.

3. Identification des moisissures isolées et purifiées

3.1. *Penicillium chrysogenum*

L'identification de *P. chrysogenum* est basée sur l'observation macroscopique et microscopique du thalle comme décrit par Botton *et al.* 1990.

3.1.1. Observation macroscopique : afin d'identifier parfaitement la moisissure et éviter tout erreur avec des moisissures proches structuralement, *P. chrysogenum* cultivée sur une séries de milieux de culture : MEA, PDA, CYA, Sabouraud et G25N. Sur chaque milieu, la moisissure est déposée par touche grâce à une anse de platine puis ensemencées à 25°C pendant 7 j (Botton *et al.* 1990).

Les caractéristiques culturales recherchées sont les suivantes : aspect, texture et couleurs des mycéliums, production d'exsudat et de pigments solubles, vitesse de croissance, présence de marge et de sillon radiaux, puis couleur au revers des boîtes de Pétri.

3.1.2. Observation microscopique : *P. chrysogenum* est prélevée avec une anse de platine puis déposée sur une lame contenant une goutte d'eau physiologique. Après un léger étalement et le dépôt de la lamelle, l'observation est effectuée au microscope au grossissement x10 puis x40 (Botton *et al.* 1990).

Les caractéristiques microscopiques recherchées sont la structure, la forme, l'aspect et la couleur des structures du *Penicillium*, à savoir le mycélium, les conidies et les pénicilles.

3.2. Moisissures phyto-pathogènes

Comme pour *P. chrysogenum*, l'identification des moisissures phyto-pathogènes est réalisée par caractérisation culturelle et microscopique. Elle s'est faite comme suit :

3.2.1 Observation macroscopique : elle est réalisée après culture sur les milieux MEA et PDA, à 25°C pendant 7 j. Les principales caractéristiques recherchées sont la couleur du thalle au recto et au verso de la boîte, l'aspect du mycélium, la production des sclérotés, de l'exsudat et des pigments (Masanga *et al.* 2015, Ma *et al.* 2018).

3.2.2. Observation microscopique : elle est réalisée selon le même protocole que pour *P. chrysogenum*. Les structures morphologiques ciblées sont :

Le mycélium : couleur, présence ou non de cloisons, ornements et ramification.

Les structures de reproduction : les types d'organes de reproduction, leur localisation et leur aspect.

Les spores : couleur, forme, cloisons, ornementation et disposition (Masanga *et al.* 2015, El Gobashy *et al.* 2018, Ma *et al.* 2018).

Remarque

1. En cas de structures cassantes et difficiles à conserver en prélevant avec l'anse de platine, l'observation microscopique est réalisée en utilisant le ruban adhésif. Ce dernier remplacera alors la lamelle.

2. Pour les thalles hyalins, nous ajoutons une goutte de fuchsine, de bleu de méthylène ou de suspension de violet de gentiane afin de colorer la moisissure et permettre une meilleure appréciation de l'aspect.

4. Activité antifongique de *P. chrysogenum* sur les phyto-pathogènes**4.1. Test de l'activité par affrontement des moisissures**

P. chrysogenum est cultivée sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud, à 25°C, jusqu'à ce que la surface de la gélose soit entièrement recouverte du mycélium. La même chose est réalisée pour les moisissures phyto-pathogènes.

Des disques de moisissures sont prélevés avec la partie large d'une pipette Pasteur stérile et déposés à la surface du milieu Sabouraud. Chaque boîte contient deux disques de *P. chrysogenum* d'un côté et deux autres disques de la moisissure phyto-pathogène testée de l'autre côté. Les boîtes sont ensuite incubées à 25°C, jusqu'à ce que la gélose soit entièrement recouverte de moisissures (Sempere et Santamarina 2010).

La moisissure ayant une activité inhibitrice sur l'autre est celle qui donne une dominance mycélienne sur la boîte de Pétri ; en d'autres termes, celle qui recouvre la plus grande partie de la surface de la gélose (Sempere et Santamarina 2010).

4.2. Test de l'activité par la méthode des puits

Cette méthode offre la possibilité d'utiliser *P. chrysogenum* cultivée dans des conditions favorables afin d'activer la trophophase ou dans des conditions défavorables afin de déclencher l'idiophase.

P. chrysogenum est cultivé dans des bouillons de culture ayant la constitution suivante :

- Czapek 1 (pour 1 litre) : 30 g de saccharose, 2 g de NaNO₃, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,01 g de FeSO₄7H₂O, pH= 6, incubation à 25°C pendant 7 jours (Botton *et al.* 1990).

- Czapek 2 (pour 1 litre) : 30 g d'amidon, 2 g de farine de blé, 1 g de KH₂PO₄, 0,5 g de KCl, 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O, 0,01 g de FeSO₄7H₂O, pH= 7, incubation à 28°C pendant 7 jours.

- Czapek 3 (pour 1 litre) : 30 g de lactose, 2 g de farine de blé, 1 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de KCl , 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{pH} = 7$, incubation à 28°C pendant 7 jours.

Comme nous le remarquons, le bouillon Czapek 1 représente un milieu de choix pour la culture des moisissures : il offre des conditions idéales pour la croissance.

Quant aux milieux Czapeks 2 et 3, ils sont préparés par modification du premier. Plus exactement, en remplaçant les sources de carbone et d'azote par des substances difficiles à dégrader, le pH et la Température par des valeurs plus élevées. Ceci rend es milieux Czapek 2 et 3 défavorables pour la culture fongique.

Les moisissures phyto-pathogènes sont aussi cultivées sur le bouillon Czapek 1, pendant 7 jours à 25°C . Les milieux sont ensuite récupérés, puis agités à l'aide du vortex pendant 5 minutes avant l'utilisation.

À l'aide d'une pipette graduée, 0,1 ml de la suspension de la moisissure phyto-pathogène testée est déposé sur la surface de la gélose Sabouraud puis étalé avec le râteau. Des puits sont ensuite creusés dans la gélose à l'aide d'une pipette Pasteur stérile et dans chaque puits, nous déposons 25 μl des suspensions de *P. chrysogenum* cultivée Czapek 1, 2 et 3. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant sept jours (Botton *et al.* 1990, Cheruiyot *et al.* 2015). L'activité antifongique de *P. chrysogenum* se manifeste de deux manière : soit par l'apparition des zones d'inhibition, soit par le développement de la moisissure au dépens du germe phyto-pathogène.

5. Dosage de la pénicilline dans les cultures de *P. chrysogenum*

La pénicilline est produite par *P. chrysogenum* quand les conditions sont celles de l'idiophase. Et c'est durant cette phase que tous les métabolites de défense de la moisissure sont produits, y compris les métabolites à activité antifongique. Notre objectif en dosant la pénicilline est donc de savoir lequel des milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3 permet la meilleure synthèse des métabolites secondaires.

5.1. Dosage par spectrophotométrie

Des concentrations de la pénicilline G sont préparées en dissolvant la pénicilline G dans de l'eau distillée (0,1 g/ml, 0,2 g/ml, 0,3 g/ml, 0,4 g/ml, 0,5 g/ml). L'eau distillée est utilisée comme blanc (concentration 0 ml/ml). La densité optique est mesurée à 235 nm avec le spectrophotomètre SPEDCORD 50. La courbe d'étalonnage est alors réalisée.

Afin de déterminer la concentration de la pénicilline G dans les cultures de *P. chrysogenum* (Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3), nous filtrons les milieux avec des filtres

stériles de 0,22µm. La densité optique est alors mesurée à 235 nm et le taux de pénicilline G dans les milieux est calculé à partir de la courbe d'étalonnage établie (Anwar et Arif Ali Khan 2020).

5.2. Evaluation du taux par HPLC

Le taux de la pénicilline G est évalué dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3 filtrés avec l'HPLC. Cette dernière comporte une colonne C-18 apolaire inversée, un détecteur UV-visible (SPD-20AV), un dégazeur (DGU-20A3), une pompe (LC-20AT) avec un injecteur à boucle et un enregistreur (C-R8A). La phase mobile pour cette évaluation contient 100% de méthanol. La longueur d'onde utilisée est de 235 nm. La solution étalon de la pénicilline G est préparée en dissolvant 100 mg de l'antibiotique dans 2 ml de méthanol. Les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3 filtrés sont injectés à l'aide d'une seringue spécifique de 20 µl et la durée d'analyse est de 10 min, comme précisé par l'étalon (Anwar et Arif Ali Khan 2020).

6. Dosage de la cystine dans les cultures de *P. chrysogenum*

La cystine est une molécule à forte activité antifongique. Elle est produite par *P. chrysogenum* quand elle est en présence d'autres moisissures antagonistes. La cystine est un précurseur de la pénicilline et est produite dans les mêmes conditions que cette dernière (van der Lende *et al.* 2002).

6.1. Dosage par spectrophotométrie

Différentes concentrations de suspensions de la cystine sont préparées en mélangeant la cystine avec une solution NaCl à 0,15 M (1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml). La densité optique est mesurée à 280 nm avec le spectrophotomètre. Puis une courbe d'étalonnage est réalisée en fonction des concentrations de cystine et des densités obtenues (Varzaru *et al.* 2013).

La concentration de la cystine dans les cultures de *P. chrysogenum* (Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3 filtrés) est mesurée à 280 nm. Le taux de cystine dans les milieux est calculé à partir de la courbe d'étalonnage.

6.2. Evaluation du taux par HPLC :

L'évaluation des taux de cystine produits dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3 a aussi été faite par HPLC en utilisant le même appareil décrit pour l'évaluation du taux de la pénicilline G. La phase mobile utilisée contient l'eau distillée, acétonitrile et le méthanol (20:20:60 v/v/v). La longueur d'onde utilisée est de 390 nm pour la cystine. Les

milieux filtrés sont injectés à l'aide d'une seringue spécifique de 20 µl. La durée d'analyse est de 10mn. La solution étalon préparée pour l'HPLC contient 100 mg de cystine diluée dans 2 ml de la phase mobile (Varzaru *et al.* 2013).

Résultats

1. Isolement et identification de *P. chrysogenum*

P. chrysogenum est isolé à partir du sol de l'université de Jijel. Après quelques repiquages successifs, une moisissure pure est obtenue, elle a les caractéristiques suivantes :

1.1. Observation microscopique : sous microscope, la moisissure présente un thalle verdâtre, septé et très ramifié. Les pénicilles sont triverticillés ou complexes, caractéristiques de l'espèce. Les conidies sont globuleuses et disposées en chainettes plus ou moins longues. Toutes les structures étaient lisses, non ornementées et avaient une paroi simple (Figure 15).

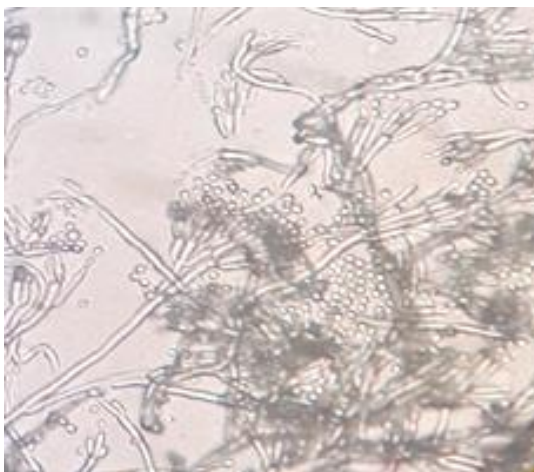


Figure 15 : Observation microscopique de *P. chrysogenum* au grossissement x40.

1.2. Observation macroscopique : l'observation des boîtes de Pétri après 7 jours d'incubation apporte les caractéristiques qui apparaissent sur la Figure 16 et qui sont mentionnées ci-dessous.

Sur le milieu MEA : l'aspect de l'espèce est un mycélium vert-gris foncé avec une marge blanche qui disparaît au bout de quelques jours d'incubation. Le mycélium est aplati, poudreux et produit de grosses gouttes d'exsudat jaunâtre.

Sur la gélose Sabouraud : le thalle est vert, poudreux et avec des contours (marges) blancs. Il avait une forte dissémination. Le revers est jaunâtre.

Sur la gélose CYA : ce mycélium est très important pour l'identification de l'espèce car il permet de mettre en relief les caractéristiques macroscopiques. Le thalle à une couleur verte à vert bleue, il est aplati, avec un centre légèrement surélevé et une marge blanc-neige diffuse. L'exsudat est très faible, de couleur blanchâtre et est localisé au centre du thalle. Les mycéliums ne dépassent pas le diamètre de 3 cm et sont fasciculés.

Sur la gélose PDA : *P. chrysogenum* se présente sous forme de mycélium vert bleu avec des extrémités diffuses et un centre surélevé vert ou jaunâtre.

Sur la gélose G25N : le mycélium est beige avec des zones vertes et marron. Il est poudreux aplati et a un centre très surélevé. Sur ce milieu la moisissure produit un exsudat marron foncé.

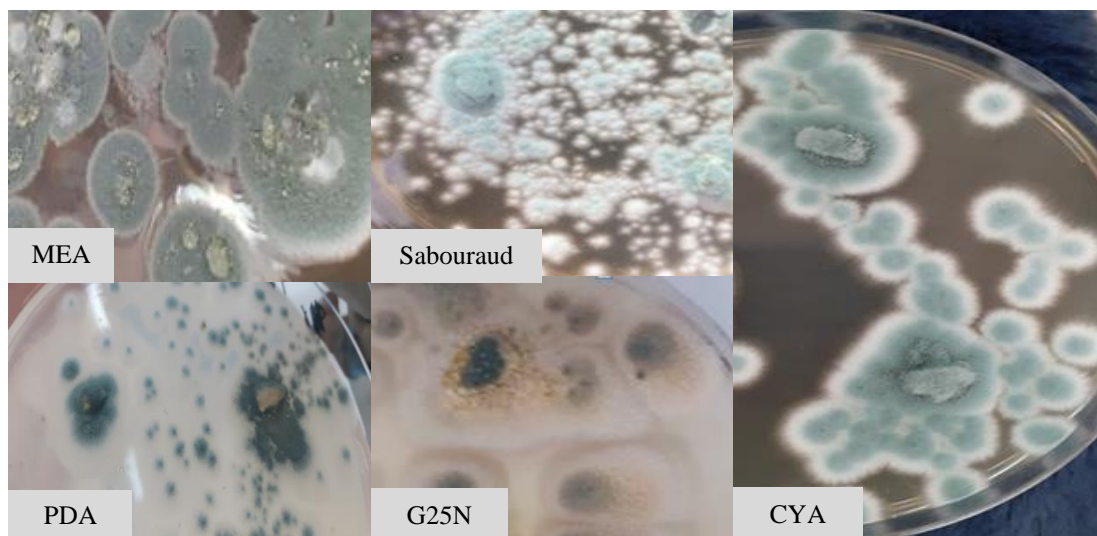


Figure 16 : Observation macroscopique de *P. chrysogenum* sur les différents milieux de culture après 7 jours d'incubation.

2. Identification des moisissures phyto-pathogènes

Plusieurs moisissures sont obtenues par prélèvement au niveau des altérations des plantes (Figure). Nous avons réussi à isoler et à identifier quelques-unes décrites comme suit :

Moisissure 1 : elle se présente sous forme de mycélium vert hyalin, portant des pénicilles triverticillés ou biverticillés. Les conidies sont elliptiques, lisses et disposées en chainettes plus ou moins longues. Sur la boîte de Pétri, cette moisissure a un thalle vert foncé, velouté, sans marge, ni exsudat (Figure 17). Le revers est jaunâtre à brun. Ces caractéristiques indiquent l'espèce *P. digitatum*. La moisissure a été isolée des agrumes infectés (oranges et citrons).

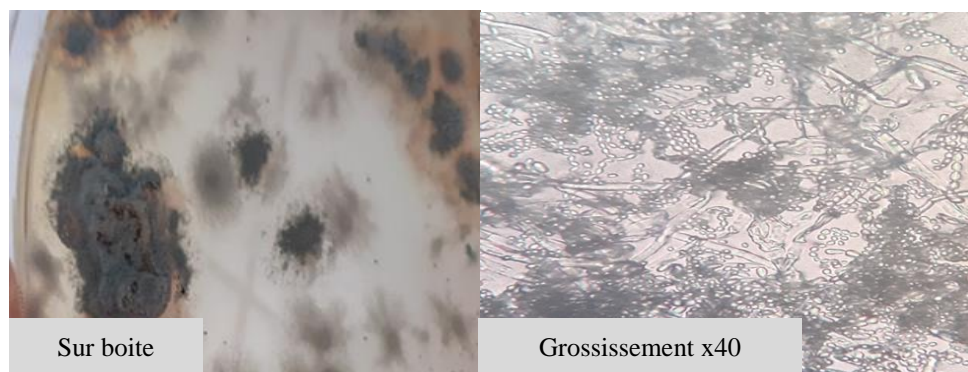


Figure 17 : Aspect macroscopique et microscopique de *P. digitatum* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 2 : elle a un mycélium vert-gris foncé, velouté qui ne dépasse pas 2 cm de diamètre. Il a une dissémination assez importante sur la gélose. Sous microscope, l'espèce a un thalle septé, verdâtre et tortueux. Elle a des conidiophores finement granuleux et des pénicilles monoverticillés et ornementés. Les conidies sont globuleuses disposées en chainettes longues est désordonnées et parfois compactes (Figure 18). Cette espèce est identifiée comme étant *P. glabrum*. Elle a été isolée des feuilles des rosiers blancs et rouges, des épinards, ainsi que des feuilles d'ail.



Figure 18 : Aspect macroscopique et microscopique de *P. glabrum* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 3 : elle a un mycélium brun clair, aplati et un centre surélevé et foncé. Le thalle ne dépasse pas 3 cm de diamètre, il a une croissance très limitée et sans dissémination. Sous microscope, elle présente des filaments marron clair, septés et ramifiés. Elle a des dictyospores cloisonnées longitudinalement et transversalement, de couleur marron, disposées en amas ou en chainettes, et parfois isolées. Elles ont un rostre à l'extrémité fine (Figure 19). Cette espèce est *Alternaria alternata*. Elle a été isolée des tomates et des carottes infectées par des taches noires.

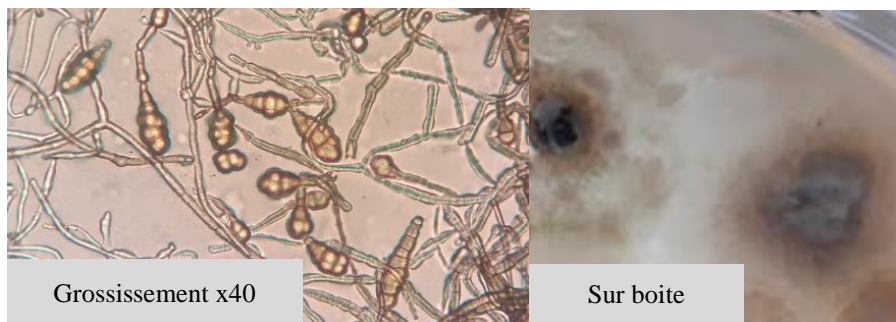


Figure 19 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Alternaria alternata* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 4 : la moisissure 4 a des caractéristiques macroscopiques assez similaires à la précédente, sauf que le centre du mycélium a un aspect lévurien, laiteux et de couleur beige. L'observation microscopique révèle un thalle marron-gris, septé, avec des dictyospores ovoïdes et septées disposées sur des sporophores marron (Figure 20). Cette espèce correspond à *Alternaria rosae*. Elle provient des néfliers (feuilles, tiges et fruits).

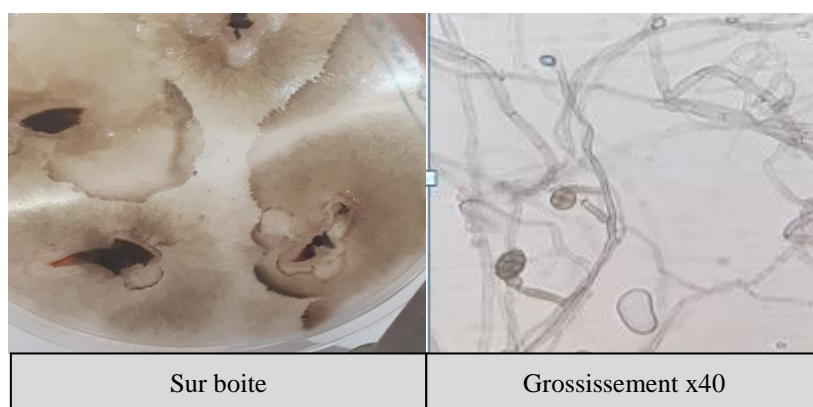


Figure 20 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Alternaria rosae* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 5 : Sous microscope, le thalle est septé, ramifié, brun à gris et a des dictyospores pyrimidiques, cloisonnées dans les deux sens ou juste verticalement et souvent disposées en chainettes. Sur la boîte de Pétri, le thalle est blanchâtre et beige au milieu. Il a une grande vitesse de croissance (Figure 21). Cette description indique qu'il s'agit d'*Alternaria tenuissima*. La moisissure a été isolée des tomates, des courgettes et des feuilles de pomme de terre.

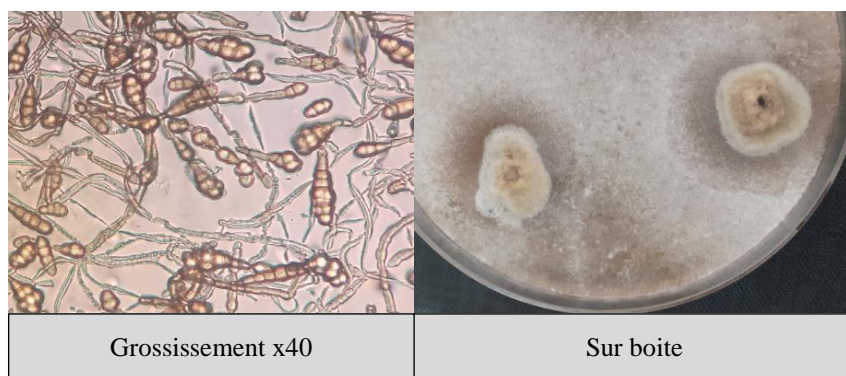


Figure 21 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Alternaria tenuissima* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 6 : elle est de couleur blanche, sans marge et sans exsudat. Elle a une croissance rapide, un thalle plat, assez dense et au centre légèrement surélevé. Sous microscope, elle se présente sous forme de mycélium hyalin, septé et ramifié. Elle se reproduit par fragmentation du thalle et par formation de thallospores rectilignes, plus ou moins longues (Figure 22). Cette espèce est identifiée comme étant *Geotrichum candidum*. Elle provient des pêches et des pommes de terre infectées.

Moisissure 7 : sur la boîte de Pétri, cette moisissure a un thalle blanc, aplati et laineux. A l'état adulte, il forme des sclérotés ovoïdes ou arrondis, noirs et rugueux. Sous microscope, le thalle paraît hyalin, très enchevêtré, septé, tortueux et fin. Il ne présente aucune structure de reproduction (Figure 23). Cette espèce est *Sclerotinia sclerotiorum*. Elle a été isolée des petits pois et des carottes.



Figure 22 : Aspect macroscopique et microscopique de *Geotrichum candidum* après 7 jours d'incubation.

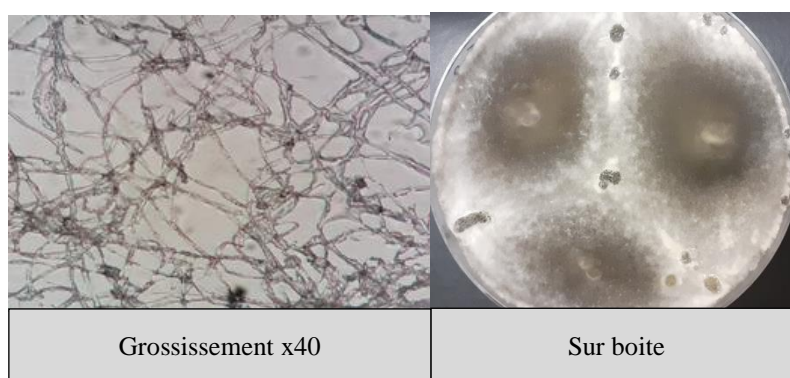


Figure 23 : Aspect macroscopique et microscopique de *Sclerotinia sclerotiorum* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 8 : cette espèce a un thalle verdâtre, poudreux, cotonneux au centre et d'aspect dense. Sous microscope, elle affiche un mycélium septé, hyalin à verdâtre et des têtes aspergillaires avec des columelles arrondies, surmontées de longues chainettes de spores dirigées vers la partie supérieure. Les spores sont globuleuses, verdâtres, lises et recouvrent juste la moitié des columelles (Figure 24). Cette moisissure correspond à *Aspergillus fumigatus*. Elle provient des abricots et des pêches présentant des altérations blanchâtres à verdâtres.

Moisissure 9 : elle a un mycélium blanc, tacheté de points noir. Il est poudreux et aplati. L'observation microscopique révèle un mycélium hyalin, septé et des sporophores hyalins à la base et marron en haut. Ils portent des columelles arrondies marron. Les conidies sont globuleuses, marron, lisses et disposées en longues chainettes. Elles sont nettement petites par rapport à celles de l'espèce précédente (Figure 25). Cette moisissure est identifiée comme étant *Aspergillus flavus*. Elle est responsable de l'altération des pêchers et des figiers (feuilles et fruits).

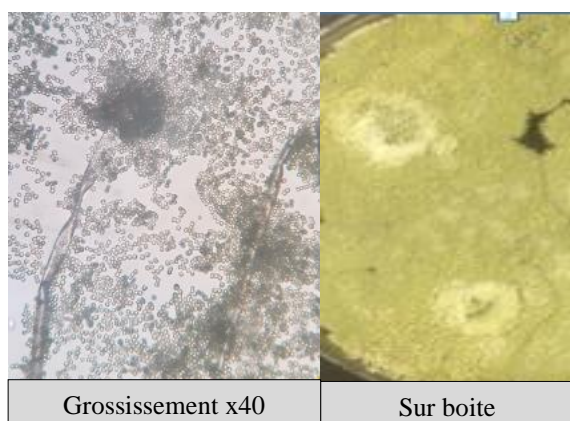


Figure 24 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus fumigatus* après 7 jours d'incubation.

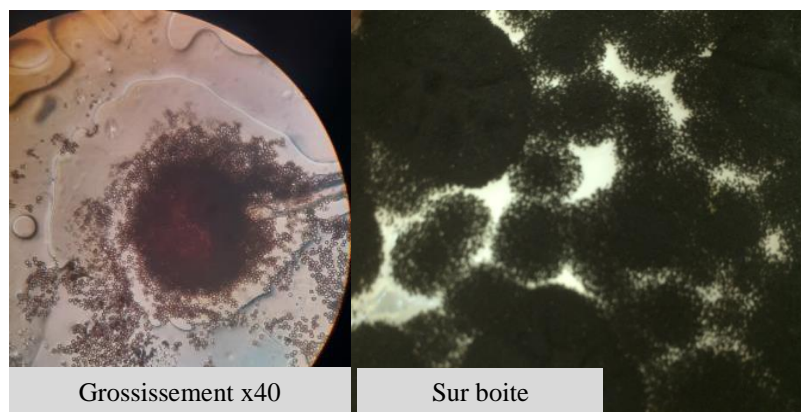


Figure 25 : Aspect macroscopique et microscopique d'*Aspergillus flavus* après 7 jours d'incubation.

Moisissure 10 : cette espèce correspond à une Mucorale car elle présente sous microscope des rhizoïdes sur lesquels des stolons sont disposés. Les sporocystes sont globuleux, petits, et de couleur marron clair. Ils sont lisses et contiennent des spores à l'intérieur. Ces dernières sont elliptiques à rectangulaires (Figure 26). Sur la boîte de Pétri, le thalle est légèrement cotonneux, poudreux et faiblement dense. Il est de couleur beige et a une croissance très rapide. Cette espèce est *Rhizomucor pusillus*. Elle a été isolée des tomates, des aubergines et des courgettes présentant des altérations laineuses et aérées, de couleur blanche à beige.

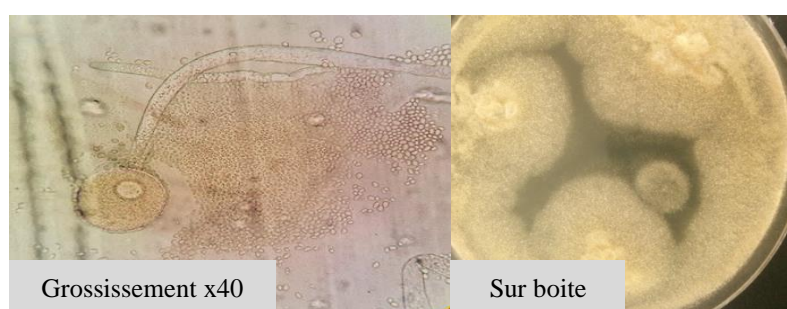


Figure 26 : Aspect macroscopique et microscopique de *Rhizomucor pusillus* après 7 jours d'incubation.

3. Activité antifongique de *P. chrysogenum* sur les phyto-pathogènes

3.1. Test de l'activité par affrontement des moisissures

Activité sur *Alternaria alternata* :

Après 7 jours d'incubation, la croissance de *P. chrysogenum* est supérieure à celle d'*Alternaria alternata*. En effet, *P. chrysogenum* stoppe la croissance de ce phyto-pathogène en se disséminant sur la quasi-totalité de la boîte (Figure 27). Ces résultats indiquent que *P. chrysogenum* présente une activité antifongique important vis-à-vis *Alternaria alternata*.

Activités sur *R. pusillus* :

R. pusillus donne une croissance supérieure à celle de *P. chrysogenum*. En effet, elle a grande dissémination sur la boîte qui recouvre même une partie du thalle de *P. chrysogenum* (Figure 28). Ceci indique que cette dernière n'a pas la capacité d'inhiber la croissance du phyto-pathogène.



Figure 27 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *Alternaria alternata*.



Figure 28 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *R. pusillus*.

Activité sur *P. glabrum* :

Les résultats montrent que la croissance mycélienne de *P. glabrum* est nettement supérieure à celle de *P. chrysogenum* (Figure 29). Ceci indique que *P. chrysogenum* n'a pas une activité antifongique sur ce phyto-pathogène.

Activité sur *S. sclerotiorum* :

Cette espèce occupe une surface inférieure à celle de *P. chrysogenum*. En effet, ce dernier montre une dominance de croissance face à la moisissure, ce qui confirme son activité antifongique sur elle (Figure 30).



Figure 29 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *P. glabrum*.

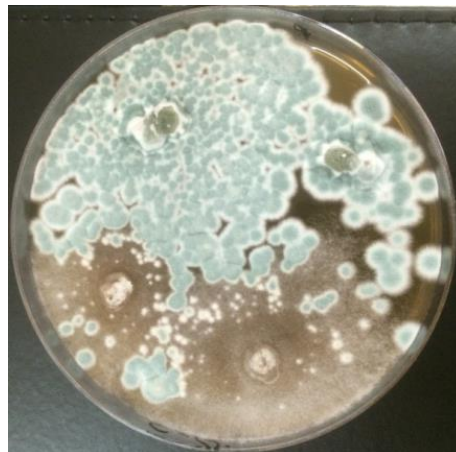


Figure 30 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *S. sclerotiorum*.

Activité sur *Aspergillus flavus* :

A la fin de l'incubation, la surface recouverte par *Aspergillus flavus* est supérieure à celle de *P. chrysogenum*. En effet, la moisissure phyto-pathogène avait une dominance mycélienne sur la boîte de Pétri face à *P. chrysogenum* (Figure 31). Ceci indique que cette dernière n'est pas capable de limiter le développement d'*Aspergillus flavus*.

Activité sur *P. digitatum* :

Cette espèce donne une croissance égale face à celle de *P. chrysogenum* : nous remarquons que les deux espèces recouvrent pratiquement la même surface de la gélose (Figure 32). Donc, aucune des deux espèces n'a une dominance sur l'autre. Et *P. chrysogenum* n'a pas d'activité inhibitrice sur ce phyto-pathogène.



Figure 31 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *Aspergillus flavus*.



Figure 32 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *P. digitatum*.

Activité sur *G. candidum* :

Les mycéliums de *G. candidum* occupent une surface très inférieure à celle de *P. chrysogenum*. Ce dernier a donc une dominance mycélienne nette face à la moisissure phytopathogène (Figure 33). *P. chrysogenum* inhibe la croissance de *G. candidum*.

Activité sur *Alternaria rosae* :

P. chrysogenum à un grand développement sur la surface de la boîte, il limite largement la croissance d'*Alternaria rosae* (Figure 34). Ces résultats indiquent que *P. chrysogenum* présente un pouvoir d'inhibition important vis à-vis d'*Alternaria rosae*.



Figure 33 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *G. candidum*.

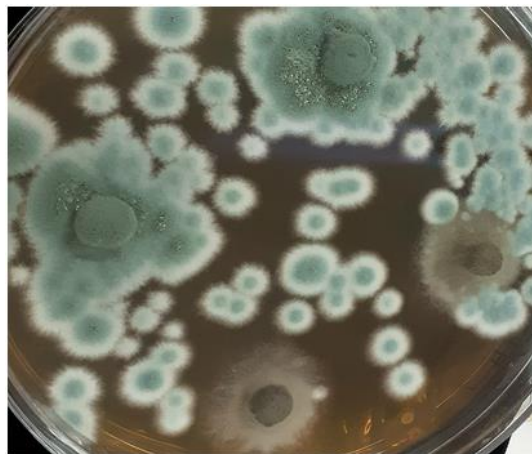


Figure 34 : résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* sur *Alternaria rosae*.

Activité sur *Aspergillus fumigatus* :

Après la période d'incubation, la grande partie de la surface de la boîte est recouverte par *P. chrysogenum* qui entoure les deux petits mycéliums d'*Aspergillus fumigatus* (Figure 35). Ceci indique que *P. chrysogenum* arrive à inhiber ce pathogène.

Activité sur *Alternaria tenuissima* :

La croissance d'*Alternaria tenuissima* est limitée par le développement de *P. chrysogenum* qui se propage rapidement sur la boîte de Pétri. En effet, cette moisissure donne une croissance plus élevée que celle du phyto-pathogène (Figure 36). Donc, *P. chrysogenum* est capable d'inhiber la croissance d'*Alternaria tenuissima*.



Figure 35 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* et *Aspergillus fumigatus*



Figure 36 : Résultats de l'affrontement entre *P. chrysogenum* sur *Alternaria tenuissima*.

3.2. Test de l'activité antifongique par la méthode des puits

Activité sur *Alternaria alternata* :

Dans les puits qui contiennent les milieux Czapeks, il y a une bonne croissance de *P. chrysogenum* qui se développe et recouvre toute la surface de la boîte de Pétri, inhibant ainsi totalement la croissance d'*Alternaria alternata* (Figure 37).

Ce résultat confirme que *P. chrysogenum* a une bonne activité antifongique sur le phyto-pathogène quelles que soient ses conditions de culture. Car en effet, aucune différence n'est notée entre les Czapeks 1, 2 et 3.

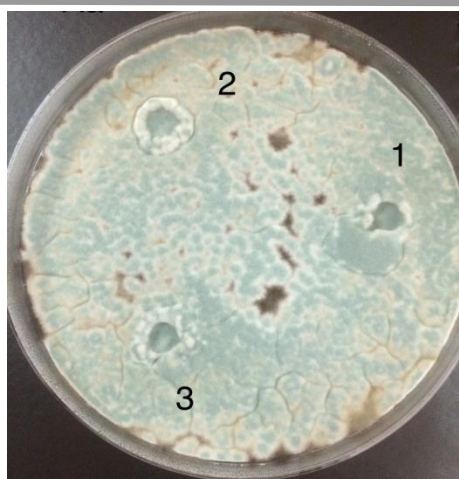


Figure 37 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *Alternaria alternata*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *R. pusillus* :

Le développement de *R. pusillus* est limité par la croissance de *P. chrysogenum* qui présente des zones de développement dans les trois puits. Les Czapeks 2 et 3 donnent néanmoins une plus grande surface de croissance de *P. chrysogenum* (Figure 38). Ceci indique que l'activité antifongique est plus importante quand la moisissure est placée en idiophase.

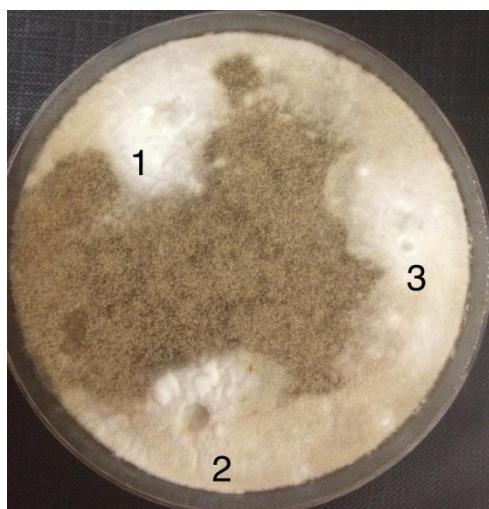


Figure 38 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *R. pusillus*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *P. glabrum* :

P. glabrum donne une grande dissémination sur la surface de la boîte. Elle encercle et inhibe entièrement la croissance de *P. chrysogenum*. Ce qui indique que quelle que soient les conditions de culture, *P. chrysogenum* n'a pas d'activité antifongique sur *P. glabrum* (Figure 39).

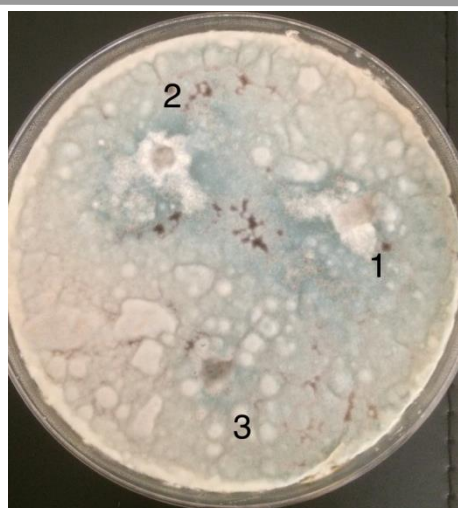


Figure 39 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *P. glabrum*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *S. sclerotiorum* :

La moisissure de *P. chrysogenum* présente une activité inhibitrice sur le pathogène qui est inhibé sur une bonne partie de la boîte. Le milieu Czapek 3 donne la plus grand activité, suivi de Czapek 1, puis de Czapek 2 (Figure 40).

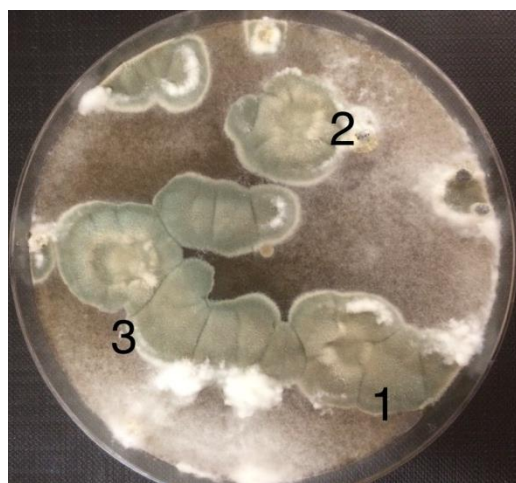


Figure 40 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *S. sclerotiorum*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3

Activité sur *Aspergillus flavus* :

Ce phyto-pathogène croit sur toute la surface de la boîte de Pétri et n'est pas inhibé par *P. chrysogenum*. Cette dernière donne une zone d'inhibition moyenne au niveau du puits contenant Czapek 2 et une faible zone sur Czapek 1. Par contre Czapek 3 n'a donné aucune activité (Figure 41).

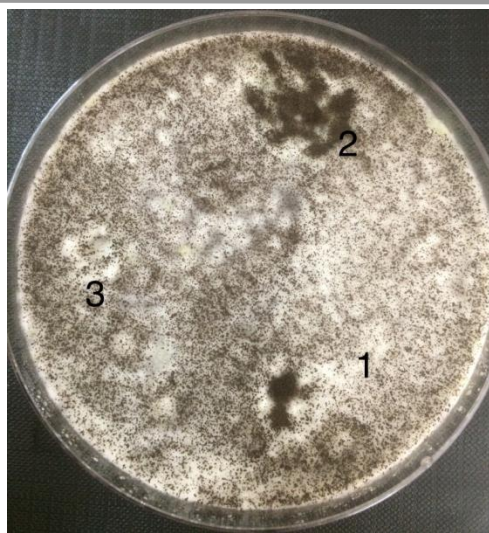


Figure 41 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *Aspergillus flavus*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *P. digitatum* :

P. digitatum recouvre la majeure partie de la surface de la boîte de Pétri. *P. chrysogenum* donne une faible croissance sur Czapeks 1 et 2, mais aucune sur Czapek 3. Ceci indique qu'elle est incapable d'inhiber le pathogène (Figure 42).

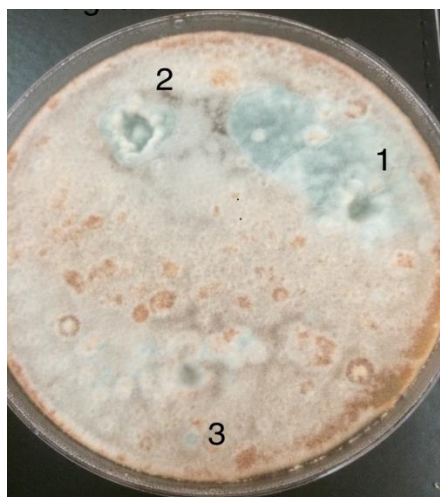


Figure 42 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *P. digitatum*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *G. candidum* :

Les résultats montrent un développement mycélien de *G. candidum* sur toute la surface de la boîte de Pétri et une inhibition totale de la croissance de *P. chrysogenum*, même dans les trois puits contenant les milieux Czapeks (Figure 43).

Ce résultat montre que *P. chrysogenum* n'a aucune activité antifongique sur *G. candidum*.



Figure 43 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *G. candidum*

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *Alternaria rosae* :

La prolifération de *P. chrysogenum* sur une grande partie de la boîte de Pétri est remarquée. Cette moisissure inhibe *Alternaria rosae* qui ne donne que faible croissance prêt du puits contenant Czapek 1. L'inhibition la plus importante est donnée par Czapek 3 qui élimine complètement le phyto-pathogène (Figure 44).

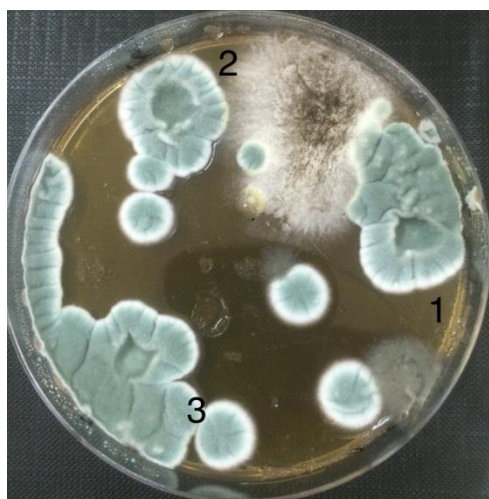


Figure 44 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *Alternaria rosae*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *Aspergillus fumigatus* :

Ce phyto-pathogène a une dissémination sur toute la surface de la gélose, ce qui stoppe la croissance de *P. chrysogenum*. Cette dernière ne forme aucune zone d'inhibition dans les trois cultures de Czapek (Figure 45).

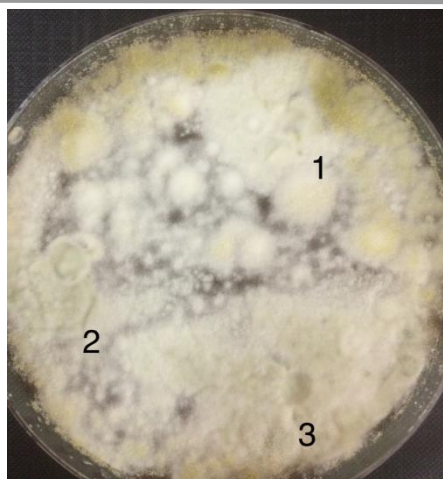


Figure 45 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *Aspergillus fumigatus*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Activité sur *Alternaria tenuissima* :

P. chrysogenum donne croissance et inhibe fortement la croissance d'*Alternaria tenuissima*. Donc, *P. chrysogenum* possède une activité antifongique importante sur le pathogène. Czapek 3 donne une plus grande dissémination de *P. chrysogenum*, suivi de Czapek 1 puis Czapek 2 (Figure 46).

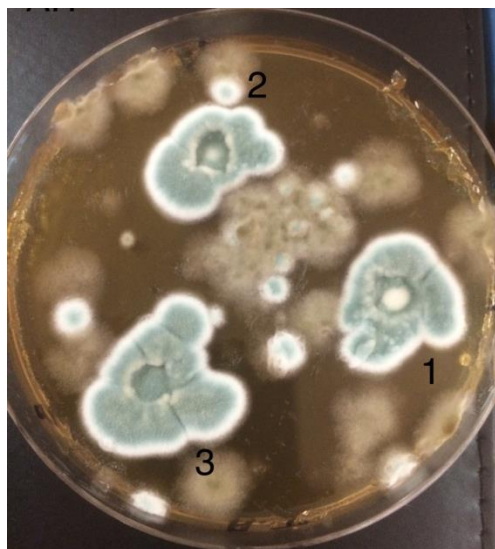


Figure 46 : Résultats de l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur *Alternaria tenuissima*.

1 : puits contenant Czapek 1 ; 2 : puits contenant Czapek 2 ; 3 : puits contenant Czapek 3.

Ces résultats montrent que l'activité antifongique est plus grande sur le Czapek 3. Ce qui indique que le lactose comme source de carbone, la farine de blé comme source d'azote, le pH=7 et la T° =28°C augmentent la production des métabolites à activité antifongique.

4. Dosage de la pénicilline dans les cultures de *P. chrysogenum*

4.1. Dosage par spectrophotométrie

La mesure de la DO des dilutions de la pénicilline G $\lambda = 235$ nm nous donne le tableau suivant :

Tableau 1 : DO obtenues pour les différentes concentrations de la pénicilline G.

Concentration (g/ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
DO	3,044	3,125	3,204	3,285	3,364

Ces valeurs nous permettent de tracer la courbe d'étalonnage et de déterminer les concentrations de l'antibiotique dans les milieux Czapeks (Figure 47).

Pour ces derniers les DO sont de :

Czapek1 : 3,036 ; Czapek2 : 2,973 ; Czapek 3 : 3,290 .

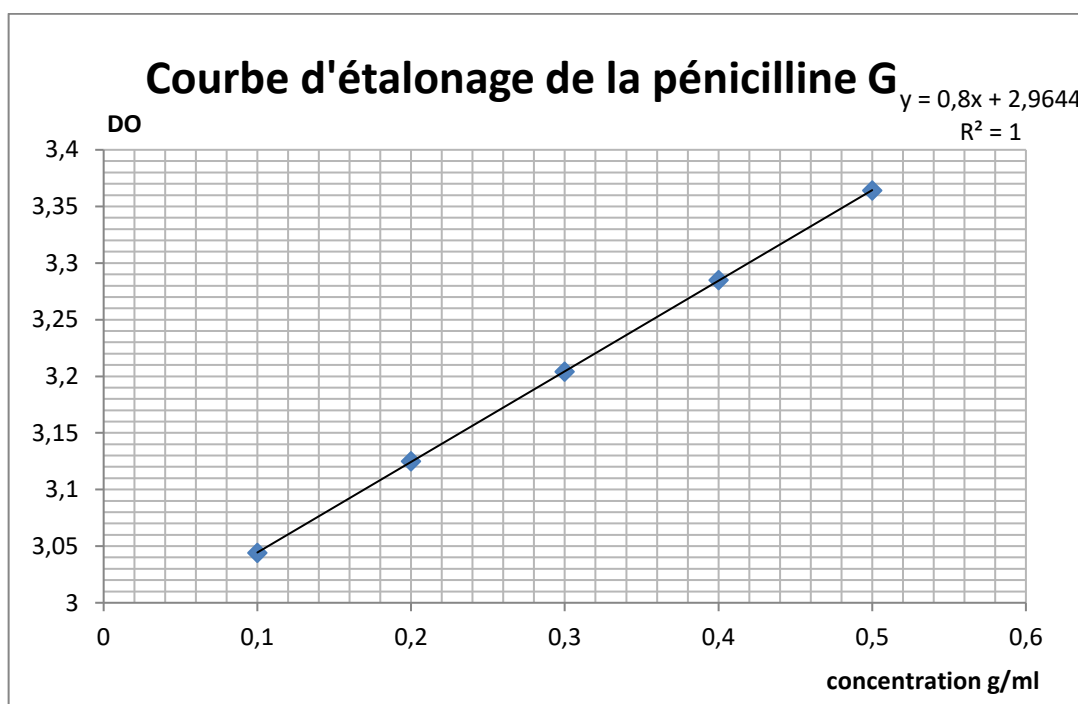


Figure 47 : Courbe d'étalonnage pour de la pénicilline G.

Calcul des concentrations en pénicilline G des milieux Czapeks :

Selon Excel 2007, l'équation de mesure de la concentration est : $y=0,8x+2,964$

Sachant que : $y = DO$

$x =$ Concentration en g/ml.

Donc, pour Czapek 1 : $x=3,046-2,964/0,8$

$$x= 0,102 \text{ g/ml}$$

- Pour Czapek 2 : $x=2,973-2,964/0.8$

$$x= 0,011 \text{ g/ml}$$

- Pour Czapek 3 : $x=3,290-2,964/0,8$

$$x= 0,407 \text{ g/ml}$$

Nous remarquons d'après ces résultats que la concentration de la pénicilline produite par *P. chrysogenum* dans le Czapek 3 est largement supérieure à celle produite dans les Czapeks 1 et 2. Ceci démontre que le milieu Czapek 3 a la meilleure constitution pour favoriser la production de la pénicilline G. Au contraire, Czapek 2 donne une très faible quantité d'antibiotique, ce qui indique que sa constitution n'est pas adéquate pour optimiser la production de l'antibiotique.

4.2. Evaluation du taux par HPLC

L'HPLC donne un chromatogramme pour l'étalon de la pénicilline G avec un pic caractéristique de l'antibiotique à 2,283 min (Figure 48).

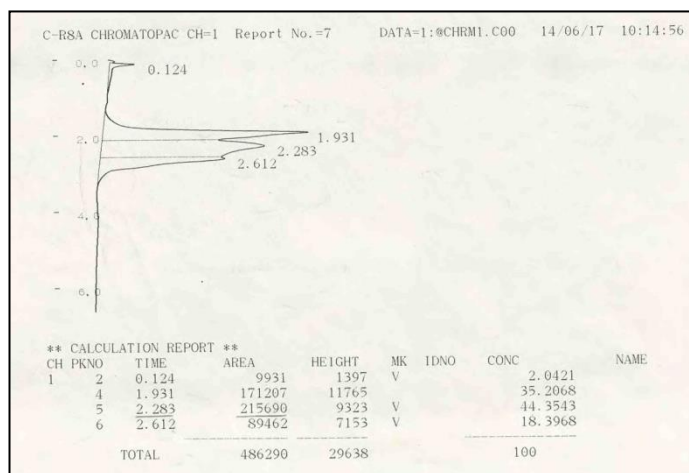


Figure 48 :
Chromatogramme de la solution étalon de la pénicilline G.

Pour le Czapek 1, nous avons obtenu un chromatogramme qui présente le pic caractéristique de la pénicilline G à 2,271 min avec une surface de 301016. Le Czapek 2 donne un pic d'une surface de 160702 à 2,301min. Et le Czapek 3 apporte un pic à 2,383 min avec une surface de 475860 (Figure 49). Ceci confirme que ce dernier a la constitution et les conditions physicochimiques les plus favorables pour la production de la pénicilline G.

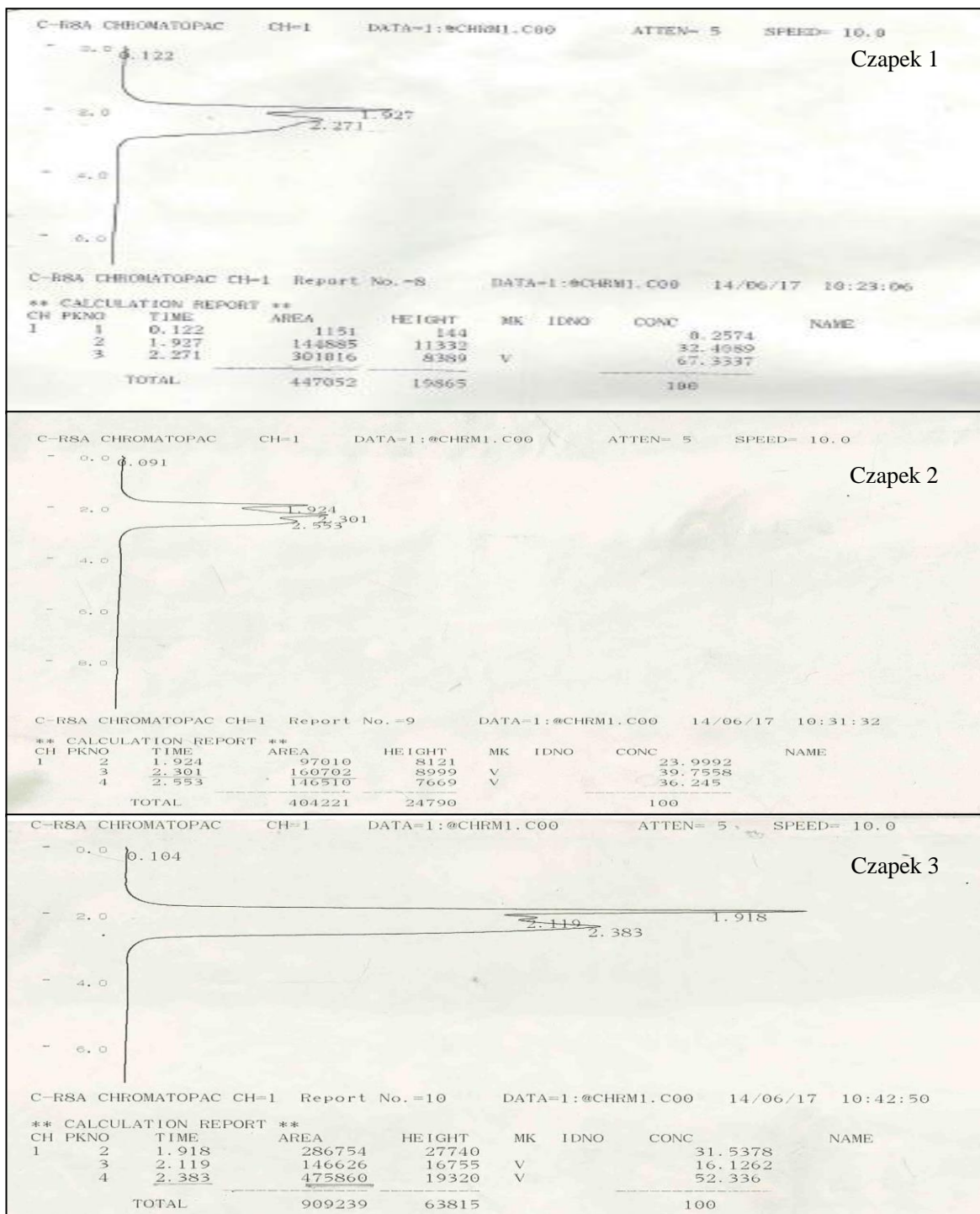


Figure 49 : Chromatogrammes obtenus pour de la pénicilline G dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3.

5. Dosage de la cystine dans les cultures de *P. chrysogenum*

5.1. Dosage par spectrophotométrie

La DO des dilutions de la cystine nous donne le tableau suivant :

Tableau 2 : DO obtenues pour les différentes concentrations de la cystine.

Concentrations en (mg/ml)	1	2	3	4	5
DO	0,051	0,126	0,215	0,299	0,402

La DO des milieux Czapeks est de :

Czapek 1 : 1,380 ; Czapek 2 : 3,160 ; Czapek 3 : 4,228.

D'après la courbe d'étalonnage de la cystine (Figure 50), les concentrations de ces milieux est mesurée par l'équation : $y = 0,087x + 0,043$, selon Excel 2007 ; avec :

$y = DO$

$x = \text{Concentration en mg/ml.}$

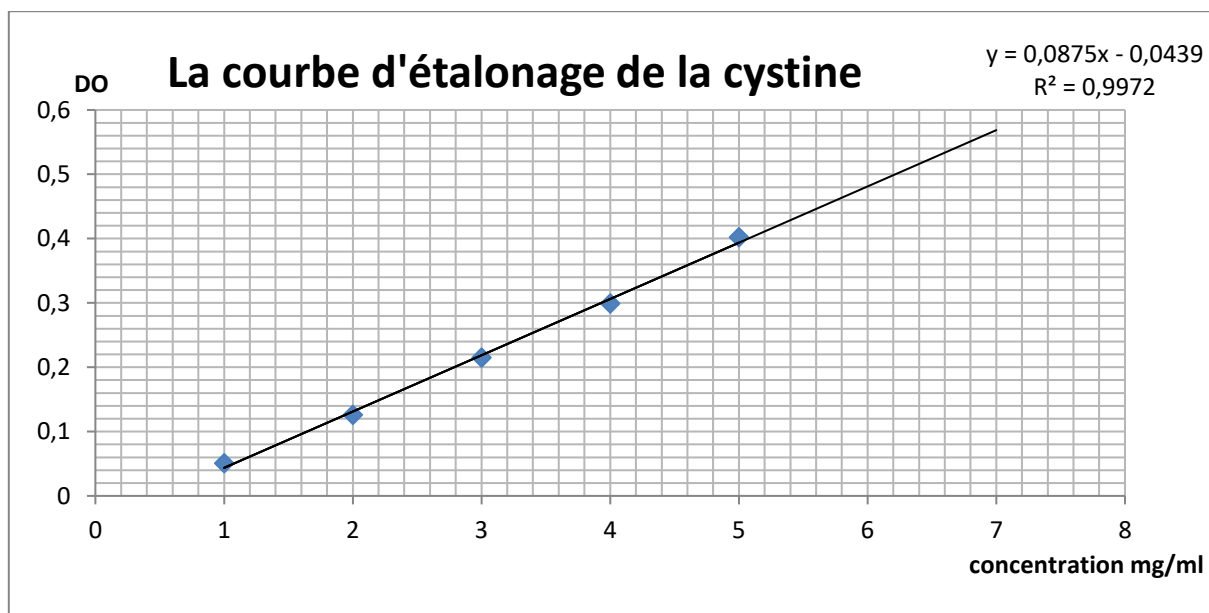


Figure 50 : Courbe d'étalonnage pour de la cystine.

Calcul des concentrations en cystine des Czapeks (mg/ml) :

Sachant que : $y = 0,087x + 0,043$, donc

- Pour Czapek 1 : $x = 1,380 - 0,043 / 0,87$

$x = 15,37 \text{ mg/ml}$

- Pour Czapek 2 : $x = 3,1608 - 0.043 / 0.087$

$$x = 35,83 \text{ mg/ml}$$

- Pour Czapek 3 : $x = 4,2288 - 0.043 / 0.087$

$$x = 48,11 \text{ mg/ml}$$

Ces résultats montrent que la concentration de la cystine produite dans le Czapek 3 par *P. chrysogenum* est supérieure à celle produite dans le Czapek 2, et la concentration de ce dernier est elle-même plus grande à celle donnée dans le Czapek 1. Donc, le Czapek 3 a la constitution et les conditions physicochimiques les plus favorables pour la production de la cystine, tout comme pour la pénicilline G.

5.2. Evaluation du taux par HPLC

Le chromatogramme suivant montre les résultats obtenus avec l'étalon de la cystine (Figure 51). Nous remarquons la présence d'un pic caractéristique de la cystine dans la minute 1,785.

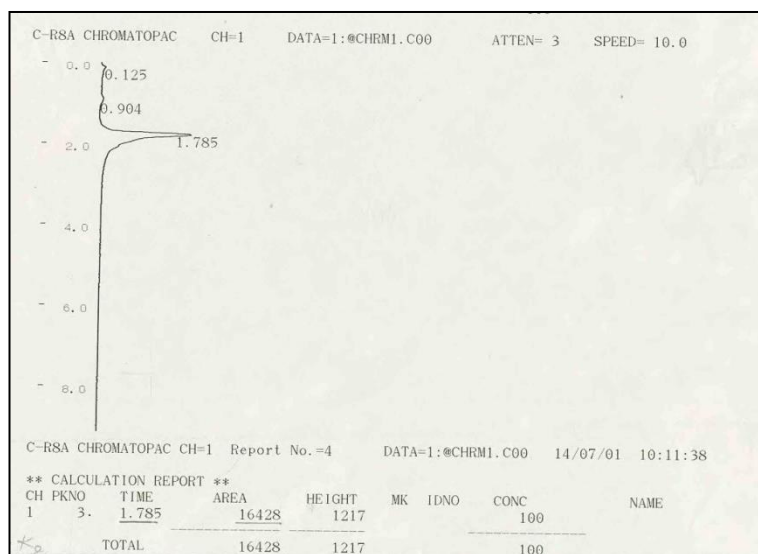


Figure 51 :

Chromatogramme de la solution étalon de la cystine.

Pour le Czapek 1, nous avons un pic avec une surface de 17432 à 1,814 min. Le Czapek 2 affiche un autre pic caractéristique à 1,837 min avec une surface de 17803. Et enfin le Czapek 3 a un pic de la cystine à 1,825 min avec une surface de 76265 (Figure 52).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec le dosage de la cystine. Ils confirment que le Czapek 3 est un excellent milieu pour optimiser la production de la cystine.

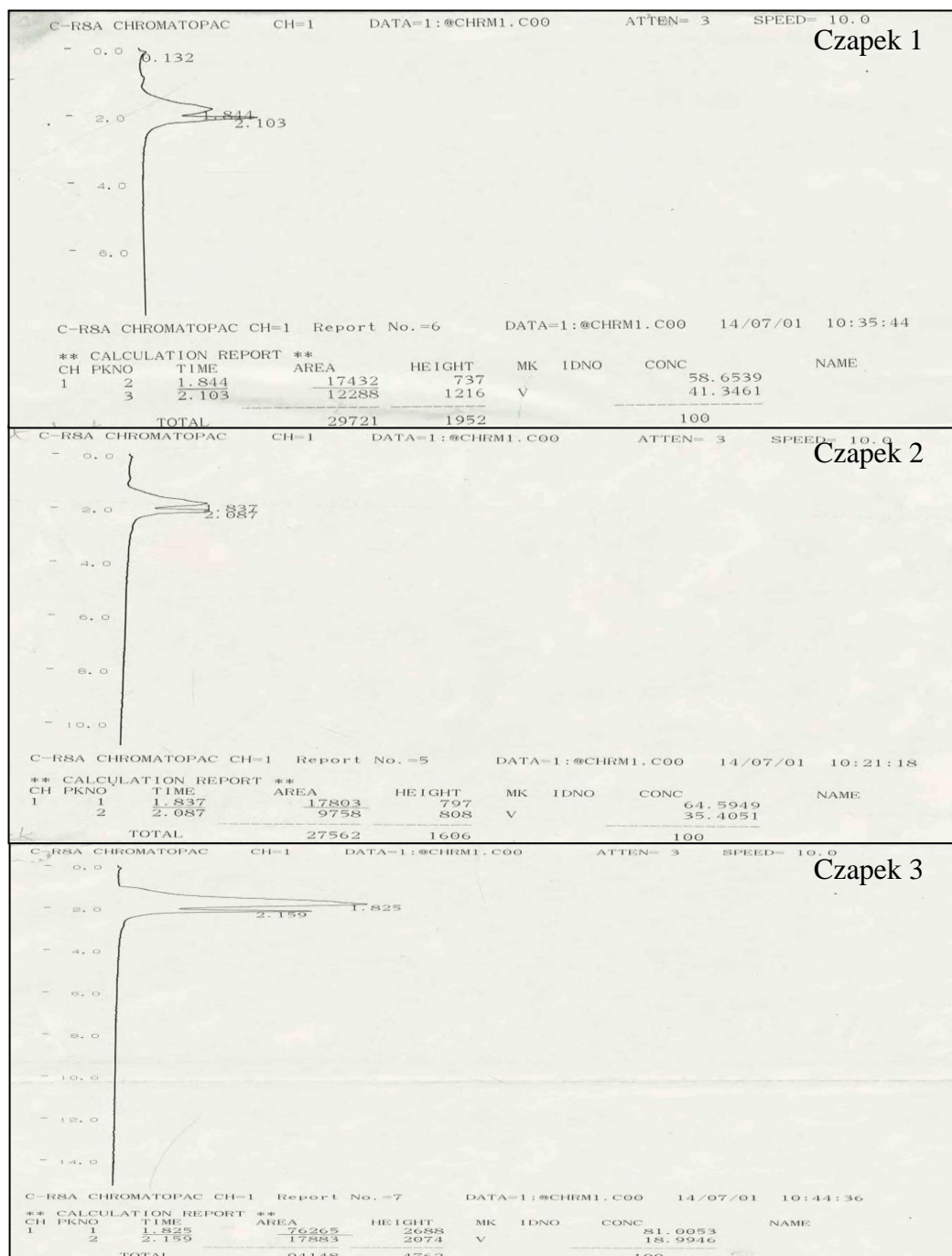


Figure 52 : Chromatogrammes obtenus pour de la cystine dans les milieux Czapek 1, Czapek 2 et Czapek 3.

Discussion

Dans cette étude, *P. chrysogenum* a été isolée à partir du sol qui est son habitat le plus courant comme le démontraient les travaux de Martin (2020). Néanmoins, l'espèce peut être isolée de différents autres environnements comme le confirment Ramos-Pereira *et al.* (2019) qui l'ont isolée à partir des fromages affinés mi-durs, Mady *et al.* (2015) qui l'ont purifiée de la feuille de l'olivier et Chen *et al.* (2013) qui l'ont détectée dans les sédiments arctiques.

L'identification spécifique de *P. chrysogenum* a été réalisée dans ce travail en utilisant les géloses MEA, CYA, Sabouraud, PDA et G25N pour l'étude des caractères macroscopiques et microscopiques. Des résultats similaires aux nôtres ont été rapportés par d'autres études, ce qui confirmait la véracité de notre protocole (Abastabar *et al.* 2016, Xia *et al.* 2018, Kolanlarli *et al.* 2019).

L'isolement à partir des différentes plantes altérées nous a permis d'obtenir plusieurs espèces fongiques qui ont été identifiées comme étant *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *P. digitatum*, *P. glabrum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria rosae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *G. candidum* et *R. pusillus*. Nos résultats ont montré que ces espèces étaient très fréquentes chez diverses plantes et fruits, qu'ils soient récoltés ou pas encore. Plusieurs travaux antérieurs concordent avec cette information. En effet, *S. sclerotiorum* a déjà été démontrée comme étant responsable de l'infection des fruits récoltés, comme les carottes et les petits pois (Qing *et al.* 2015). *Alternaria alternata* et *Alternaria tenuissima*, comme les autres espèces du genre, sont extrêmement courantes chez les fruits de différents types causant ainsi des taches foncées plus ou moins répandues, de même qu'elles infectent les d'organes aériens des mauvaises herbes et des plantes herbacées sauvages (Andersen *et al.* 2014, Berestetskiy *et al.* 2018). D'un autre côté, certaines études ont démontré que *P. digitatum* et *G. candidum* faisaient partie des moisissures responsables des plus grandes pertes économiques dans le monde. La première en causant la maladie post-récolte la plus importante des oranges (Elsherbiny *et al.* 2021) et la deuxième en engendrant la pourriture aigre qui est l'altération la plus dévastatrice des tomates (Abdulrahman *et al.* 2018).

Une large recherche sur les espèces que nous avons isolées et identifiées dans notre travail nous a confirmé qu'elles faisaient partie des pathogènes fongiques associés aux dépérissements de plusieurs plantes telles que les jojobas, les céréales à grains, les agrumes, la pastèque, les grains de blé, la pomme de terre et la grenade (Quaglia *et al.* 2016, Mamarabadi *et al.* 2018, Ramires *et al.* 2018, Ma *et al.* 2019, Moraes Bazioli *et al.* 2019, Orsoni *et al.* 2020, El-Baky *et al.* 2021).

L'activité antifongique testée par affrontement de *P. chrysogenum* contre les champignons phyto-pathogènes nous a démontré que cette moisissure pouvaient inhiber certaines espèces telles que *Alternaria alternata*, *Alternaria rosae*, *S. sclerotiorum*, *Alternaria tenuissima*, *G. candidum* et *Aspergillus fumigatus*. Par contre, elle n'avait aucune activité sur les autres : *R. pusillus*, *P. glabrum*, *Aspergillus flavus* et *P. digitatum*. Kozlovsky et ses collaborateurs (2020) expliquaient l'activité antifongique de *P. chrysogenum* par sa capacité à produire de grandes quantités de métabolites secondaires à propriété antimicrobienne. Aussi, Xu et ses co-auteurs (2020) précisaient dans leur étude que la souche endophyte *P. chrysogenum* XNM-12 isolée des algues marines produisait, en plus des autres substances antimicrobiennes, de nouveaux alcaloïdes « l'oxalicine C, les penicieriythritols A et B » qui présentaient également une propriété antifongique. Ces métabolites étaient produits dans toutes les phases de croissance de l'espèce avec différentes concentrations.

L'activité de *P. chrysogenum* sur le pathogène humain *Aspergillus fumigatus* prouvait son éventuelle importance dans les domaines médicaux et pharmaceutiques. Selon les travaux de Palicz et ses collaborateurs (2016), *P. chrysogenum* produisait une molécule dite PAF pour inhiber les *Aspergillus* et il n'existe à ce jour aucune souche d'*Aspergillus fumigatus* présentant une résistance inhérente ou acquise à cette molécule, ce qui pourrait mener à utiliser le PAF comme médicament antifongique (Palicz *et al.* 2016).

Certaines autres études ont obtenu des résultats contradictoires aux nôtres en précisant que la souche *P. chrysogenum* PgAFP avait une forte activité inhibitrice sur les divers *Penicillium* qui causaient des maladies post-récolte chez les agrumes et que *P. digitatum* était l'espèce la plus sensible. Selon cette étude, l'activité antifongique était due à la capacité de la souche à produire des PgAFP connus pour leur effet inhibiteur, notamment sur les *Penicillium*, *Aspergillus flavus* et *Alternaria tenuissima* (Delgado *et al.* 2015, da Cruz Cabral *et al.* 2019, Delgado *et al.* 2019).

En prenant en considération les conclusions de Delgado *et al.* (2015), da Cruz Cabral *et al.* (2019), Delgado *et al.* (2019), Xu *et al.* (2020), ainsi que nos résultats, nous pouvions conclure que l'activité antifongique de *P. chrysogenum* variait d'une souche à une autre, selon les substances qu'elle était capable de produire.

Pour l'activité antifongique de *P. chrysogenum* sur les moisissures phyto-pathogènes suivantes : *P. glabrum*, *Alternaria rosae*, *R. pusillus* et *G. candidum*, aucun travail n'a été trouvé. Notre étude représente donc un premier pas sur la possibilité de limiter les dégâts causés par ces espèces en utilisant une moisissure.

La culture de *P. chrysogenum* sur les milieux Czapek 1 et Czapek 2 avait comme principe le déclenchement de l'idiophase afin d'activer les voies de la biosynthèse des métabolites secondaire. Nos résultats ont montré que l'activité antifongique était plus grande pour le Czapek 3, ce qui indiquait que le lactose comme source de carbone, la farine de blé comme source d'azote, le pH=7 et la T° =28°C donnaient la meilleure activité. Ceci était en accord avec les travaux de Sari *et al.* (2020) qui ont prouvé que la source de carbone et les conditions de culture influençaient fortement les caractéristiques métaboliques de *P. chrysogenum*.

Dans ce travail, nous avons cultivé *P. chrysogenum* sur Czapek 1 qui donnait des conditions optimales de croissance (trophophase) et sur les Czapek 2 et 3 qui donnaient des conditions défavorables qui stoppaient la croissance et provoquaient la production des métabolites secondaires (Botton *et al.* 1990). Afin de confirmer que la moisissure était bien en idiophase sur les Czapek 2 et 3, nous avons mesuré la production de la pénicilline G. Et une fois cette information confirmée, nous avons effectué le dosage de la cystine qui est connue pour sa forte activité antifongique (Martín *et al.* 2010, Asnaashari *et al.* 2012, Kosalková *et al.* 2021). Nous avons testé deux sources de carbone : le lactose pour le Czapek 3 et l'amidon pour le Czapek 2. Les résultats de l'HPLC et du dosage par spectrophotométrie étaient cohérents ; ils démontraient que le lactose donnait une meilleure production de la pénicilline G et de la cystine par rapport à l'amidon. Les études de Parameswari et Sivasankari (2018) étaient accord avec nos résultats et montraient que le lactose comme source de carbone donnait le plus grand rendement en production des métabolites secondaires comparé au glucose, glycérol et amidon. Toutefois, selon Hassani et ses collaborateurs (2011), l'utilisation de la mélasse et du lactose pouvait incroyablement réduire le temps de fermentation, augmenter la croissance cellulaire et optimiser la production de la pénicilline. De même, selon certains chercheurs, la source de carbone qui accentuait le plus la production de la pénicilline et donc de ses précurseurs, comme la cystine, variait suivant les souches de *P. chrysogenum*. Elle pouvait être le maltose, le lactose, les mélasses ou autres (Dayalan *et al.* 2011, Sari *et al.* 2020).

Les études de Parameswari et Sivasankari (2018) et celle de Zhang *et al.* (2020) et ont montré que le glucose ainsi que la source simple utilisée pour la synthèse du Czapek 1 réprimaient la formation de premier facteur principal de la voie de biosynthèse de la pénicilline chez *P. chrysogenum* qui était l' α -aminoadipylcysteinyl- valine. Ce qui laissait supposer que le glucose favorisait la synthèse de la lysine et diminuait la quantité de l' α -aminoadipate disponible pour la production de l'antibiotique.

Selon nos résultats, les conditions qui avaient donné la plus grande quantité de cystine étaient-elles mêmes les conditions qui avaient donné la plus haute concentration de pénicilline (les conditions du Czapek 3). Selon Asnaashari *et al.* (2012) et Ding *et al.* (2012), l'augmentation de concentration de la pénicilline G indiquait une augmentation de concentration de la cystine chez *P. chrysogenum*. Aussi la moisissure sécrétait dans les mêmes conditions de petites protéines antimicrobiennes dites AMPs, PAF, PAFB qui avait une activité inhibitrice contre la croissance de nombreux champignons phyto-pathogènes, mais qui étaient inefficaces contre les bactéries (Rodríguez-Martín *et al.* 2010, Varadi *et al.* 2012, Huber *et al.* 2020).

Conclusion

Dans cette étude, nous pouvions affirmer que *P. chrysogenum* avait une activité antifongique sur quelques moisissures phyto-pathogènes redoutables, à savoir *Alternaria alternata*, *Alternaria rosae*, *S. sclerotiorum*, *Alternaria tenuissima*, *G. candidum* et *Aspergillus fumigatus*. La meilleure activité antifongique a été obtenue quand la moisissure était cultivée sur le Czapek 3, ce qui indiquait que ce milieu pouvait être éventuellement utilisé pour la biosynthèse des métabolites à activité antimicrobienne par l'espèce. Le dosage de la cystine et de la pénicilline G confirmaient ces déductions ; car en effet, leur concentration était nettement supérieure sur le Czapek 3.

D'un autre côté, nous pouvions conclure que *P. chrysogenum* était inefficace contre certains autres phyto-pathogènes comme *R. pusillus*, *P. glabrum*, *Aspergillus flavus* et *P. digitatum*. Donc, l'utilisation de *P. chrysogenum* pour lutter contre les altérations des plantes devrait être précédée par une étude confirmative de l'activité antifongique de cette dernière sur le pathogène ciblé.

*Références
bibliographiques*

- A -

- Ababutain IM, Aldosary SK, Aljuraifani AA, Alghamdi AI, Alabdall AH, Al-Khaldi EM, Aldakeel SA, Almandil NB, AbdulAzeez S, Borgio JF. Identification and antibacterial characterization of endophytic fungi from *Artemisia sieberi*. Int J microbiol. 2021; 2021: 1-11.
- Abastabar M, Mirhendi H, Hedayati MT, Shokohi T, Rezaei-Matehkolaei A, Mohammadi R, Badali H, Moazeni M, Haghani I, Ghoghghi A, Akhtari J. Genetic and morphological diversity of the genus *Penicillium* from mazandaran and tehran provinces. Jundishapur J Microbiol. 2016; 9(1): e28280.
- Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. J Mycol Med. 2014; 24(2): 51-6.
- Abdulrahman AM, Murmu R, Simon S, Lal A. Effect of selected plant extracts and chemicals against sour rot *Geotrichum candidum* of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Int J Life Sci Res. 2018; 13(3): 811-13.
- Agrios GN. Plant pathology .5^e edition Academic Press. 2005. United States of America.
- Aldeek F, Canzani D, Standland M, Crosswhite MR, Hammack W, Gerard G, Cook JM. Identification of penicillin G metabolites under various environmental conditions using UHPLC-MS/MS. J Agric Food Chem. 2016; 64(31): 6100-07.
- Andersen B, Nielsen KF, Fernández Pinto V, Patriarca A. Characterization of *Alternaria* strains from Argentinean blueberry, tomato, walnut and wheat. Int J Food Microbiol. 2015; 196: 1-10.
- Anwar S, Ali Khan APM. Stability indicating rp-hplc method for estimation of two synthetic antibiotics, amoxicillin and enrofloxacin, simultaneously. Int Jo Pharm Sci Res. 2020; 11(1): 204-11.
- Asnaashari M, Ghanbary MAT, Tazick Z. Optimization of penicillin G production by *Penicillium chrysogenum*. Ann Biol Res. 2012; 3(12): 5434-40.

-B-

- Barratt BIP, Moran VC, Bigler F, Van Lenteren JC. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future. Bio Control. 2018; 63(1): 155-67.
- Berestetskiy AO, Gannibal FB, Minkovich EV, Osterman IA, Salimova DR, Sergiev PV, Sokornova SV. Spectrum of biological activity of the *Alternaria* fungi isolated from the phyllosphere of herbaceous plants. Microbiol. 2018; 87(6): 806-16.

- Berger S, El Chazli Y, Babu AF, Coste AT. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture. *Front Microbiol.* 2017 ; 8: 10-24.
- Blombach B, Takors R. CO₂ - Intrinsic Product, Essential substrate, and regulatory trigger of microbial and mammalian production processes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015; 3: 108.
- Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy Ph, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y, Veau P. Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2^e Edition Masson. 1990. France.

-C-

- Carip C, Salavert MH, Tandeau A. Microbiologie, hygiène et droit alimentaire. 2^e Edition Lavoisier. 2015. Italie.
- Chen Z, Ao J, Yang W, Jiao L, Zheng T, Chen X. Purification and characterization of a novel antifungal protein secreted by *Penicillium chrysogenum* from an Arctic sediment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97(24): 10381-90.
- Cheruiyot SE, Muturi M, Bii C. Antifungal activities of *Camellia sinensis* crude extract on selected pathogenic and mycotoxic Fungi. *J Bacteriol Mycol.* 2015; 9(42): 1070-80.
- Costa JH, Bazioli JM, Barbosa LD, Dos Santos Júnior PLT, Reis FCG, Klimeck T, Crnkovic CM, Berlinck RGS, Sussulini A, Rodrigues ML, Fill TP. Phytotoxic tryptochalpanes produced in vivo by *Penicillium digitatum* are exported in extracellular vesicles. *M Bio.* 2021; 12(1): e03393-20.
- Costa JH, Bazioli JM, de Moraes Pontes JG, Fill TP. *Penicillium digitatum* infection mechanisms in citrus: what do we know so far? *Fungal Biol.* 2019; 123(8): 584-93.

-D-

- Da Cruz Cabral L, Delgado J, Patriarca A, Rodríguez A. Differential response to synthetic and natural antifungals by *Alternaria tenuissima* in wheat simulating media: Growth, mycotoxin production and expression of a gene related to cell wall integrity. *Int J Food Microbiol.* 2019; 292: 48-55.
- Dayalan SA, Darwin P, Prakash S. Comparative study on production, purification of penicillin by *Penicillium chrysogenum* isolated from soil and citrus samples. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2011; 1(1): 15-9.
- De Almeida Antunes Ferraz J L, Oliveira Souza L, Gustavo de Araújo Fernandes A, Luiz Ferreira Oliveira M, de Oliveira JR, Franco, M. Optimization of the solid-state fermentation conditions and characterization of xylanase produced by *Penicillium roqueforti* ATCC 10110 using yellow mombin residue (*Spondias mombin* L.). *Chem Eng Commun.* 2020; 207(1): 31-42.

- De Clercq P, Mason PG, Babendreier D. Benefits and risks of exotic biological control agents. *Bio Control*. 2011; 56(4): 681-98.
- De Lucca AJ. Harmful Fungi in both agriculture and medicine. *Rev Iberoam Micol*. 2007; 24(1): 3-13.
- Delgado J, Ballester AR, Núñez F, González-Candelas L. Evaluation of the activity of the antifungal PgAFP protein and its producer mould against *Penicillium spp* postharvest pathogens of citrus and pome fruits. *Food Microbiol*. 2019; 84: 103266.
- Delgado J, Owens RA, Doyle S, Asensio MA, Núñez F. Impact of the antifungal protein PgAFP from *Penicillium chrysogenum* on the protein profile in *Aspergillus flavus*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015; 99: 8701–15.
- Diáñez Martínez F, Santos M, Carretero F, Marín F. *Trichoderma saturnisporum*, a new biological control agent. *J Sci Food Agric*. 2016; 96(6): 1934-44.
- Ding M Z, Lu H, Cheng J S, Chen Y, Jiang J, Qiao B, Yuan Y J. Comparative metabolomic study of *Penicillium chrysogenum* during pilot and industrial penicillin fermentations. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012; 168(5): 1223-38.
- Diwan B, Gupta P. A deuteromycete isolate *Geotrichum candidum* as oleaginous cell factory for medium-chain fatty acid-rich oils. *Curr Microbiol*. 2020; 77(11): 3738-49.

-E-

- El Gobashy SF, Mikhail WZA, Ismail AM, Zekry A, Moretti A, Susca A, Soliman AS. Phylogenetic, toxigenic and virulence profiles of *Alternaria* species causing leaf blight of tomato in Egypt. *Mycol Progr*. 2018; 17: 1269-82.
- El-Baky NA, Abdel Rahman RA, Sharaf MM, Amara AAAF. The development of a phytopathogenic Fungi control trial: *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger* Infection in jojoba tissue culture as a model. *Sci World J*. 2021; 2021: 6639850.
- Eljounaidi K, Lee SK, Bae H. Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*. 2016; 103: 62-8.
- Elsherbiny EA, Dawood DH, Safwat NA. Antifungal action and induction of resistance by β -aminobutyric acid against *Penicillium digitatum* to control green mold in orange fruit. *Pestic Biochem Physiol*. 2021; 171: 104721.

-F-

- Fernández RL, Rivera MC, Varsallona B, Wright ER. Disease prevalence and symptoms caused by *Alternaria tenuissima* and *Pestalotiopsis guepinii* on blueberry in entre Ríos and Buenos Aires. Argentina. 2015; 6: 3082-90.
- Fira D, Dimkić I, Berić T, Lozo J, Stanković S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *J Biotechnol*. 2018; 285: 44-55.

Fontaine K, Mounier J, Coton E, Hymery N. Individual and combined effects of roquefortine C and mycophenolic acid on human monocytic and intestinal cells. *World Mycotoxin J.* 2016; 9(1): 51-62.

-G-

Gabriel MF, Postigo I, Tomaz CT, Martínez J. *Alternaria alternata* allergens: markers of exposure, phylogeny and risk of fungi-induced respiratory allergy. *Environ int.* 2016; 89: 71-80.

Gober CM, Madeleine MJ. From roquefortine C to roquefortine L: formation of a complex nitron with simple oxidizing agents. *Is J Chem.* 2017; 75(3): 303-8.

-H-

Hajek AE, Eilenberg J. *Natural enemies: an introduction to biological control.* 2^e Edition Cambridge University Press. 2018. England.

Hassani A, Yegani R, Hassani A. Improvement of biological penicillin production from *Penicillium chrysogenum* using molasses as carbone source. *Chem Eng Trans.* 2011; 24: 853-68.

Horii S, Ando M, Samuel AZ, Take A, Nakashima T, Matsumoto A, Takahashi YK, Takeyama H. Detection of penicillin G produced by *Penicillium chrysogenum* KF 425 *in vivo* with raman microspectroscopy and multivariate curve resolution-alternating least squares methods. *Bio Rxiv.* 2020; 23: 3223-9.

Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kubicek CP. *Genomics of soil-and plant-associated fungi.* 1^e Edition Springer Science & Business Media.2013 . L'état unis d'Amérique.

Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang XC, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol.* 2020; 95: 51-9.

Huber A, Galgóczy L, Váradi G, Holzknicht J, Kakar A, Malanovic N, Leber R, Koch J, Keller MA, Batta G, Tóth GK, Marx F. Two small, cysteine-rich and cationic antifungal proteins from *Penicillium chrysogenum*: A comparative study of PAF and PAFB. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* 2020; 1862(8): 183246.

Hübner I, Shapiro JA, Hoßmann J, Drechsel J, Hacker SM, Rather PN, Pieper DH, Wuest WM, Sieber SA. Broad-spectrum antibiotic xanthocillin x effectively kills *Acinetobacter baumannii* via dysregulation of heme biosynthesis. *ACS.* 2021; 7(3): 488-98.

Hurst SF, Berkow EL, Stevenson KL, Litvintseva AP, Lockhart SR. Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from the environment in the south-eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(9): 2443-6.

-J-

Jacques N, Mallet S, Laaghouti F, Tinsley CR, Casaregola S. Specific populations of the yeast *Geotrichum candidum* revealed by molecular typing. *Yeast.* 2017; 34(4): 165-78.

Jadhav RK. Substrate serving for culture optimization and protease productivity by *Penicillium notatum* strain on deproteinised foliage extract from lucerne and beet. *Asian J Appl Sci.* 2019; 6(1): 10-7.

-K-

Kalai S, Bensoussan M, Dantigny P. Lag time for germination of *Penicillium chrysogenum* conidia is induced by temperature shifts. *Food Microbiol.* 2014; 42: 149-53.

Kolanlarli TK, Ahmet ASN, Burhan ŞEN, Ökten S. Biodiversity of *Penicillium* species isolated from Edirne Söğütlük Forest soil (Turkey). *Mantar Dergisi.* 2019; 10(1): 26-39.

Koňuchová M, Valík L. Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: Effects of temperature and water activity. *Microorganisms.* 2021; 9(3): 532.

Kosalková K, Domínguez-Santos R, Coton M, Coton E, García-Estrada C, Liras P, Martín JF. A natural short pathway synthesizes roquefortine C but not meleagrín in three different *Penicillium roqueforti* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015; 99(18): 7601-12.

Kosalková K, Sánchez-Orejas IC, Cueto L, García-Estrada C. *Penicillium chrysogenum* fermentation and analysis of benzylpenicillin by bioassay and HPLC. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ).* 2021; 2296: 195-07.

Kozlovsky AG, Kochkina GA, Zhelifonova VP, Antipova TV, Ivanushkina NE, Ozerskaya SM. Secondary metabolites of the genus *Penicillium* from undisturbed and anthropogenically altered Antarctic habitats. *Folia Microbiologica (Praha).* 2020; 65(1): 95-02.

Kustrzeba-Wójcicka I, Siwak E, Terlecki G, Wolańczyk-Mędrała A, Mędrała W. *Alternaria alternata* and its allergens: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2014; 47(3): 354-65.

-L-

Lagashetti AC, Dufossé L, Singh SK, Singh PN. Fungal pigments and their prospects in different industries. *Microorganisms.* 2019; 7(12): 604.

- Landschoot S, Carrette j, Vandecasteele M, De Baets B, Hofte M, Audenaert K, Haesaert G. Boscalid-resistance in *Alternaria alternata* and *Alternaria solani* populations: An emerging problem in Europe. *Crop Protection*. 2017; 92: 49-59.
- Latgé JP, Chamilos G. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 33(1): e00140-18.
- Lim FY, Won TH, Raffa N, Baccile JA, Wisecaver J, Rokas A, Schroeder FC, Keller NP. Fungal isocyanide synthases and xanthocillin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *mBio*. 2018; 9(3):e00785-18.
- Liu J, Zhang X, Kennedy JF, Jiang M, Cai Q, Wu X. Chitosan induces resistance to tuber rot in stored potato caused by *Alternaria tenuissima*. *Int J Biological Macromol*. 2019; 140: 851-7.

-M-

- Ma G, Liang Z, Hua H, Zhou T, Wu X. Complete genome sequence of a new botybirna virus isolated from a phytopathogenic *Alternaria alternata* in China. *Arch Virol*. 2019; 164(4): 1225-8.
- Ma W, Zhang Y, Wang Ch, Liu S, Liao XI. A new disease of strawberry, fruit rot, caused by *Geotrichum candidum* in China. *Plant Protect Sci*. 2018; 54(2): 92-100.
- Mady MS, Mohyeldin MM, Ebrahim HY, Elsayed HE, Houssen WE, Haggag EG, Soliman RF, El Sayed KA. The indole alkaloid meleagrins, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion. *Bioorg Med Chem*. 2015; 24(2): 113-22.
- Mamarabadi M, Tanhaeian A, Ramezany Y. Antifungal activity of recombinant thanatin in comparison with two plant extracts and a chemical mixture to control fungal plant pathogens. *AMB Express*. 2018; 8(1): 180.
- Maragos CM. Development and characterization of a monoclonal antibody to detect the mycotoxin roquefortine C. *Food Addit Contam*. 2020; 37(10): 1777-90.
- Marra R, Nicoletti R, Pagano E, DellaGreca M, Salvatore MM, Borrelli F, Lombardi N, Vinale F, Woo SL, Andolfi A. Inhibitory effect of trichodermanone C, a sorbicillinoid produced by *Trichoderma citrinoviride* associated to the green alga *Cladophora sp*, on nitrite production in LPS-stimulated macrophages. *Nat Prod Res*. 2019; 33(23): 3389-97.
- Martín J F, Paloma L. Evolutionary formation of gene clusters by reorganization: the meleagrins/roquefortine paradigm in different fungi. *Appl microbiol biotechnol*. 2016; 100(4): 1579-87.

- Martin JF, Ullán RV, García-Estrada C. Regulation and compartmentalization of β -lactam biosynthesis. *Microbial Biotechnol.* 2010; 3(3): 285-99.
- Martín JF. Insight into the genome of diverse *Penicillium chrysogenum* strains: specific genes, cluster duplications and DNA fragment translocations. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(11): 3936.
- Masanga JO, Matheka JM, Omer RA, Ommeh SC, Monda EO, Alakonya AE. Downregulation of transcription factor aflR in *Aspergillus flavus* confers reduction to aflatoxin accumulation in transgenic maize with alteration of host plant architecture. *Plant Cell Rep.* 2015; 34(8): 1379-87.
- Meng J, Wang X, Xu D, Fu X, Zhang X, Lai D, Zhou L, Zhang G. Sorbicillinoids from fungi and their bioactivities. *Molecules.* 2016; 21(6): 715.
- Moraes Bazioli J, Belinato JR, Costa JH, Akiyama DY, Pontes JGM, Kupper KC, Augusto F, de Carvalho JE, Fill TP. Biological control of citrus postharvest phytopathogens. *Toxins (Basel).* 2019; 11(8): 460.

-N-

- Nguyen PA, Strub C, Fontana A, Schorr-Galindo S. Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biol Control.* 2017; 104: 10-27.

-O-

- Okoth S, De Boevre M, Vidal A, Diana Di Mavungu J, Landschoot S, Kyallo M, Njuguna J, Harvey J, De Saeger S. Genetic and toxigenic variability within *Aspergillus flavus* population isolated from maize in two diverse environments in Kenya. *Front Microbiol.* 2018; 9: 57.
- Orsoni N, Degola F, Nerva L, Bisceglie F, Spadola G, Chitarra W, Terzi V, Delbono S, Ghizzoni R, Morcia C, Jamiołkowska A, Mielniczuk E, Restivo FM, Pelosi G. Double Gamers-can modified natural regulators of higher plants act as antagonists against phytopathogens? The case of jasmonic acid derivatives. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(22): 8681.
- Ouchaou K, Maire F, Salo O, Ali H, Hankemeier T, van der Marel GA, Filippov DV, Bovenberg RA, Vreeken RJ, Driessen AJ, Overkleeft HS. A mutasynthesis approach with a *Penicillium chrysogenum* δ roqA strain yields new roquefortine d analogues. *ChemBioChem.* 2015; 16(6): 915-923.

-P-

- Palicz Z, Gáll T, Leiter E, Kollár S, Kovács I, Miszti-Blasius K, Pócsi I, Csernoch L, Szentesi P. Application of a low molecular weight antifungal protein from *Penicillium*

chrysogenum (PAF) to treat pulmonary aspergillosis in mice. *Emerg Microbes Infect.* 2016; 5(1): 1-9.

Palnam WD, Laykay ASE, Hanat M. Effect of plant extracts on sporulation of *Aspergillus Niger* and *Penicillium chrysogenum*, from sunflower (*Helianthus annuus L.*) seeds. *J Food Stab.* 2019; 2(1): 43-8.

Palou L. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (green mold, blue mold). Edition Postharvest Decay : Control Strategies. 2014. United States.

Papoutsis K, Mathioudakis MM, Hasperué JH, Ziogas V. Non-chemical treatments for preventing the postharvest fungal rotting of citrus caused by *Penicillium digitatum* (green mold) and *Penicillium italicum* (blue mold). *Trends Food Sci Technol.* 2019; 86: 479-91.

Parameswari S, Sivasankari S. Execution of enriched rice bran medium in hyper production of penicillin V by *Penicillium chrysogenum*. *Waste Biomass Valori.* 2018; 9(9): 1559-65.

Piecuch A, Ogórek R. Quantitative and qualitative assessment of mycological air pollution in a dormitory bathroom with high humidity and fungal stains on the ceiling a case study. *Pol J Enviro Stud.* 2021; 30(2): 1955-60.

Polli F. Synthetic biology tools for metabolic engineering of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. 1^e Edition University of Groningen. 2017. Italy.

Ponizovskaya VB, Antropova AB, Mokeeva VL, Bilanenko EN, Chekunova LN. Effect of water activity and relative air humidity on the growth of *Penicillium chrysogenum* Thom, *Aspergillus repens* (Corda) Sacc, and *Trichoderma viride* Pers, isolated from living spaces. *Microbiol.* 2011; 80(3): 378-85.

-Q-

Qing W, Zuo JH, Qian W, Yang NA, Gao LP. Inhibitory effect of chitosan on growth of the fungal phytopathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*, and *sclerotinia rot* of carrot. *J Int Agric.* 2015; 14(4): 691-7.

Quaglia M, Moretti C, Cerri M, Linoci G, Cappelletti G, Urbani S, Taticchi A. Effect of extracts of wastewater from olive milling in postharvest treatments of pomegranate fruit decay caused by *Penicillium adametzioides*. *Postharvest Biol Tec.* 2016; 118: 26-34.

-R-

Ramesh C, Vinithkumar NV, Kirubagaran R, Venil CK, Dufossé L. Multifaceted applications of microbial pigments: current knowledge, challenges and future directions for public health implications. *Microorganisms.* 2019; 7(7): 186.

- Ramires FA, Masiello M, Somma S, Villani A, Susca A, Logrieco AF, Luz C, Meca G, Moretti A. Phylogeny and mycotoxin characterization of *Alternaria Species* isolated from wheat grown in tuscany, italy. *Toxins (Basel)*. 2018; 10(11): 472.
- Ramos-Pereira J, Mareze J, Patrino E, Santos JA, López-Díaz TM. Polyphasic identification of *Penicillium spp* isolated from Spanish semi-hard ripened cheeses. *Food Microbiol*. 2019; 84: 103253.
- Rizwana H, Bokahri NA, Alsahli SA, Al Showiman AS, Alzahrani RM, Aldehaish HA. Postharvest disease management of *Alternaria* spots on tomato fruit by *Annona muricata* fruit extracts. *Saudi J Biol Sci*. 2021; 28(4): 2236-44.
- Roblin G, Octave S, Faucher M, Fleurat-Lessard P, Berjeaud JM. Cysteine: a multifaceted amino acid involved in signaling plant resistance and antifungal development. *Plant Physiol Biochem*, 2018; 129: 77-89.
- Rodríguez-Martín A, Acosta R, Liddell S, Núñez F, Benito M J, Asensio MA. Characterization of the novel antifungal protein PgAFP and the encoding gene of *Penicillium chrysogenum*. *Peptides*. 2010; 31(4): 541-7.
- Rudramurthy SM, Paul RA, Chakrabarti A, Mouton JW, Meis JF. Invasive aspergillosis by *Aspergillus flavus*: Epidemiology, diagnosis, antifungal resistance, and management. *J Fungi (Basel)*. 2019; 5(3): 55.

-S-

- Salo O, Guzmán-Chávez F, Ries MI, Lankhorst PP, Bovenberg RAL, Vreeken RJ, Driessen AJM. Identification of a polyketide synthase involved in sorbicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*. 2016; 82(13): 3971-8.
- Sangeetha J, Thangadurai D, Islam S. Beneficial microbes for sustainable agriculture and environmental management. 1^o Edition CRC Press. 2020. Boca Raton, Florida.
- Saravanakumar K, Yu C, Dou K, Wang M, Li Y, Chen J. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum f. sp. Cucumerinum* . *Biol Control*. 2016; 94: 37-46.
- Sari M, Dirayanti D, Septiana E, Bustanussalam B, Mustopa AZ . The combination of carbon source and the addition of phenylacetic acid (paa) to growth medium *Penicillium chrysogenum* to enhance of penicillin (Pen G) production. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 2020; 23(9): 312-8.
- Sempere F, Santamarina MP. Study of the interactions between *Penicillium oxalicum* currie & thom and *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Braz J Microbiol*. 2010; 41(3): 700- 6.

- Shamsi W, Sato Y, Jamal A, Shahi S, Kondo H, Suzuki N, Faraz Bhatti M. Molecular and biological characterization of a novel botybirna virus identified from a Pakistani isolate of *Alternaria alternata*. *Virus Res.* 2019; 263: 119-28.
- Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Melø TM, Simic N, Bruheim P, Sharma M, SrinivasV, Alekhya G. Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum L.*). *Biocontrol Sci Techn.* 2015; 25(7): 739-55.
- Sugui JA, Kwon-Chung KJ, Juvvadi PR, Latgé JP, Steinbach WJ. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 5(2): a019786.

-T-

- Tralamazza SM, Piacentini KC, Iwase CHT, Rocha LO. Toxigenic *Alternaria* species: impact in cereals worldwide. *Curr Opin Food Sci.* 2018; 23: 57-63.

-V-

- Van den Berg MA. Functional characterisation of penicillin production strains. *Fungal Biol.* 2010; 24(1-2): 73-78.
- Van der Lende TR, van de Kamp M, Berg M, Sjollem K, Bovenberg RA, Veenhuis M, Konings WN, Driessen AJ. Delta-(L-alpha-Aminoadipyl)-L-cysteinyl-D-valine synthetase, that mediates the first committed step in penicillin biosynthesis, is a cytosolic enzyme. *Fungal Genet Biol.* 2002; 37(1): 49-55.
- Van Lenteren JC, Bolckmans K, Köhl J, Ravensberg WJ, Urbaneja A. Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *Bio Control.* 2018; 63(1): 39-59.
- Varadi G, Batta G, Kele Z, Toth GK. Synthesis of PAF, an antifungal protein from *Penicillium chrysogenum* by native chemical ligation. *J Pept Sci.* 2012; 18: S68-S68.
- Varzaru I, untea AE, martura T, Olteanu M. Development and validation of an RP-HPLC method for methionine, cystine and lysine separation and determination in corn samples. *Ilie Van Rev Chem.* 2013; 64(7): 673-9.
- Veiter L, Herwig C. The filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* analysed via flow cytometry-a fast and statistically sound insight into morphology and viability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019; 103(16): 6725-35.
- Veiter L, Kager J, Herwig C. Optimal process design space to ensure maximum viability and productivity in *Penicillium chrysogenum* pellets during fed-batch cultivations through morphological and physiological control. *Microb Cell Fact.* 2020; 19(1): 33.

Viggiano A, Salo O, Ali H, Szymanski W, Lankhorst PP, Nygård Y, Bovenberg RAL, Driessen AJM. Pathway for the biosynthesis of the pigment chrysogine by *Penicillium chrysogenum*. *Appl Environ Microbiol*. 2018; 84(4): e02246-17.

Vũ XT, Trần VT. Xác định đặc điểm sinh học và bước đầu nghiên cứu chuyển gen vào nấm sợi *Penicillium chrysogenum* có nguồn gốc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học đhqghn: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*. 2017; 33: 140-5.

-W-

Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara AN. *Trichoderma*: a significant fungus for agriculture and environment. *Afr J Agric Res*. 2016; 11(22): 1952-65.

Wang P, Ma L, Jin J, Zheng M, Pan L, Zhao Y, Sun X, Liu Y, Xing F. The anti-aflatoxigenic mechanism of cinnamaldehyde in *Aspergillus flavus*. *Sci Rep*. 2019; 9(1): 10499.

Wang X, Li J, Guo J, Qiao Q, Guo X, Ma Y. The WRKY transcription factor PIWRKY65 enhances the resistance of *Paeonia lactiflora* (herbaceous peony) to *Alternaria tenuissima*. *Hortic Res*. 2020; 7(1): 1-12.

Wenderoth M, Pinecker C, Voß B, Fischer R. Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genet Biol*. 2017; 101: 55-60.

West AV, Christina MW. Ironing out new antibiotic mechanisms with xanthocillin X. *A C S*. 2021; 7: 403-05.

Wollenberg RD, Saei W, Westphal KR, Klitgaard CS, Nielsen KL, Lysøe E, Gardiner DM, Wimmer R, Sondergaard TE, Sørensen JL. A two-module nonribosomal peptide synthetase mediates chrysogine biosynthesis. *J Nat Prod*. 2017; 80(7): 2131-5.

-X-

Xia MC, Bao P, Liu AJ, Zhang SS, Peng TJ, Shen L, Yu RL, Wu XL, Li JK, Liu YD, Chen M, Qiu GZ, Zeng WM. Isolation and identification of *Penicillium chrysogenum* strain Y5 and its copper extraction characterization from waste printed circuit boards. *J Biosci Bioeng*. 2018; 126(1): 78-87.

Xu K, Wei XL, Xue L, Zhang ZF, Zhang P. Antimicrobial meroterpenoids and erythritol derivatives isolated from the marine-algal-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* XNM-12. *Mar Drugs*. 2020; 18(11): 578.

-Y-

Yadav AN, Verma P, Kumar V, Sangwan P, Mishra S, Panjiar N, Gupta VK, Saxena AK. New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. Edition Elsevier. 2018. India.

- Yang J, Sun C, Zhang Y, Fu D, Zheng X, Yu T. Induced resistance in tomato fruit by γ -aminobutyric acid for the control of *Alternaria* rot caused by *Alternaria alternata*. *Food Chem.* 2017; 221: 1014-20.
- Yang N, Ma G, Chen K, Wu X. The population genetics of *Alternaria tenuissima* in four regions of China as determined by microsatellite markers obtained by transcriptome sequencing. *Front Microbiol.* 2018; 9: 1-15.
- Yang S, Wang T, Zhou Y, Shi L, Lu A, Wang Z. Discovery of cysteine and its derivatives as novel antiviral and antifungal agents. *Molecules.* 2021; 26(2): 383.

-Z-

- Zhang HL, Cai H, Xia Y, Zhang P, Xiong SW, Gai JG. An l-cystine/l-cysteine impregnated nanofiltration membrane with the superior performance of an anchoring heavy metal in wastewater. *RSC Adv.* 2020; 10: 3438-49.
- Zhang R, Yong J, Yuan J, Xu ZP. Recent advances in the development of responsive probes for selective detection of cysteine. *Coord Chem Rev.* 2020; 408: 213182.

Annexes

PDA :

- 200 g des pommes de terre
- 20 g de glucose
- 20 g d'agar
- 1 litre d'eau distillée

CYA :

- 30 g de saccharose
- 3 g de NaNO_3
- 1 g de K_2HPO_4
- 0,5 g de KCl
- 0,01 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 15 g d'agar
- 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 5 g d'extrait de levures
- 1 litre d'eau distillée
- pH = 6

G25N :

- 2 g de K_2HPO_4
- 10 ml de Czapek
- 5 g d'extrait de levure
- 10 g de glycérol
- 16 g d'agar
- 1 litre d'eau distillée
- pH = 6

Production de la cystine par *Penicillium chrysogenum* et perspectives d'utilisation pour la prévention des maladies et des altérations causées par les moisissures phyto-pathogènes et d'altération.

Membres du Jury :

Présidente : Dr. AMIRA S.

Examinateur : Mr. BOUDJERDA Dj.

Promotrice : Dr. AKROUM S.

Présenté par :

M^{elle} KAIBA Badia

M^{elle} BOUDJATIT Sara

M^{elle} BIROUCHE Bochra

Résumé :

Penicillium chrysogenum est un champignon connu pour produire une grande diversité de composés secondaires antimicrobiens. Dans ce travail, nous nous intéressons à sa capacité à inhiber des moisissures phyto-pathogènes. Notre objectif est d'isoler des dernières à partir de différents plantes infectées ainsi que de divers légumes et fruits altérés. Après isolement et identification, *P. chrysogenum* est testée sur ces moisissures par deux méthodes de test de l'activité antifongique : l'affrontement entre espèces et la méthode des puits. Puis, un essai d'optimisation de la production des métabolites secondaires est réalisé sur *P. chrysogenum*. Les résultats montrent que quatre moisissures phyto-pathogènes sur dix sont sensibles à *P. chrysogenum*. En effet, l'activité antifongique de *P. chrysogenum* est importante sur *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* et *Alternaria rosae*, notamment quand elle est cultivée sur le lactose, la farine de blé, avec un pH=7 et incubée à 28°C. Le dosage de la pénicilline G et de la cystine confirment que ces conditions optimisent la production des métabolites secondaires par l'espèce.

Mots clés : *Penicillium chrysogenum*, moisissures phyto-pathogènes, activité antifongique, pénicilline, cystine.

Production of cystine by *Penicillium chrysogenum* and prospects of use for the prevention of diseases and spoilage caused by phyto-pathogenic and spoilage molds.

Summary:

Penicillium chrysogenum is a fungus known to produce a wide variety of antimicrobial secondary compounds. In this work, we are interested in its ability to inhibit phyto-pathogenic molds. Our goal is to isolate these molds from various infected plants and spoiled vegetables and fruits. After isolation and identification, *P. chrysogenum* is tested on these molds by two methods of testing the antifungal activity: the confrontation between species and the well method. Then, an optimization test for the production of secondary metabolites is carried out on *P. chrysogenum*. The results show that four out of ten phyto-pathogenic molds are sensitive to *P. chrysogenum*. Indeed, the antifungal activity of *P. chrysogenum* is important on *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* and *Alternaria rosae*, especially when it is grown on lactose, wheat flour, with a pH = 7 and incubated at 28°C. The determination of penicillin G and cystine confirms that these conditions optimize the production of secondary metabolites by the species.

Keywords: *Penicillium chrysogenum*, phyto-pathogenic molds, antifungal activity, penicillin, cystine.

إنتاج السيستين بواسطة *Penicillium chrysogenum* وإمكانية استخدامه للوقاية من الأمراض والفساد الناجم عن الفطريات المسببة لأمراض النباتات.

ملخص:

Penicillium chrysogenum هو فطر معروف بإنتاج مجموعة متنوعة من المركبات الثانوية المضادة للميكروبات. اهتمنا في هذا العمل بدراسة قدرته على تثبيط العفن الممرض للنبات. هدفنا هو عزل الأخير من مختلف النباتات المصابة وكذلك العديد من الخضروات والفواكه الفاسدة. بعد العزل والتعرف، تم اختبار *P. chrysogenum* على هذه الفطريات من خلال طريقتين لاختبار النشاط المضاد للفطريات: المواجهة بين الأنواع وطريقة البئر. ثم إجراء اختبار الأمثل لإنتاج المواد الأيضية الثانوية على *P. chrysogenum*. أظهرت النتائج أن أربعة من كل عشرة فطريات ممرضة للنبات معرضة للإصابة بـ *P. chrysogenum*. في الواقع، نشاط *P. chrysogenum* المضاد للفطريات كبير ضد *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Alternaria tenuissima* و *Alternaria rosae* خاصة عندما تزرع على اللاكتوز ودقيق القمح، مع درجة حموضة 7 و 28 درجة مئوية. يؤكد تحديد البنسلين G والسيستين أن هذه الظروف تعمل على تحسين إنتاج المركبات الثانوية من قبل الأنواع.

الكلمات الدالة: *Penicillium chrysogenum*، العفن الممرض للنبات، النشاط المضاد للفطريات، البنسلين، السيستين.

