

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA

FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Présenté par :

HAMANI Manar & BOUDAUD Djamilia

Thème

*Effet antifongique des extraits aqueux et éthanoliques
des feuilles et des noyaux de Persea americana*

Soutenu le : 01 / 07/ 2018

Devant le jury composé de :

Nom et Prénom

Grade

Mme. BENMAIL souhila

MAA

Univ. de Bouira

Président

Mlle. AIT MIMOUNE Nouara

MCB

Univ. de Bouira

Promotrice

Mme. DJOUAHRA Djamilia

MAA

Univ. de Bouira

Examineur

Année Universitaire : 2017/2018

Remerciements

Avant tout, Nous remercions Dieu Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage et la patience pour effectuer ce travail.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer mes profondes reconnaissances et à remercier :

Madame AIT MIMOUNE NOUARA enseignante aux départements des sciences biologiques-Université de Bouira pour avoir dirigé ce travail et accepter d'être encadreur. Je remercie pour ces conseils et ses orientations.

Nous remercions aussi tous les enseignants de l'université de Bouira tous les efforts consacrés pour nous transmettre le savoir.

En fin je remercie tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, Sans oublier les amies et toutes les équipes du laboratoire de biochimie et microbiologie et les étudiantes de la promotion biotechnologie macrobienne 2017/2018

Merci

Manar, Djamilia

Liste d'abréviations

c° : degré Celsius

cm : centimètres

H : humidité

h : heure

g : grammes

Kcal: kilocalorie

KJ: kilo-joule

m: mètres

mg: milligramme

ml: millilitre

nm: nanomètres

PDA: Potato Dextrose Agar

Qté : quantité

R : rendement

T : température

Ug : microgrammes

Ul : microlitres

Liste des tableaux

Tableau 01 : taxonomie et systématique.....	03
Tableau 02 : la quantité des vitamines dans 100g net d'avocat.....	07
Tableau 03 : Classification simplifiée des champignons.....	13
Tableau 4 : Taux d'humidité dans les feuilles et les noyaux de <i>Persea americana</i>	28
Tableau 05 : Couleur et rendement de différents extraits secs de <i>Persea americana</i>	30
Tableau 06 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits aqueux des feuilles et des noyaux de <i>Persea americana</i>	33
Tableau 07 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits éthanoliques Des feuilles et des noyaux de <i>Persea americana</i>	35

Liste des FIGURES

Figure 01: Les différentes variétés d'avocatier.....	04
Figure 02: Les principales constitutions de l'avocat	06
Figure 03: Organes de fructifications du genre <i>Aspergillus</i>	11
Figure 04: Le cycle de vie d'une moisissure.....	12
Figure 05: Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i>	15
Figure 06 : Les feuilles et les graines de <i>Persea americana</i>	17
Figure 07: Aspects macroscopiques des souches testées après 7 jours d'incubation sur milieu PDA.....	18
Figure 08: Aspect des broyots.....	20
Figure 09 : Filtration des extraits après macération et récupération des filtrats.....	21
Figure 10 : Evaporateur rotatif.....	22
Figure 11: Protocole de préparation des extraits aqueux et hydro-éthanolique de <i>Persea americana</i>	24
Figure 12: Schéma des différentes étapes de la réalisation Du test antifongique.....	27
Figure 13 : Aspects microscopiques (Gx100) des espèces aspergillaires étudiées, après culture sur milieu PDA.....	31
Figure 14 : Activité antifongique des différentes concentrations des extraits aqueux ethydro-éthanolique de <i>Persea americana</i> vis-à-vis des espèces aspergillaires testées..	36

Table des matières

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Rappelle bibliographique

La plante : Persea americana

I.1.Généralités sur <i>Persea americana</i>	02
I.1.1.Description botanique	02
I.1.2.Taxonomie et systématique	02
I.1.3. Écologie.....	03
I.1.4.Classification.....	05
I.1.4.1 . <i>Persea drymifolia Cham</i>	05
I.1.4.2. <i>Persea Americana Mill</i>	05
I.1.5.La compositions de l'avocat.....	06
I.1.6.Les propriétés d'avocatier	07
I.1.6.1.Propriétés pharmaceutiques	07
I.1.6.2.Propriétés antioxydantes.....	08

Les champignons

I.2.Les champignons filamenteux.....	09
I.2.1.Généralités.....	09
I.2.2.Habitat	09
I.2.3.Méthodes d'identification des champignons filamenteux.....	10
I.2.3.1. Analyse macroscopique.....	10
I.2.3.2. Analyse microscopique.....	10
I.2.4.Modes de reproduction	11
I.2.5.Mode de vie.....	12
I.2.6.Classification des champignons filamenteux.....	13

I.2.7.Pouvoir pathogènes	13
I.2.8.Les principaux genres fongiques.....	14
I.2.8.1.Le genre <i>Aspergillus</i>	14
I.2.8.2.Pouvoir pathogène.....	16

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 .Matériel.....	17
II.1.1.Matériel biologique.....	17
II.1.1.1. Matériel végétal.....	17
II-1-1-2- Souches fongiques.....	17
II.1.2. Appareillage et produits chimiques.....	18
II.2.Méthodes.....	19
II.2.1.Calcul du taux d'humidité	19
II.2.2.Broyage.....	19
II.3.Préparation des diluants.....	19
II.4.Préparation des extraits.....	19
II.5.Evaporation.....	22
II.6. Détermination du rendement d'extraction.....	23
II.7. Préparation du milieu de culture.....	25
II.8. Repiquage des souches.....	25
II.9. Préparation des suspensions.....	25
II.10. Evaluation de l'activité antifongique.....	26

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion.....	28
III.1. Taux d'humidité.....	28
III.2. Rendements des extractions.....	29
III.3. Observation macroscopique et microscopique des <i>Aspergillus</i>	30
III.4. Activité antifongique.....	30
III.4.1. Extraits aqueux	32
III.4.2. Extraits éthanoliques	33
CONCLUSION.....	39

Introduction

Depuis des milliers d'années, l'homme utilisait les plantes trouvées dans la nature, pour traiter et soigner des maladies [1]. Les plantes médicinales sont importantes pour la recherche pharmacologique et l'élaboration des médicaments, non seulement lorsque les constituants des plantes sont utilisés directement comme agents thérapeutiques, mais aussi comme matières premières pour la synthèse de médicaments ou comme modèles pour les composés pharmaco-logiquement actifs [2].

Les extraits bruts des plantes commencent à avoir beaucoup d'intérêt comme source potentielle de molécules naturelles bioactives [3]. En effet, les plantes sont capables de produire une grande diversité de produits ne participant pas à leur métabolisme de base, mais représentant plutôt des produits du métabolisme secondaire [4].

Les plantes sont également utilisées pour leur propriété antibactérienne et antifongique. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale. Il est certain que la plupart des antibiotiques prescrits dérivent des microorganismes [5].

Dans ce travail, nous avons essayé de mettre en évidence l'action des extraits de *Persea americana* sur la régression de certains champignons.

A notre connaissance, il n'existe pas des travaux dans la littérature sur l'activité antimicrobienne et particulièrement antifongique de l'avocatier cultivé en Algérie. De plus, les travaux réalisés sur cette plante se focalisent beaucoup plus sur l'activité antibactérienne.

Ce travail a été organisé en trois parties. La première partie est consacrée à l'analyse bibliographique sur la plante utilisée et les champignons. Dans la deuxième partie (la partie expérimentale), nous allons décrire la démarche générale adoptée pour la préparation des extraits étudiés. Nous nous intéressons ensuite à la méthode utilisée pour l'étude de l'activité antifongique.

La troisième partie est réservée aux résultats expérimentaux obtenus et leur discussion. Ce travail se termine par la présentation d'une conclusion générale qui récapitule notre étude et met en valeur les principaux résultats obtenus avec quelques perspectives.

I.1. Généralités sur *Persea americana*

I.1.1. Description botanique

Le genre *Persea americana* compte plus de 2 200 espèces. L'avocatier est un arbre de taille moyenne à grande, de 9-20 m de hauteur qui est caractérisé par un feuillage persistant, bien que certaines variétés le perdent pendant une courte période avant la floraison. Les feuilles ont une taille allant de 7 à 41 cm et une forme variable (elliptique, ovale, lancéolé). Les fleurs sont vert jaunâtre et ont un diamètre de 1-1,3 cm. Les feuilles d'avocatier sont K2vertes et coriaces. Les fleurs, vertes aussi, s'ouvrent au début de la saison humide. Les organes mâles et femelles n'arrivent pas à maturité en même temps au sein d'un même arbre [6].

I.1.2. la taxonomie de la plante

Les recherches sur l'origine de l'avocatier ont été difficiles du fait des incertitudes sur la détermination des *Persea* suite aux travaux de POPENOE dans les années trente. En 1934, les grandes différences d'appellations vernaculaires entre les diverses régions où les Espagnols ont découvert l'avocatier cultivé compliquèrent la tentative de taxonomie (Tableau 01) . Actuellement, les spécialistes de la taxonomie s'accordent sur la classification au niveau de la classe (Dicotylédone), de la famille (Lauracées) et du genre (*Persea*). Au niveau de l'ordre, certains botanistes admettent que le genre *Persea* appartient aux Magnoliales, alors que d'autres le classent dans les Ranales. Une majorité considèrent que les variétés cultivées appartiendraient à deux espèces: *Persea americana* et *Persea nubigena* .

Persea americana Miller (synonyme *P. gratissima* Gaertn) est subdivisé en deux sous-espèces: *P. americana* Miller var. *americana* qui est le type originel de la race antillaise (West Indian Avocado) et *P. americana* Miller var. *drymifolia* (Schlecht et Cham.) qui est le type originel de la race mexicaine (Mexican Avocado).

Persea nubigena L. Williams est, également, subdivisé en deux sous-espèces: *P. nubigena* L. Williams var. *nubigena*, qui est le type spontané de la race guatémaltèque découvert par Popenoe dans les Chiapas du Mexique. et *P. nubigena* L. Williams var. *Guatemalensis*, qui est le type sélectionné de la race guatémaltèque.

Une dizaine d'autres espèces de *Persea* découvertes en Amérique Centrale et Amérique du Sud sont citées dans la littérature. La poursuite des explorations dans les zones d'origine de l'avocatier laisse de penser que d'autres types de *Persea* pourraient être encore découverts [7].

Tableau 01: taxonomie et systématique [8]

Règne	Plantae
Division	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordre	Laurales
Famille	Lauraceae
Genre	<i>Persea</i>
Espèce	<i>americana</i>

I.1.3. Écologie

Le Mexique est le premier producteur mondial de l'avocat, l'explosion de la demande est en train de créer une catastrophe écologique. [9]

Les différentes variétés d'avocats sont réparties dans le monde selon des critères bien définis ; Indien de l'Ouest qui se trouve dans les forêts d'Amérique centrale caractériser par des gros fruits, bien adapté aux régions tropicales sont Plus faibles teneurs en huile .La variété Mexicain elle est Réside dans un habitat plus élevé avec Période sèche de 6-8 mois hiver-printemps sont caractériser par Une peau très fine qui la rend vulnérable aux maladies, A une Graine grosse et fruits plus petits. Guatémaltèque Semblable à mexicain dans l'huile contenu et saveur, Trouvé dans des conditions moins extrêmes communes dans tropical hautes terres avec des conditions fraîches toute l'année. Plus haut niveau de qualité horticole des trois races, a besoin de plus de temps pour mûrir.par contre Hass cultivar Sont Cultivar le plus populaire aux États-Unis, Popularisé en Californie. Qui sont Également produit au Mexique (le plus gros avocat au monde Producteur) et Chili [10].



Indien de l'Ouest



Mexicain



Guatémaltèque



Hass cultivar

Figure 01: Les différentes variétés d'avocat [10]

Plusieurs espèces de « *Persea* » introduites en Algérie et tout particulièrement au Jardin d'Essai d'Alger, sont rencontrés en de nombreuses Stations du Sahel algérien des conditions écologiques favorable à leur développement.

Les espèces fruitières *Persea americana* et *Persea americana drymifolia* » qui font l'objet d'une culture importante aux 'Etats-Unis manifestent cette adaptation et méritent d'une étude plus poussée de leur comportement en vue de préciser leur intérêt économique éventuel dans le verger nord-africain [11].

I.1.4.Classification

Il existe plusieurs variétés au sein de l'espèce *P. americana* mais les deux espèces les plus connues sont; *Persea drymifolia* Cham. Et *Persea americana* Mill [12].

I.1.4.1. *Persea drymifolia* Cham

Ces avocatiers communs au Mexique sont caractérisés par une petite taille. Beaucoup d'arbres de cette espèce sont cultivés en Californie, au Chili et dans certaines parties de l'Europe et de l'Asie. Les feuilles de cette espèce ont une odeur d'anis qui permet de les identifier aisément. La peau de ces fruits est plutôt mince, dépassant rarement 4 mm d'épaisseur [12].

I.1.4.2.*Persea americana* Mill

Persea americana Mill, appelé plus communément avocatier, est un arbre de la famille des Lauraceae. Il est originaire du Mexique, et se développe dans un climat tropical à sous-tropical. L'arbre peut atteindre une hauteur de 20 mètres.

Le fruit est une drupe avec une peau ayant une couleur allant du vert au noir et contenant un gros noyau. Il existe environ 400 variétés, majoritairement cultivées à des fins alimentaires. De plus, de nombreuses propriétés médicinales leur sont associées Ils sont couramment utilisés comme vermifuge ou contre la fièvre depuis longtemps. Aujourd'hui, beaucoup de pays cultivent cet arbre, mais le Mexique reste le leader [13].

I.1.5. La composition de l'avocat

L'avocat est une source riche de nutriments et de composés phytochimiques. Il fait partie des fruits et légumes ayant l'apport énergétique le plus important. En effet, sa teneur moyenne est de 155 kcal pour 100 g soit 638 kJ alors que la plupart des fruits et légumes ont une moyenne de 43,5 kcal pour 100 g. Cette propriété provient de sa composition particulièrement forte en lipides. [14]

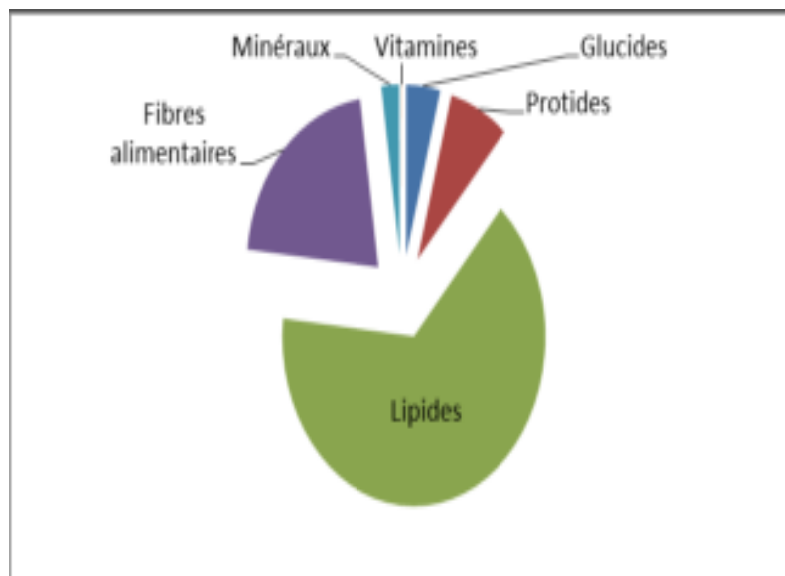


Figure 02: Les principales constitutions de l'avocat [14]

L'avocat contient une quantité importante d'huile par rapport aux autres fruits. Cette huile est riche en acides gras mono insaturés dont la teneur en acide oléique est la plus élevée [15].

Une étude précédente a mis en évidence la présence de différents polyphénols dont les acides perseitol, quinique, chlorogénique, trans-cinnamique, pantothénique et abscisique, ainsi que l'épicatéchine et la catéchine, dont les concentrations diminuent pendant le processus de maturation. A l'inverse, la concentration en acide férulique et l'acide ρ -coumarique augmente [16].

Dans le noyau et la peau de l'avocat les catéchines, procyanidines et acides hydroxycinnamiques ont été identifiés, alors que ce sont les acides hydroxybenzoïques et hydroxycinnamiques et des procyanidines qui seraient plus présents dans la pulpe [17].

Persea americana renferment diverses métabolites secondaires. Le prédominant caroténoïde dans l'avocat est la lutéine qui représente 70 % de ses caroténoïdes. L' α -carotène, le β -carotène, la zéaxanthine, la néoxanthine et la violaxanthine caroténoïdes présents en petites quantités à l'intérieur. Les tocophérols ont également été identifiés. Il s'agit du (E, Z, Z) -1-acétoxy-2-hydroxy-4-oxo-hénéicosa-5, 12,15-triène et ils ont été isolés à partir des idioblastes de l'avocat [19].

L'avocat est aussi riche en vitamine par exemples : vitamine B9, car 100 g d'avocat apportent l'équivalent de 79,9ug (tableau 02) [14].

Tableau 02 : la quantité des vitamines moyenne pour 100g net d'avocat [14].

Vitamines	Quantité
Provitamine A bêta-carotène	60ug
vitamine A	10ug
Vitamine B1	0,05mg
Vitamine B2	0,13mg
Vitamine B3	1 ,2mg
Vitamine B5	0,77mg
Vitamine B6	0,12mg
Vitamine B9	79,9ug
Vitamine C	4,07mg
Vitamine E	1,77mg

I.1.6. Les propriétés de l'avocatier

I.1.6.1. Propriétés biologiques

L'avocat est consommé dans le monde entier dans le cadre d'une alimentation saine de ses fruits en raison de la faible teneur en calories, en sodium et en matières grasses. De plus, *P. americana* est utilisé en médecine populaire en raison de ses nombreuses

propriétés telles qu'analgésique, anti-inflammatoire, antioxydant, anti hémolytique et hépato protectrices.

Ces activités biologiques sont dues à la présence de différentes classes de produits tels que les phytostérols, les triterpènes, les dimères flavonoïdes, les proanthocyanidines et les acides gras. La dernière classe est la principale composante de la fraction lipidique de l'avocat [20].

Les polyphénols ont également attiré l'attention en raison de leur valeur thérapeutique, liée à leurs activités antioxydantes, ainsi qu'à leurs propriétés antimutagènes, anticancérigènes et antimicrobiennes. Le noyau d'avocat est riche en flavonoïde, un antioxydant très puissant qui aide à prévenir et à réduire la croissance tumorale [21].

Les propriétés antioxydantes des polyphénols végétaux sont intéressants pour l'industrie pharmaceutique et alimentaires. Ces composés ont la capacité à inhiber la peroxydation des lipides en capturant des espèces réactives telles que l'hydrogène. Les peaux et les pulpes des fruits contiennent une grande quantité d'antioxydants qui représentent un système de défense de la plante contre différents types de contraintes, telles que la température et la lumière.

Il a été rapporté que les caroténoïdes des avocats peuvent avoir des effets anticancérigènes potentiels. Le persin est l'un des composés isolés des feuilles d'avocat connu pour son effet inducteur de l'apoptose dans les cellules cancéreuses du sein [21].

I.1.6.2. Propriétés pharmaceutiques

Persea americana est utilisé dans de nombreuses régions dans le traitement de plusieurs affections. Elle est recommandée pour l'anémie, l'épuisement, l'hypercholestérolémie, hypertension, gastrite et ulcère gastroduodénale.

Les feuilles sont utilisées dans la médecine traditionnelle pour soulager de la douleur arthritique et comme agent antidiabétique. Des travaux ultérieurs ont montré que l'extrait de noyau d'avocat est capable les cellules leucémiques. Dans une étude plus récente, publiée dans la revue Cancer Research, les experts ont découvert qu'un constituant du trouvé dans l'extrait de noyau d'avocat appelé avocatin B était extrêmement efficace contre les cellules de la leucémie myéloïde aiguë [22].

I.2. Les champignons filamenteux

I.2.1. Généralités

Les micromycètes sont des champignons microscopiques regroupant les levures et les Champignons filamenteux. Ce sont des microorganismes eucaryotes caractérisés par la présence d'une membrane nucléaire et de mitochondries. Ils sont ubiquitaires et très répandus dans la nature, notamment au niveau des végétaux en décomposition. Les champignons filamenteux sont hétérotrophes, et plus particulièrement absorbotrophes puisqu'ils absorbent les éléments, digérés de manière extracellulaire, à travers leur appareil végétatif présentant une perméabilité pariétale.

Les champignons filamenteux ne peuvent pas synthétiser de matière organique à partir du gaz carbonique atmosphérique. Car ils ils sont incapables d'assurer la photosynthèse. Une source de carbone organique est donc nécessaire à leur développement. Ils synthétisent leurs propres nutriments à partir de l'eau et des éléments nutritifs et des minéraux qu'ils puisent dans leur environnement. Il joue un rôle important dans le recyclage des matières organiques en puisant leur énergie à partir de ces sources carbonées externes.

Le développement des champignons se fait par croissance apicale et élongation des filaments à partir de leurs extrémités dans toutes les directions et de façon identique. Le mode de croissance se traduit par la mise en place de colonies circulaires (thalles) caractéristiques des champignons sur milieu gélosé.

Leur appareil végétatif (thalle) est constitué de filaments ramifiés (cloisonnés ou non cloisonnés). A l'intérieur de la structure filamenteuse, entourée d'une paroi rigide, se trouve une masse cytoplasmique multi-nucléée mobile.

Chez de nombreux champignons, il existe des cloisons transversales régulières dans les hyphes, mais ces cloisons sont percées d'un pore central permettant la libre circulation du cytoplasme et des noyaux. Néanmoins, on dit qu'ils ont un mycélium «cloisonné» [23].

I.2.2. Habitat

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures se développent.

Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropical [24].

I.2.3. Méthodes d'identification des champignons filamenteux

L'identification des champignons filamenteux en routine repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

I.2.3.1. Analyse macroscopique

Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons filamenteux, plusieurs aspects de l'appareil végétatif sont observés :

- L'aspect : duveteux, laineux, cotonneux, velouté, poudreux, granuleux ou glabre.
- Le relief : plat, plissé ou cérébriforme.
- La taille : petite, étendue ou envahissante.
- La couleur : blanche, crème ou colorée (verte, brune, orangée, violette, grises...).
- La présence d'un pigment diffusant dans la gélose ainsi que certains paramètres telle.
- La vitesse de la pousse des colonies ou la température de développement peuvent être de bons indicateurs pour l'identification d'une moisissure [23].

I.2.3.2. Analyse microscopique

Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures des champignons filamenteux sont observées comme l'appareil végétatif, les organes de fructification et les spores :

- Le thalle végétatif : septé (diamètre étroit et régulier de 2 à 5 μm) ou siphonné (filaments peu ou pas ramifiés, diamètre large et irrégulier de 5 à 15 μm), paroi pigmentée (mélansée) ou non (hyaline).
- Les organes de fructifications (Figure 03) : présence ou non d'organes protecteurs des Conidies, modes de formation des conidies (issues directement du thalle, solitaires (aleuriospores) ou en chaînes (arthrospores), ou produites par bourgeonnement et regroupées soit en grappes, en masse, en têtes ou en chaînes basipètes ou acropètes), modes d'implantation des cellules conidiogènes [indifférenciée ou peu différenciée, différenciées (sur le filament végétatif, porté sur les conidiophores dispersés ou groupés)

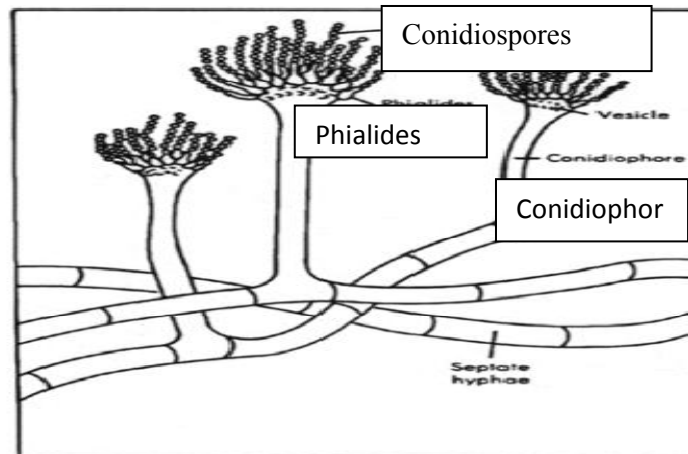


Figure 03: Organes de fructifications du genre *Aspergillus*

- Les spores : endogènes (endospores) ou exogènes (conidiospores ou conidies), l'aspect des spores [améropores (unicellulaires et de petite taille), didymospores (bicellulaires), phragmospores (pluricellulaires à cloisons transversales), dictyospores (pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales), scolécospores (étroites et effilées) [23].

I.2.4. Modes de reproduction

Les moisissures se reproduisent grâce à des spores. Celles-ci sont issues soit d'une reproduction sexuée (champignon téléomorphe) ou d'une multiplication asexuée (champignon anamorphe). Les moisissures peuvent se reproduire de plusieurs façons :

- ✓ Par simple repiquage de tout fragment vivant de mycélium. Pour isoler et repiquer un champignon, il suffit de prélever une portion très petite du thalle (au niveau de la marge).
- ✓ Par reproduction asexuée : la plupart des champignons ont la capacité de se multiplier par le moyen de spores mitotiques produites dans le cycle normal du mycélium végétatif (le plus souvent haploïde). En effet une spore germe et émet un filament qui croît, s'allonge par l'extrémité apicale et se ramifie pour donner un nouveau mycélium (Figure 04). Dans cette catégorie, il existe deux types de spores : des spores endogènes formées à l'intérieur de cellules spécialisées ou sporocystes (Mucorales) et des spores exogènes (conidies) produites soit à la surface du mycélium ou sur des filaments spécialisés (appareils conidiens ou conidiophore) libres ou groupés dans une structure spécialisée appelée pycnide.

Par reproduction sexuée : les modalités de la reproduction sexuée sont très variées. Chez les champignons dits "supérieurs", il n'y a pas de production de gamètes mâle et femelle et les organes sexuels sont morphologiquement peu ou pas différenciés. Cependant les basidiomycètes présentent une sexualité qui se manifeste seulement par la conjugaison de deux noyaux compatibles (caryogamie : un noyau à $2n$ chromosomes) suivie d'une méiose (4 noyaux à n chromosomes). Ces phénomènes nucléaires se produisent généralement dans des organes de fructification plus ou moins différenciés. Les grands groupes de la classification des champignons sont fondés sur la nature et la morphologie de ces fructifications [24].

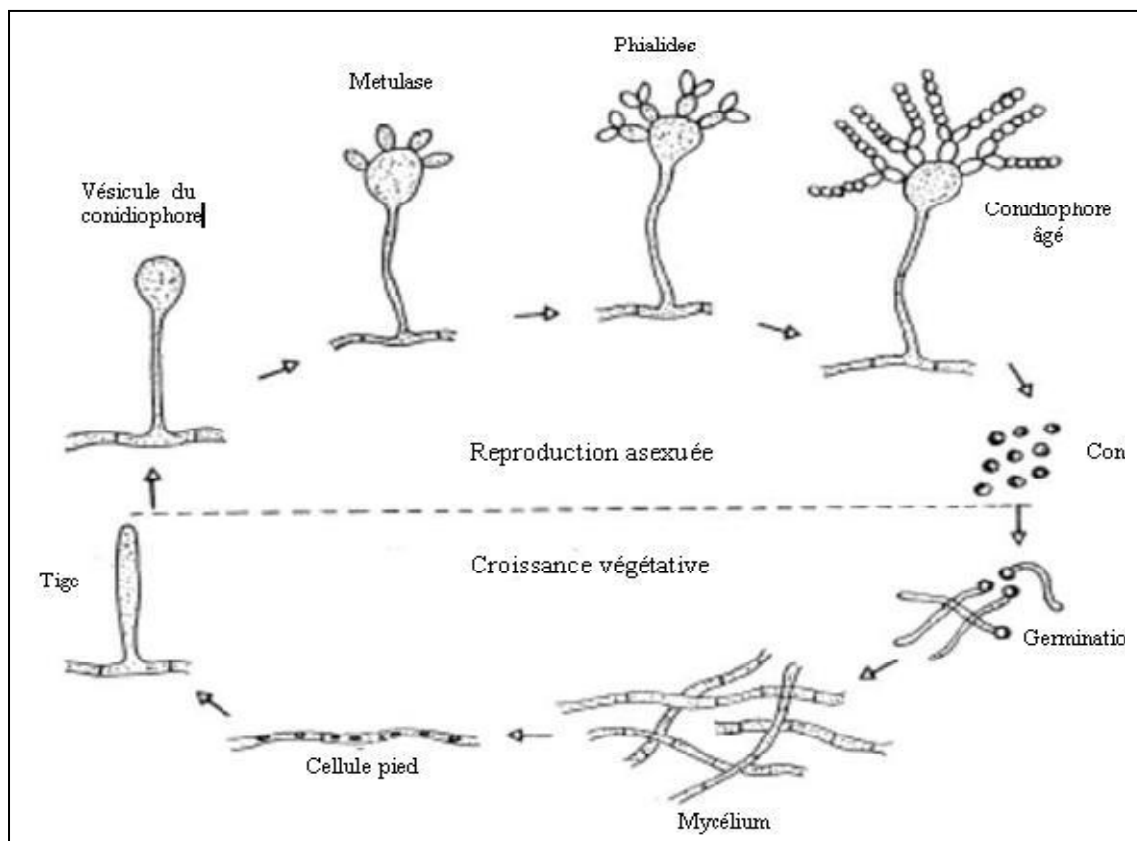


Figure 04: cycle de vie d'une moisissure [24]

I.2.5. Mode de vie

La quasi-totalité des mycètes vivent aux dépens de la matière organique en décomposition, ce sont des agents de *recyclage* de la matière minérale dans la nature, connus sous la nomination de « *Saprophytes* ». Dans des conditions particulières, beaucoup de micromycète parasitent des organismes végétaux ou animaux ou même d'autres mycètes

(c'est le cas de l'espèce *Penicillium rugulosum* qui infecte la tête d'*Aspergillus niger*, en formant dessus, des phialides regroupés en pénicilles et le conduit finalement à la mort) [25].

I.2.6. Classification des champignons filamenteux

Bien qu'aucun schéma phylogénétique des champignons n'ait reçu un agrément unanime de la part de la communauté scientifique, la classification simplifiée suivante peut être proposée (Boiron, 1996). Celle-ci permet de distinguer deux grandes divisions qui se séparent chacune en une série de sous-groupes (Tableau 03). La première regroupe les Chromista ou Pseudomycota, pour les Oomycètes et les Hyphochytridiomycètes, à côté de certaines algues. La seconde regroupe les Fungi ou Eumycota, appelés également champignons "vrais" [25].

Tableau 03 : Classification simplifiée des champignons [25]

Division	Classe	Sous-classe
Chromista ou Pseudomycota	Oomycetes	
	Hyphochytridiomycetes	
	Chytridiomycetes	
	Zygomycètes	
	Ascomycètes	Hemiascomycetidea Euascomycetidea Loculoascomycetidea
	Basidiomycètes	Teliomycetidea Eubasidiomycetidea
	Deutéromycètes	Hyphomycetidea Coelomycetidea Blastomycetidea

I.2.7. Pouvoir pathogènes

Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasiticus* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène puissante). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides [26]. D'autres exemples existent encore, telle que l'action de *Cryphonectria parasitica* responsable de la cessation de quatre milliards d'arbres de châtaigne aux Etats-Unis [27].

I.2.8. Les principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*. Ils représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits d'origine végétaux et animale [28].

I.2.8.1. Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, se terminant par une en vésicule (Figure 05) [29]. Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches [30]. Une vingtaine d'espèces sont impliquées dans des pathologies animales et humaines. Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud [31]; ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air [32].

Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques [30].

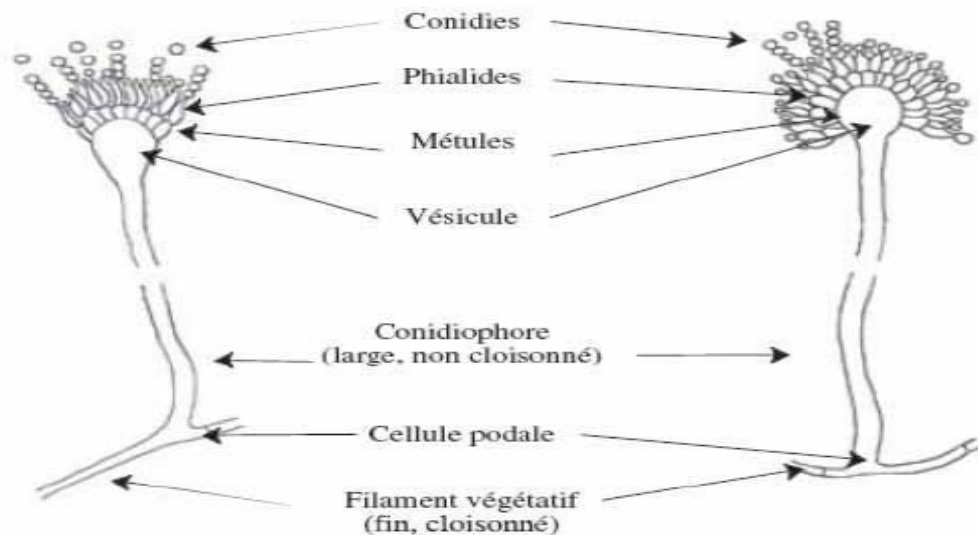


Figure 05: Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* [29]

I.2.8.2. Pouvoir pathogène

Les *Aspergillus* sont capables de produire des toxines appelées mycotoxines dont les plus rencontrées sont les aflatoxines B1 et B2 et l'acide aspergillique. *A. flavus* peut élaborer divers métabolites toxiques, mais surtout des aflatoxines, notamment l'aflatoxine B1 qui est l'un des plus puissants hépato-carcinogènes connus à l'heure actuelle. Des aflatoxicoses aiguës ou chroniques ont été fréquemment observées en élevage, les animaux les plus sensibles étant les volailles, les porcins, les jeunes ovins et bovins, ainsi que les truites.

Les matières premières susceptibles d'être contaminées par les aflatoxines sont principalement l'arachide, le maïs, les tourteaux (arachide, coton, coprah et soja), le manioc, le sorgho, le blé, et le lait (ce dernier pouvant contenir de l'aflatoxine M1 issue du métabolisme des aflatoxines ingérées).

Les *Aspergillus* présentent également un important pouvoir pathogène. Ils attaquent principalement les voies respiratoires de l'homme et des animaux. C'est l'un des principaux agents responsables des aspergilloses bronchiques allergiques [33].

II. Matériel et méthodes

L'objectif de ce travail est l'étude de l'activité antifongique des extraits aqueux et hydro éthanolique de *Persea americana* sur quelques souches d'*Aspergillus*. La première étape du travail a été la récolte de la matière végétale suivie de l'extraction des molécules actives.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel biologique

II.1.1.1. Matériel végétal

Notre étude a porté sur l'activité antifongique des feuilles et des noyaux de fruit de *Persea americana* (Figure 06). La matière végétale a été récoltée le mois de Février 2018 dans la région d'Alger (Algérie). La plante a été authentifiée par le Laboratoire de Botanique de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger).

Les noyaux et les feuilles ont été récupérés et nettoyés à l'eau de robinet afin d'éliminer les impuretés puis séchés pendant deux semaines à l'abri des rayons solaires afin de préserver au maximum l'intégrité des molécules actives.



Figure 06 : Les feuilles et les graines de *Persea americana*

II.1.1.2. Souches fongiques

L'activité antifongique des extraits de la plante a été étudiée en utilisant des souches fournies par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens, département de Biologie (Ecole normale supérieure de Kouba, Alger, Algérie). Les différentes souches utilisées sont ;

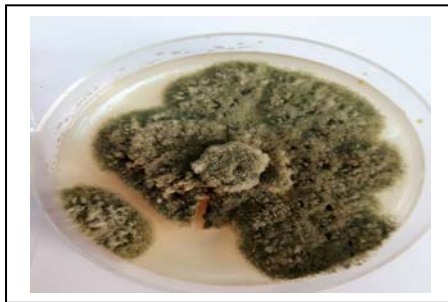
Aspergillus parasiticus, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus fumigatus* (Figure 07).



Aspergillus carbonarius



Aspergillus parasiticus



Aspergillus flavus



Aspergillus fumigatus

Figure 07: Aspects macroscopiques des souches après 7 jours d'incubation sur milieu PDA

II.1.2. Appareillage et produits chimiques

Une liste des produits chimiques et des appareils utilisés durant ce travail figure dans l'annexe.

II.2. Méthodes

II.2.1. Calcul du taux d'humidité

Le taux d'humidité représente la perte de masse que subi le produit après séchage, dans des conditions spécifiques, exprimée en pourcentage. Ce test est très important car il nous a permis de contrôler l'étape de séchage de la plante [34].

Le taux d'humidité à est calculé selon la formule suivante:

$$H\% = \frac{P - P_0}{P} \times 100$$

H% = taux d'humidité en pourcentage.

P = Poids de l'échantillon avant le séchage en g.

P₀ = Poids de l'échantillon après le séchage en g.

II.2.2. Broyage

Les feuilles et les noyaux ont été broyées séparément à l'aide d'un broyeur électronique jusqu'à l'obtention d'une poudre (figure 08). Les broyats obtenus ont été tamisés pour avoir une poudre homogène puis stockés dans des bocaux en verre à l'abri de la lumière jusqu'à l'utilisation.

II.3. Préparation des diluants

L'eau distillée stérile a été choisie pour la réalisation des suspensions fongiques. La préparation des diluants consiste en une stérilisation de l'eau distillée après ajout de quelques gouttes de tween 80. Les diluants préparés sont repartis dans des tubes à essai à raison de 10 ml par tube. Les tubes sont autoclavés à 120°C pendant 20 minutes puis finalement refroidis à température ambiante avant utilisation.

II.4. Préparation des extraits

L'extraction est une étape très importante avant l'analyse antimicrobienne. Elle est influencée par la mode d'extraction qui est choisie en fonction des composés photochimiques à étudier. D'autres facteurs, comme le pH, la température, le rapport quantité de matière au volume du solvant, jouent également un rôle important dans cette procédure.

Cette étape consiste à extraire le maximum de molécules polyphénoliques contenues dans les parties de la plante étudiée en utilisant un solvant organiques (comme l'éthanol) mélangés avec de l'eau ou de l'eau uniquement. A la fin de l'extraction, la concentration de ces extraits est exprimée en milligramme d'équivalent de matière végétale sèche par ml d'extrait ml/mg. Dans notre travail, les méthodes d'extraction qui ont été utilisées sont les suivantes :

Macération du matériel végétal, broyé dans une solution hydro-alcoolique (éthanol/eau) à chaud. Généralement cette opération est répétée deux à trois fois pour extraire le maximum de principes actifs.

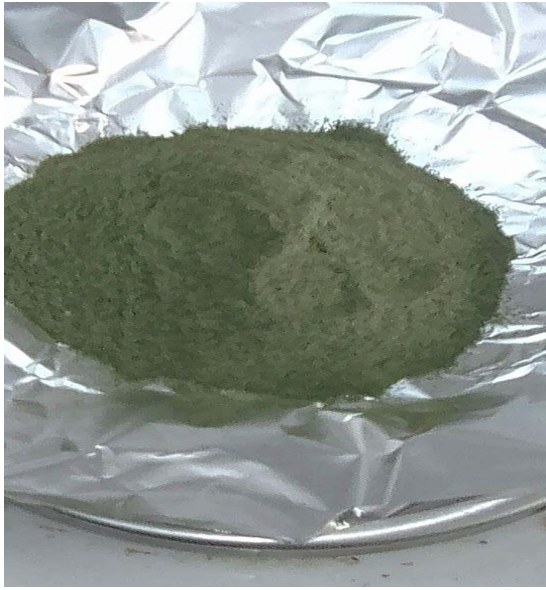
Macération de la poudre végétale dans l'eau chaude afin de tester l'efficacité des extraits couramment utilisés dans la médecine traditionnelle, puisque l'utilisation des plantes dans les préparations traditionnelles est faite dans l'eau.

- **Extrait aqueux**

Pour la préparation d'extrait aqueux, 10 g de la poudre végétale sèche additionnés de 100 ml d'eau distillée sont mis en agitation pendant 1h avec chauffage. Par la suite une macération pendant 24h à température ambiante à été réalisée. Le surnageant est récupéré puis filtré sur papier filtre Wattman numéro 3 (Figure 09). A la fin le filtrat obtenu est récupéré dans un flacon puis séché par évaporateur rotatif. Ces échantillons secs ont ensuite été conservés à 4°C, à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leur utilisation.

- **Extrait éthanolique**

L'extraction a été réalisée par macération à chaud de 10 g de la poudre végétal dans 100 ml d'un mélange hydro-alcoolique constitué de l'éthanol à 80% (éthanol/eau ; 8/2; v/v) sous agitation magnétique à chaude pendant 1 heure. Ce procédé empêche l'oxydation ou l'hydrolyse enzymatique. Le mélange à est laissé pendant ensuite à macérer durant 24 heures à une température ambiante au puis filtré sur filtre Whatman numéro 3. La macération permet la solubilisation des composés lipophiles et hydrophiles.

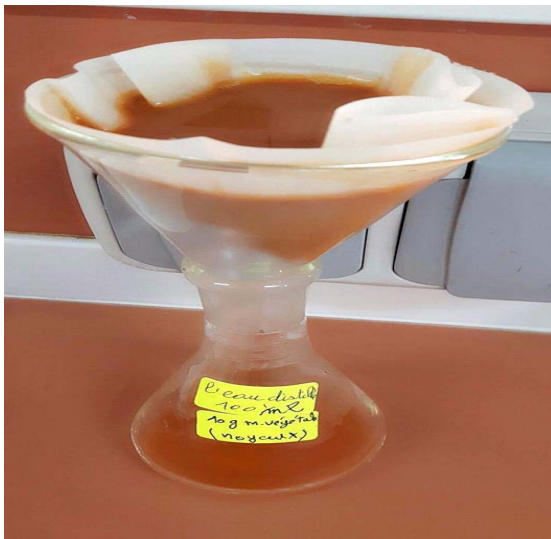


Feuilles



Noyaux

Figure 08: L'aspect des broyats



Noyaux



Feuilles

Figure 09 : Filtration des extraits après macération et récupération des filtrats

Les macéras filtrés forme l'extrait hydro-alcoolique brut. Ces derniers sont évaporés à sec sous pression réduite à 40°C au Rota vapeur (Figure 11).

II.5. Evaporation

Les quatre solutions obtenues ont été évaporées à l'aide d'un évaporateur rotatif, ou rotavap (Figure 10) qui permet à éliminé le solvant sous vide. Le Protocol suivit est comme suit :

- Placer le macérât à évaporer dans le ballon d'évaporation ;
- Mettre ensuite le ballon d'évaporation sous rotation ;
- Ouvrir le robinet d'eau froide reliait au réfrigérant ;
- Fermer ensuite la vanne reliant le montage à la pression extérieure (vanne de fermeture) et faire le vide à l'intérieur de l'appareillage à l'aide d'une trompe à eau
- Si l'évaporation n'est pas assez rapide, plonger le ballon d'évaporation contenant le macérât à évaporer dans le bain marie d'eau chaude ;
- Procéder à l'évaporation jusqu'à disparition complète du solvant ;
- Ouvrir la vanne de fermeture pour remettre la pression atmosphérique à l'intérieur du dispositif ; Enfin, couper l'eau du réfrigérant et de la trompe à eau.

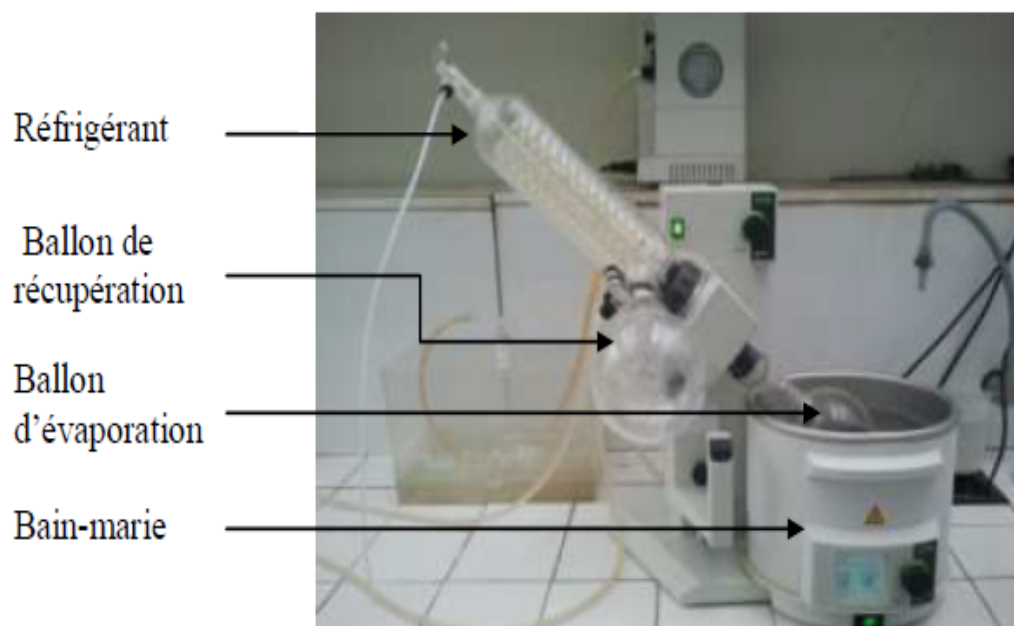


Figure 10 : évaporateur rotatif

II.6. Détermination du rendement d'extraction

Le rendement désigne la masse de l'extrait déterminée après évaporation du solvant, il est exprimé en pourcentage par rapport à la masse initiale de la plante soumise à l'extraction. Les extraits secs obtenus (aqueux et éthanoliques) sont pesés pour déterminer le rendement d'extraction en calculant la perte de poids en pourcentage de la matière sèche de départ [35].

$$\text{Rendement (\%)} = [P1 - P2 / P3] \times 100$$

Où :

P1 : Poids du ballon après évaporation ;

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide) ;

P3 : Poids de la matière végétale sèche de départ.

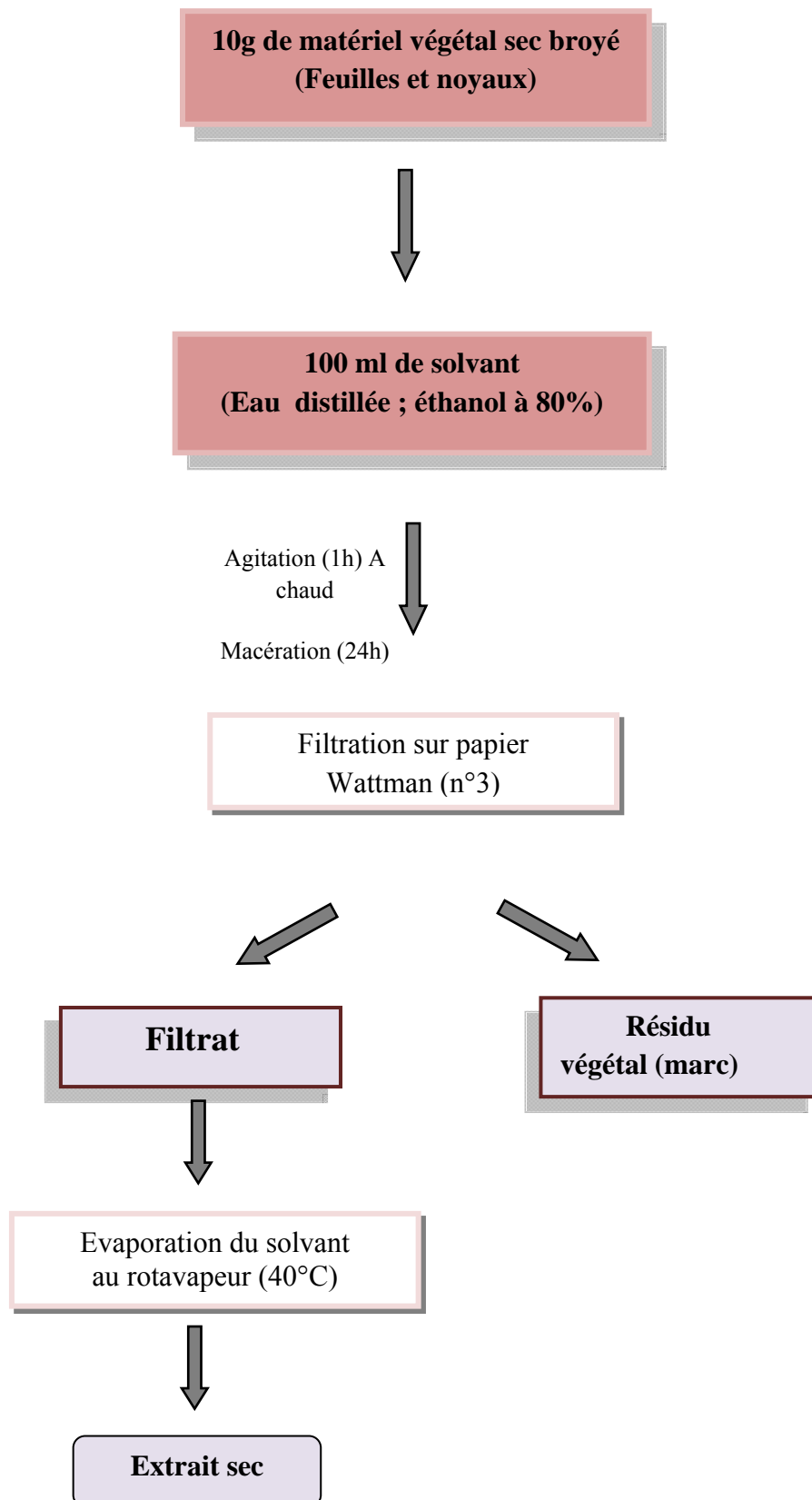


Figure 11: Protocole de préparation des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Persea americana*

L'extrait sec est pesé puis repris dans quelques millilitres d'eau (cas d'extrait aqueux) ou d'éthanol (pour l'extrait éthanolique) pour la préparation des extraits à déférente concentration pour l'évaluation, leur activité antifongique. Les échantillons ont été conservés à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

II.7. Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture utilisé pour l'étude de l'activité antifongique est le PDA (Potato Dextrose Agar ou pomme de terre glucosée et gélosée) acidifié. Une fois préparé, le milieu de culture a été stérilisé par autoclavage. Avant utilisation, le milieu est liquéfié puis coulé (environ 20 ml du milieu préparé dans chaque boîte de Pétri). La composition de ce milieu est mentionnée dans l'annexe.

II.8. Repiquage des souches

Le PDA est le milieu de culture utilisé pour l'entretien des souches fongique. des espèces moisissure ont été récupérer dans le tube incline contenant dans le milieu (PDA) conservées à 4°C. Le repiquage des souches se fait par prélèvement d'un fragment de colonie pour les quatre espèces d'*Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. carbonarius*) à l'aide d'une anse de platine stérilisée. Ce fragment est déposé au centre d'une boîte Pétri contenant le milieu PDA. Le repiquage se fait aseptiquement devant le du bec Bunsen .

L'observation des champignons filamenteux se fait Après 7 jours d'incubation à 28°C et repose essentiellement sur l'analyse des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques.

II.9. Préparation des suspensions

En générale, L'évaluations activités antimicrobienne implique l'emploi de concentrations fixes de l'inoculum de la souche cible. Les souches à tester (isolats purs) qui ont été mises en culture sur milieu PDA pendant 7 jours à 25°C. Après incubation ces boîtes de Pétri contenant les ont été utilisées pour la préparation des suspensions microbiennes dans l'eau distillée stérile additionnés du tween 80.

A partir de chaque isolat fongique une suspension à été préparée à l'aide d'un spectrophotomètre de telle sorte à avoir une concentration finale d'environ 10^6 spore/ml correspondant à une DO située entre 0,08 et 0,12 à 530 nm.

II.10. Evaluation de l'activité antifongique

Pour effectuer le test antifongique, nous avons adopté la méthode de diffusion en puits. Les germes cibles ont été inoculés sur des boîtes de Pétri de 9cm de diamètre, contenant le milieu PDA à raison de 100 μ L/boîte. Par la suite, à réalisé aseptiquement des puits qui ont été remplis par 100 μ l des extraits à tester à différentes concentrations (Figure 12). Les boîtes de Pétri préparées ont été maintenues pendant 2 heures à + 4 °C afin de permettre la diffusion radiale de l'agent inhibiteur. Une incubation de 72h heures à 28 °C est ensuite effectuée afin de permettre le développement des moisissures. En fin d'incubation, on observe les zones d'inhibition autour des puits pour les différentes souches sélectionnées vis-à-vis des germes cibles testés.

L'effet des extraits se traduit par l'apparition autour de disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance. La lecture de l'activité inhibitrice se fait par la mesure des diamètres d'inhibition autour du puits, exprimée en millimètres. Plus le diamètre de cette zone est grand plus la souche est sensible.

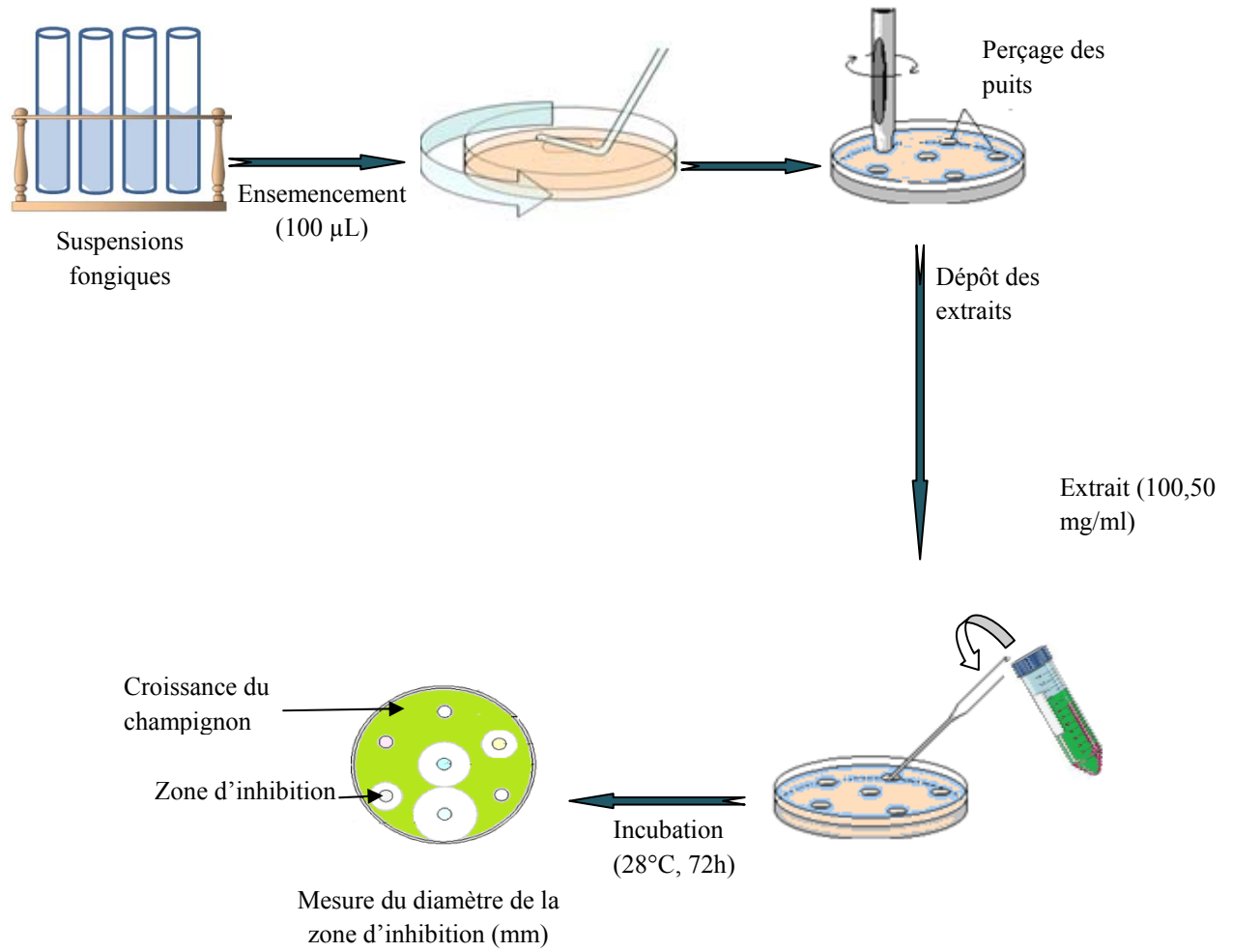


Figure 12: Schéma des différentes étapes de la réalisation du test antifongique

III. Résultats et discussion

Persea americana est une plante médicinale de la famille des *Lauraceae*, elle est utilisée dans la médecine traditionnelle pour traiter les troubles digestives, la diarrhée, le rhumatisme. Dans notre travail, l'effet antifongique des extraits aqueux et éthanoliques de cette plante sur quatre espèces aspergillaires (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius* et *A. fumigatus*) a été étudié.

III.1. Taux d'humidité

La première étape de ce travail a été le calcul du taux d'humidité de la matière végétale utilisée. Le poids des feuilles et des noyaux obtenus après séchage est de 52,94 g et 57,47g respectivement. Ces valeurs correspondent à des taux d'humidité de 47,06% pour les feuilles et de 42,53% pour les noyaux (Tableau 4). On constate donc que plus de la moitié du poids frais de ces parties est constituée d'eau.

Cependant une légère différence est notée. Les feuilles sont caractérisées par un taux d'humidité plus élevé par rapport aux noyaux. Il a été démontré que plusieurs facteurs pourraient influencer la teneur en eau et en matière sèche des plantes comme l'espèce végétale, La partie de la plante, l'âge des plantes, la nature du sol et la durée de conservation du végétal après récolte.

Tableau 4 : Taux d'humidité dans les feuilles et les noyaux de *Persea americana*

Partie de la plante	Poids avant séchage (g)	Poids après séchage (g)	Taux d'humidité (%)
Feuilles	100	52,94	47,06
Noyaux	100	57,47	42,53

III.2. Rendement des extractions

La préparation des extraits à partir des feuilles et des noyaux de *Persea americana* a été effectuée par des solvants polaires ; il s'agit de l'eau et l'éthanol.

Les extraits obtenus étaient caractérisés par un aspect pâteux de couleur verte pour les feuilles et marron pour les noyaux.

Le rendement a été déterminé par rapport au poids du matériel végétal sec broyé, les résultats ont été exprimés en pourcentage. Les rendements des extraits aqueux, préparés à partir des feuilles et des noyaux sont respectivement de 11,3% et 10,5% du poids sec. Dans les extraits hydro-éthanolique des taux plus élevés ont été obtenus avec un pourcentage de 20,5% dans les feuilles et de 23,2% dans les noyaux (Tableau 5).

D'après les résultats obtenus, le mélange éthanol/eau s'avère être un très bon solvant d'extraction par rapport à l'eau distillée, car en plus d'avoir donné un rendement plus élevé, son évaporation lors du séchage était plus rapide, En effet, l'éthanol est connu pour être un bon solvant pour l'extraction des principes actifs en générale et des composés phénoliques en particulier.

En outre, on remarqué une légère variation dans les taux de rendement. Cette différence pourrait aussi être due à la différence dans la nature des composés chimique (phénoliques) retrouvées dans les différentes parties de la plante. La variabilité dans les polarités des solvants d'extraction influence la solubilité des constituants chimiques d'un échantillon ainsi que le rendement d'extraction [36].

Le rendement de l'extraction varie en fonction de l'espèce végétale et de son contenu en métabolites secondaire de l'organe utilisé dans l'extraction, des conditions de séchage et de la nature du solvant utilisé dans l'extraction.

Il faut cependant noter que les résultats obtenus dans la présente étude ce qui concernant les rendements des extraits hydro-éthanoliques et aqueux issus des feuilles et des noyaux de *Persea americana* sont caractérisés par des valeurs de rendement très proches (Tableau5). Ce qui nous laisse supposé que de ces composés se trouvent à des taux presque identiques dans les différentes parties de la plante étudiées (feuille et noyaux).

Tableau 05 : Couleur et rendement de différents extraits secs de *Persea americana*

Partie de la plante	Extraits	Aspect	Couleur	Rendement (%)
Feuilles	Aqueux	Pâteux	vert	11,3
	Ethanolique	Pâteux	Vert foncée	20,5
Noyaux	Aqueux	Pâteux	Marron claire	10,5
	Ethanolique	Pâteux	Marron foncée	23,2

III.3. Observation macroscopique et microscopique des *Aspergillus*

L'observation macroscopique des colonies d'*Aspergillus* montre un aspect granuleux à poudreux (en raison de la production importante des conidies) de couleur variable selon l'espèce (*A. flavus*, *A. parasiticus* ont une couleur verte, pour *A. carbonarius* noire et *A. fumigatus* bleu verte)

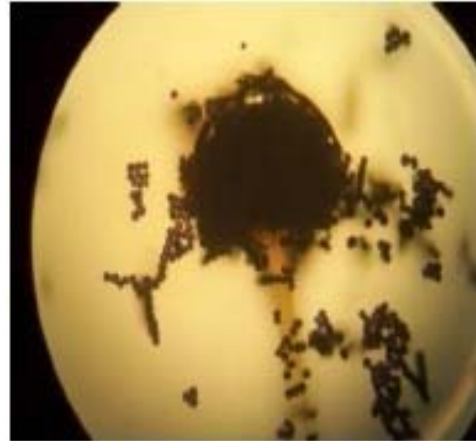
L'observation microscopique de ce genre montre la présence des têtes aspergillaires (Figure 13). Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés non cloisonnés appelés conidiophores. Ces conidiophores se terminent par une vésicule de forme variable en fonction d'espèce sur laquelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. L'ensemble vésicule-phialides-conidies constitue l'organe de fructification appelé tête aspergillaires.

III.4. Activité antifongique

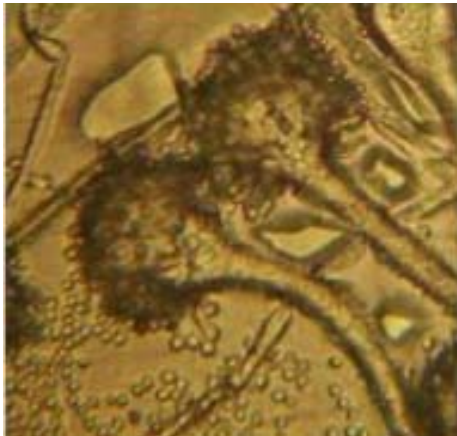
Nous avons effectué un criblage de l'activité antimicrobienne sur 4 souches fongiques dont, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus fumigatus*. Ces moisissures sont pathogènes pour les plantes et provoquent de graves pertes économiques. Chez l'homme, ces moisissures peuvent être la cause de l'apparition des aspergilloses.



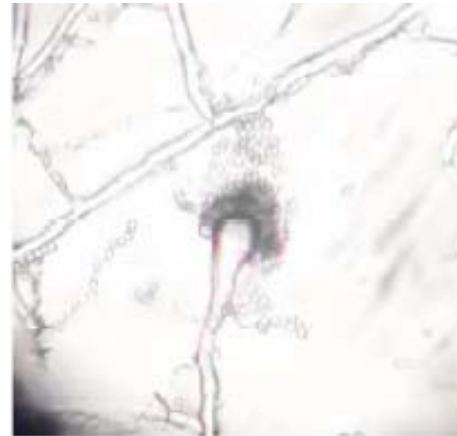
Aspergillus flavus



Aspergillus carbonarius



Aspergillus parasiticus



Aspergillus fumigatus

Figure 13 : Aspects microscopiques (Gx100) des espèces aspergillaires testée, après culture sur milieu PDA.

L'activité antifongique des extraits de la plante étudiée a été basée sur la méthode de diffusion en milieu PDA. L'évaluation de l'effet inhibiteur des extraits testés sur les souches fongiques est exprimée par le diamètre de la zone d'inhibition.

III.4.1. Extraits aqueux

Les résultats obtenus concernant l'activité antifongique des extraits aqueux sont représentés dans (Tableau 06). Avec les extraits des feuilles, l'activité antifongique est uniquement observée chez *A. Flavus*. Le diamètre d'inhibition pour les deux concentrations étudiées qui sont de 50 et de 100 mg/ml sont de 13mm et de 20mm respectivement. Les autres espèces (*A. parasiticus*, *A. carbonarius* et *A. fumigatus*) étaient en revanche insensible aux extraits aqueux obtenus à partir des feuilles et ce quelque soit les concentrations.

D'autre part, on a noté que nos extraits aqueux obtenus à partir des noyaux exercent des effets plus importants sur la croissance des germes étudiés en comparaison avec les extraits des feuilles.

Une relation dose-effet a été également observée. L'intensité de ces effets varie en fonction de la concentration et des germes ciblés. En effet, avec une concentration de 50 mg/ml aucune zone d'inhibition n'a été observée pour les souches d'*A. parasiticus* et *A. carbonarius*. Cependant, lorsqu'on a augmenté la concentration à 100 mg/ml, des zones d'inhibition ont été observées chez toutes les souches testées avec un maximum d'inhibition de 21 mm chez *A. flavus* (Figure 14).

Les souches d'*A. Parasiticus*, *A. carbonarius* et *A. fumigatus* sont moins sensibles aux extraits aqueux des noyaux et ont montré des activités presque similaires avec des diamètres d'inhibition respectifs de 14 mm, 16 mm et 18 mm avec la concentration de 100 mg/ml.

L'activité antifongique d'un extrait dépend de sa composition en principe actif. Plusieurs travaux ont rapporté les profils phytochimiques des extraits aqueux de *Persea americana*. Dans une étude précédente, Kristanty ont montré la présence des alcaloïdes, des flavonoïdes, des glycosides, des saponines et des polyphénols dans leurs extraits. Ces molécules sont responsables des activités antimicrobiennes des végétaux.

Les extraits aqueux de *Persea americana* ont déjà fait l'objet de nombreuses études et on indiqué un pouvoir antibactérien satisfaisant [37,38] Cependant, peu de travaux se sont

intéressés à l'étude de l'activité antifongique des extraits aqueux sur les moisissures et plus précisément sur les *Aspergillus*.

Tableau 06 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits aqueux des feuilles et des noyaux de *Persea americana*

Souches fongiques testées	Extraits aqueux			
	50 mg/ml		100 mg/ml	
	Feuilles	Noyaux	Feuilles	Noyaux
<i>A. flavus</i>	13	18	20	21
<i>A. parasiticus</i>	-	-	-	14
<i>A. carbonarius</i>	-	-	-	16
<i>A. fumigatus</i>	-	14	-	18

–: absence de l'activité.

L'effet des extraits aqueux des feuilles de *Persea americana* sur certaines moisissures de stockage (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum* et *Rhizopus stolonifer*) a été précédemment étudié. Les résultats obtenus ont montré une inhibition de la croissance mycélienne des *Aspergillus flavus* et *Rhizopus stolonifer*, mais dans le cas d'*Aspergillus niger* et *Penicillium expansum*, la sensibilité vis-à-vis des extraits aqueux n'était pas importante [38].

Ces observations sont en accord avec nos résultats car comme on peut le constater dans le Tableau 06, *Aspergillus flavus* est la seule espèce ayant montré une sensibilité vis-à-vis des extraits aqueux des feuilles.

III.4.2. Extraits éthanoliques

Les résultats des activités antimicrobiennes des extraits éthanoliques issues des feuilles et des noyaux de *Persea americana* sont illustrés dans le (tableau 07).

En ce qui concerne les extraits des feuilles, on a noté que pour une concentration de 50 mg/ml aucune des souches fongiques testées n'a été sensible. Par contre, en augmentant la concentration à 100 mg/ml, des zones d'inhibition ont été enregistrées chez *A. flavus* et *A. fumigatus* avec des diamètres respectifs de 12 mm et 11 mm. Cette différence de

sensibilité peut être due aux différences physiologiques des souches ou le type des souches (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. carbonarius* et *A. fumigatus*).

On a aussi remarqué que les extraits hydro-éthanoliques obtenus à partir des noyaux sont pourvus d'un effet inhibiteur très important sur toutes les souches testées quelque soit les concentrations utilisées. L'importance d'inhibition peut être expliquée par la sensibilité de chaque souche vis à vis des différentes concentrations testées. A une concentration de 100 mg/ml, ces extraits exercent une activité très importante sur *A.flavus* et *A.fumigatus* avec des diamètres d'inhibition de 31 mm et 26 mm respectivement.

Les souches d'*A. Parasiticus* et *A. carbonarius* ont montré une sensibilité moindre avec des zones d'inhibitions similaires de 21 mm et 20 mm respectivement. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues avec les extraits aqueux et indiquent donc un meilleur pouvoir antifongique vis-à-vis des espèces aspergillaires étudiées.

Dans une récente étude réalisée par Evbuomwan et Inetianbor, (2017) le screening phytochimique de *Persea americana* a montré la présence de nombreux métabolites secondaires tels que, les flavonoïdes, les glycosides cardiaques, les terpenoïdes, les saponines, les alcaloïdes et les stéroïdes dans les extraits aqueux et éthanoliques obtenus à partir des feuilles. Cela explique l'activité antimicrobienne de ces extraits [37].

D'autre part, l'étude de l'activité antibactérienne des extraits aqueux et alcooliques par ces mêmes auteurs a révélée un effet plus important des extraits éthanoliques par rapport aux extraits aqueux. Ces observations sont en accord avec nos résultats puisqu'on a remarquée l'apparition des zones d'inhibitions plus grandes avec les extraits hydro-alcooliques.

Boadi et al. 2015 ont rapporté la présence des glycosides, des alcaloïdes, tannins, saponines, flavonoïdes, terpenoïdes et des stéroïdes dans les feuilles de l'avocatier et ont mis en évidence l'effet antibactérien des feuilles de *Persea americana*. La présence de ces composés Phytochimique indique clairement l'importance médicinale et pharmaceutique de cette plante [39].

Il est important de souligner que la méthode utilisée (le choix des solvants), ainsi que les conditions dans lesquelles l'extraction est effectuée (à chaud ou à froid), affectent tous le contenu total en phénols et flavonoïdes, et par conséquent affecte les activités biologiques médiées par ces métabolites.

En effet, au cours d'un travail réalisé par Idris et al. (2009), différents solvants ont été utilisés (méthanol, éthyl acétate, chloroforme, éther de pétrol). Leur résultats ont montré que la composition des extraits était variable selon la nature du solvant [36]. Ces auteurs ont remarqué une absence des carbohydrates, des flavonoïdes, des tanins et des glycosides cardiaques dans les extraits obtenus en utilisant le chloroforme et l'éther de pétrol comme solvant d'extraction.

Au cours de notre travail, on a constaté que l'intensité de l'effet inhibiteur sur la croissance des germes, varie en fonction de partie de la plante étudiée mais aussi en fonction de la nature du solvant utilisée. Selon les résultats obtenus, les extraits éthanoliques sont plus actifs que les extraits aqueux. Cette différence peut être à l'origine de la composition chimique différente entre les deux extraits, l'alcool permettant une meilleure extraction de composés moins polaires comme les flavonoïdes isolés de *Persea americana*.

Tableau 07 : Diamètre (mm) des zones d'inhibition des différents extraits éthanoliques

Des feuilles et des noyaux de de *Persea americana*

Souches fongiques testées	Extraits alcooliques			
	50 mg/L		100 mg/L	
	Feuilles	Noyaux	Feuilles	Noyaux
<i>A. flavus</i>	-	23	12	31
<i>A. parasiticus</i>	-	16	-	21
<i>A. carbonarius</i>	-	18	-	20
<i>A. fumigatus</i>	-	22	11	26

—: absence de l'activité.

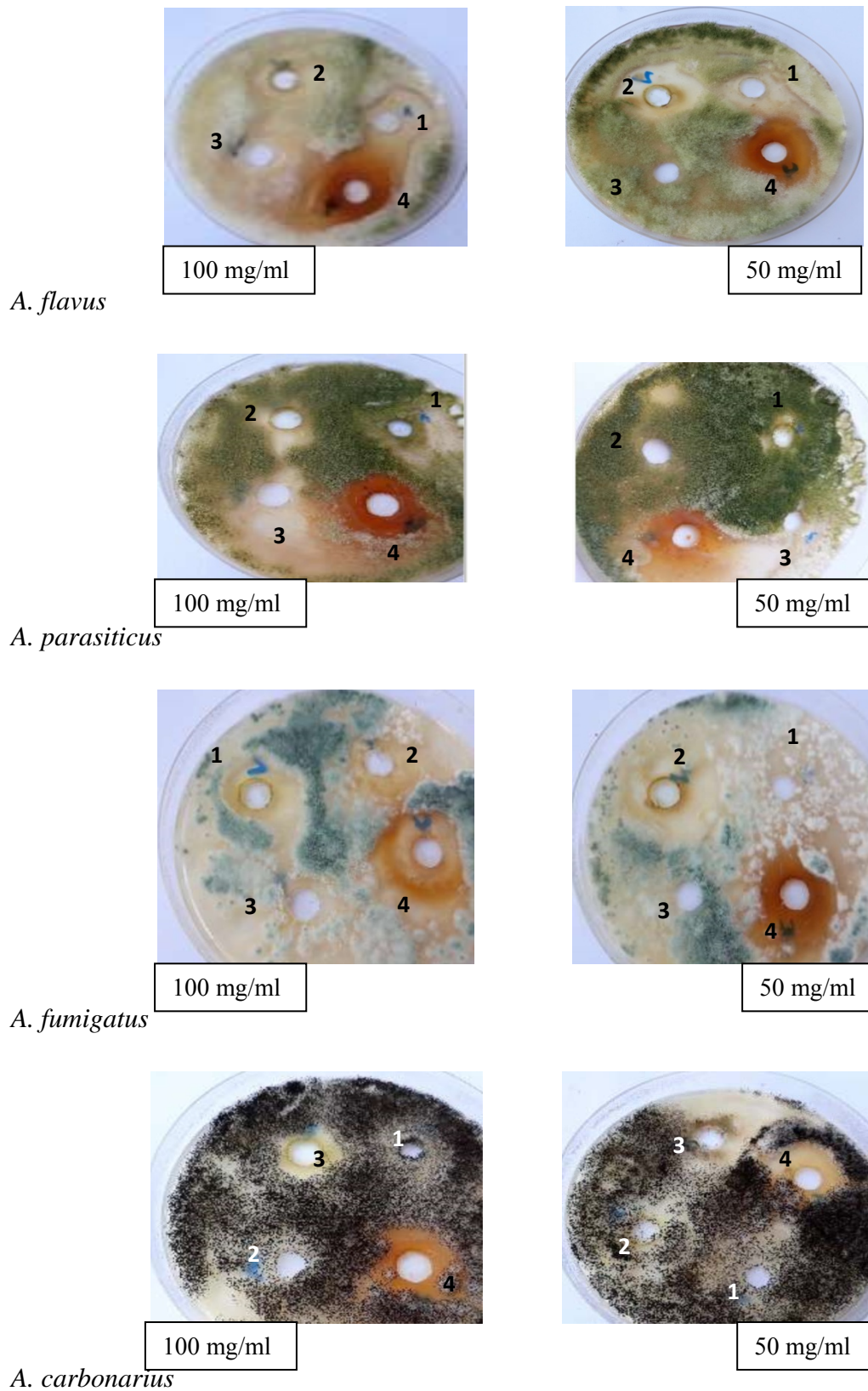


Figure 14 : Activité antifongique des différentes concentrations des extraits aqueux et hydro-éthanolique de *Persea americana* vis-à-vis des espèces aspergillaires testées.

Les composés phénoliques sont produits en réponse à l'infection microbienne par les plantes. Par conséquent, l'efficacité de ces substances évaluées in vitro ont montré une action inhibitrice sur les microorganismes. Cependant, l'activité antimicrobienne des extraits ne dépend pas uniquement des composés phénoliques mais, aussi de la présence de différents métabolites secondaires à effet antifongique tels que les stéroïdes, les saponosides...etc.

La plupart des travaux réalisée sur *Persea americana* décrivent l'activité antibactérienne de cette plante. Cependant, peu de travaux se sont intéressés à l'activité antifongique. A ce titre, Melgar et al. (2018) ont prouvée un effet antifongique des extraits hydro-éthanoliques des noyaux de l'avocatier collectés au niveau des supermarchés en Espagne sur de nombreuses souches (*Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium ochrocloron*, *Penicillium verrucosum*). Ces résultats sont semblables à ceux obtenus dans notre travail qui montre la sensibilité des espèces aspergillaires vis-à-vis des extraits testés [40].

Conclusion et Perspectives

Un grand nombre de plantes médicinales contiennent des composés chimiques ayant des propriétés antifongiques. Plusieurs travaux de recherche se sont focalisés sur les extraits des plantes.

Notre travail s'est orienté sur l'étude de l'effet antifongique d'extrait de *Persea americana*. L'activité antifongique des extraits de la plante étudiée basée sur la méthode de diffusion en milieu PDA nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique des extraits vis-à-vis des souches *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus fumigatus*.

L'activité antifongique des extraits aqueux est uniquement observée chez *A. flavus*, pour les deux concentrations étudiées qui sont de 50 et de 100 mg/ml. Par contre l'extrait éthanolique l'activité antifongique s'est avéré chez *A. flavus* et *A. fumigatus*, notamment avec une concentration à 100 mg/ml.

D'autre part, on a noté que nos extraits aqueux obtenus à partir des noyaux exercent des effets plus importants sur la croissance des germes étudiés, notamment avec une concentration de 100 mg/ml. Les souches d'*A. Parasiticus*, *A. carbonarius* et *A. fumigatus* sont moins sensibles aux extraits aqueux des noyaux. Mais pour l'extrait éthanolique des noyaux sont pourvus d'un effet inhibiteur très important sur toutes les souches testées quelque soit les concentrations utilisées.

Enfin, nos résultats indiquent que l'extrait étudié montre des bonnes activités antifongiques, capable de réduire la croissance mycélienne responsable d'altérations chez l'avocatier. Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies (tests antioxydants, détermination de la concentration minimale inhibitrice des souches fongiques, coût, essai sur d'autres souches microbiennes, etc.).

En perspectives il serait intéressant de compléter ce travail par :

- ✓ Entreprendre d'autres travaux sur d'autres principes actifs de la plantes (huiles essentielles, alcaloïdes...etc)

- ✓ Tester l'activité antifongique de cette plante sur d'autres espèces fongiques *Fusarium*, *Penicillium*.
- ✓ Etudier le pouvoir de cette plante sur la production des aflatoxine chez *Aspergillus flavus* vu l'effet antifongique, important obtenu chez cette espèce.
- ✓ Evaluer l'activité antibactérienne de cette plante en particulier sur certaines bactéries résistantes.
- ✓ Faire des analyses chromatographiques.

Références bibliographiques

1. Sanagor., 2006. Le rôle des plantes médicinales en médecine traditionnelle. Université Bamako(Mali): 53.
2. Ameenah G. F., 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow Molecular Aspects of Medicine, 27:1-93.
3. Yakhlef G., 2010 - Etude de l'activité biologique des extraits de feuilles de *Thymus vulgaris* L. et *Laurus nobilis* L. Thèse Magister. Université El Hadj Lakhdar –Batna, p78.
4. Akroum S., 2011- étude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Thèse doctorat physio-toxicologie univ Mentouri de Constantine. p1.
5. Mohammedi Z., 2013 - Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. P 84
6. Amann C, Amann G, al. (2008). *Plantes de Mayotte*. Naturalistes de Mayotte. Le fruit est une baie, composée d'une seule grosse graine.
7. L'avocatier, Maisonneuve et Larose, 1994
8. Mohammad Yasir, Sattwik Das, and M. D. Kharya The phytochemical and pharmacological profile of *Persea Americana* Mill. v.4 (7); Jan-Jun 2010
9. L'avocat, un désastre écologique pour le Mexique, 2017
10. journal d'agriculture traditionnelle et de botanique appliquée, 101-106, .1924
11. Karra, Geuit. Biologie florale en Algérie.
12. Leonard, Lewis Y and Pierre G. Sylvain. 1931. Traité de Culture Fruitière. Ensemble des Ouvrages Universitaires. Publie sous la Direction du Service Technique du Département de L'Agriculture et de L'Enseignement Professionnel. République D'Haiti. Port-au-Prince. 303 pages. (Avocado excerpt pp 237-253)
13. Pérez Álvarez, S., Ávila Quezada, al. (2015). Review Avocado (*Persea Americana* Mill). *Cultivos Tropicales*, 36(2), 111–123. <http://doi.org/10.13140/RG.2.2.19879.55200>
14. Zheng Y., Wang M., al, *composition nutritionnelle des aliments Ciqual (2017) – ANSES*.
15. Justina Y. Talabi1, Olukemi A.al, Nutritional and antinutritional compositions of processed Avocado (*Persea Americana* Mill) seeds. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 2016, 6(2):6-12
16. (Guzmán-Rodríguez JJ, López-Gómez R, Suárez-Rodríguez LM, Salgado-Garciglia R, Rodríguez-Zapata LC, Ochoa-Zarzosa A, López-Meza JE. Antibacterial activity of

defensin PaDef from avocado fruit (*Persea Americana* var. *drymifolia*) expressed in endothelial cells against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biomed Res Int.* 2013;2013:986273

17. (Rodríguez-Carpena JG, Morcuende D, Andrade MJ, Kylli P, Estévez M. Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. *J Agric Food Chem.* 2011 May 25;59(10):5625-35
18. A Review on *Persea Americana* Mill. (Avocado) - Its Fruit and Oil.(India). *International Journal of PharmTech Research* , Vol.8, No.6, pp 72-77, 2015
19. Heloiza Diniz Nicolella, Francisco Rinaldi Neto,ol , Toxicogenetic study of *Persea americana* fruit pulp oil and its effect on genomic instability. *Food and Chemical Toxicology* (2017).
20. Bruno Melgara, b, Maria Inês Dias, al, bioactive characterization of *Persea Americana* Mill. by-products: A rich source of inherent antioxidants
21. Fábio Tomio Yamassaki, Lucianow Henrique Campestrini,al, (2017) Avocado leaves: Influence of drying process, thermal incubation, and storage conditions on preservation of polyphenolic compounds and antioxidant activity, *International Journal of Food Properties*, 20:sup2, 2280-2293.
22. Aurélie LECCELLIER, (2013) Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle.194
23. Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S. (1993). *Airworth and Bishys Dictionary of the Fungi* (8 Th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.
24. Khadija LAMRANI. (2009). Étude de la biodiversité des moisissures nuisibles et utiles isolées à partir des Maâsra du Maroc.193.
25. Kachour Leila. (2005). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité, Mémoire de magister en microbiologie de l'environnement .université baji mokhtar Annaba.
26. Giraud J. (1998).*Microbiologie alimentaire* .p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris
27. Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996). *Introductory Mycology* (4 Th Ed). P: 868. New York, USA.
28. Raper K.B. & Fennell. (1965). the genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176.

29. Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p : 34-428.
30. Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. (2002). Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
31. Morin O. (1994). *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encycl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.
32. Smith J.E., Pateman J.A. (1977). Genetics and Physiology of *Aspergillus*. Academic press. London.
33. Doymaz L, Gorel O.al, 2004.Drying.characterctics of the solide by product of olive oil extraction .Biosystems engineering.88, 213-219.
34. Rihane K et Benlaharche R. (2013) activité antibactérienne des polyphénols et flavonoïdes d'extraits à partir deux plantes médicinales : artémisia herba albaet ocimum basilicum sur Escherichia coli et staphylococcus aureus. *Mémoire de master* université mentouri constantine.
35. Idris S, Ndukwe GI, Gimba CE. 2009. Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activity of seed extracts of *Persea Americana* (avocado pear). *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. 2(1):173 – 176.
36. Evbuomwan Lucky, Inetianbor Jonathan. 2017. Antibacterial Activity of *Persia Americana* Leaf Extracts against Multidrug Resistant Bacterial Isolates. *AASCIT Journal of Bioscience*. 3(4), 29-34.
37. Onyeani CA, Osunlaja SO, Oworu OO, Joda AO. Evaluation of Effect of Aqueous Plant Extract in the Control of Storage Fungi. 2012. *International journal of scientific & technology research*. 1(6): 76-79.
38. Bruno Melgar, Maria Inês Dias, Ana Ciric, Marina Sokovic, Esperanza M. Garcia-Castello, Antonio D. Rodriguez-Lopez, Lillian Barros, Isabel C.R.F. Ferreira. 2018. Bioactive characterization of *Persea Americana* Mill. By-products: A rich source of inherent antioxidants. *Industrial Crops and Products*. 111 : 212-218.
39. Nathaniel Owusu Boadi, Selina Ama Saah, John Kenneth Mensah, Mercy Badu, Sylvester Addai-Arhinand and Michael Baah Mensah. 2015. Phytoconstituents, antimicrobiDtuartal and antioxidant properties of the leaves of *Persea Americana* Mill cultivated in Ghana. *Journal of Medicinal Plants Research*. 9(36), 933- 939.

ANNEXE

I. Matériel et produits chimiques

Matériel

Agitateur magnétique chauffant (Stuart).

Autoclave (SYSTEC).

Bain-marie (NIVE).

Balance (KERN).

Etuves (VETICELL).

Évaporateur rotatif (MICROVAP).

Micropipettes (20-200µl/ 100- 1000µl).

Mixeur (Moulinex, France).

PH-mètre (Corning- EEL modèle 109).

Vortex (stuart).

Boîte Pétri

Pipette pasteur

Anse de platine

Becher

Barreau magnétique

Entonnoir

Papier wattman

Ballon

Les solvants et produits chimiques

Éthanol (C₂H₅OH).

Agar agar (Difco, Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

D(+)-Glucose anhydre (Fluka, Saint Quentin Fallavier, France).

Acide chlorhydrique (HCl)

Tween 80 (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France).

Milieux de culture

PDA (Potato, Dextrose, Agar)

Pomme de terre200 g

Agar15 g

D-glucose20 g

Eau distillée1000 ml

PH final $5,6 \pm 0,2$

En fin de préparation le milieu de culture est autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

Résumé :

L'objectif de ce travail a été l'évaluation de l'activité antifongiques des extraits aqueux et hydroéthanoliques des feuilles et des noyaux de *Persea americana*. L'extraction par l'eau et a donné des rendements importants de à 11.3 % et 10.5% respectivement. L'utilisation de l'éthanol comme solvant a permis de donner des rendements supérieurs de 20.5 % dans les feuilles et 10.5 % dans les noyaux.

Différentes concentrations de ces extraits ont été testées sur 4 souches fongiques (*A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.carbonarius*, *A. fumigatus*). Les résultats obtenus ont révélé la présence d'un pouvoir antifongique dans chacune des parties de la plante. La plus forte activité a été enregistrée dans les extraits hydroéthanoliques des noyaux. Les feuilles par contre ont montré un effet antifongique moins important.

Cette recherche a montré une forte potentialité antifongique des cette plante surtout contre *A.flavus*. Ce qui indique que cette dernière pourrait être considérée comme étant un agent antifongique pouvant constituer une source potentielle de lutte contre certaines moisissures de stockage.

Mots clés : antifongique, *Persea Americana*, *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.carbonarius*, *A. fumigatus*.

Abstract :

The aim of this work was the evaluation of the antifungal activity of aqueous and hydroethanolic extracts obtained from leaves and kernels of *Persea americana*.

Extraction by water showed significant yields of 11.3 %and 10.5% in leaves and kernels respectively. The use of ethanol as extraction solvent gave higher yields of 20.5 % in leaves and 23.2 % in kernels.

Different concentrations of these extracts were tested on 4 fungal strains (*A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.carbonarius*, *A. fumigatus*). The results revealed that each part of the plant was characterized by an antifungal activity. The highest activity was recorded in the hydroethanolic extracts of the kernels. The leaves instead showed a lower antifungal effect.

This research has shown the strong potential of this plant as an antifungal agent especially against *A.flavus*. This indicates that it could be considered as an antifungal agent that could be used as a potential source of control of against some storage molds.

Keywords : antifungal, *Persea Americana*, *A.flavus*, *A.parasiticus*, *A.carbonarius*, *A. fumigatus*

تلخيص :

كان الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للفطريات في المستخلصات المائية والهيدروإيثانولية من أوراق و نواة بيرسا أمريكانا. الاستخراج بالماء أظهر عائداً كبيرة من 11.3% و 10.5% في الأوراق والنواة على التوالي. أسفر استخدام الإيثانول كمذيب عن إعطاء نتيجة أعلى. قدرت بـ 20.5% في الأوراق و 23.2% في الثمار.

تم اختبار تركيزات مختلفة من هذه المستخلصات على 4 سلالات فطرية (أ.فلافوس، أ.بارازيتيكوس، أ.كاربوناريوس، أ.فوميغاتوس). النتائج التي تم الحصول عليها كشفت عن وجود قوة مضادة للفطريات في كل جزء من النبات (أوراق ونواة). تم تسجيل أعلى نشاط في مستخلصات هيدروإيثانول من النواة. الأوراق، من ناحية أخرى، أظهرت تأثير مضاد أقل أهمية.

ظهر هذا البحث إمكانات مضادة للفطريات قوية لهذا النبات خاصة ض أ.فلافوس. وهذا يشير إلى أن هذا الأخير يمكن اعتباره كعامل مضاد للفطريات قد يكون مصدرًا محتملاً لمحاربة التعفن الناجم عن التخزين.

الكلمات المفتاحية: مضاد للفطريات، بيرسا أمريكانا، أ.فلافوس، أ.بارازيتيكوس، أ.كاربوناريوس، أ.فوميغاتوس