



Université Ibn Khaldoun – Tiaret  
Faculté des Sciences de la nature et de la vie  
Département Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master académique  
Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Ecologie et environnement  
Spécialité : Agro-écologie

Presenté par :  
Chabi Lidya  
Kardi Hafidha

Thème

**Valorisation de la flore locale dans l'obtention de produits  
à haute valeur ajoutée cas de figuier de barbarie  
(*Opuntia ficus indica*)**

Soutenue le : 12/ 07 / 2021

Devant le jury composé de :

Président            Mr. HASSANI Abdelkrim  
Promoteur            Mr. BOUFARES Khaled  
Examinatrice        Mme. MOULAY Meriem

Année universitaire 2020 - 2021

## **Remerciements**

*Avant toute chose, nous tenons à remercier **Dieu** le tout puissant, pour nous avoir donné le courage et la volonté d'achever ce modeste travail et nos grands salut sur le premier éducateur notre*

*Prophète **Mohammed**.*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos profondes gratitudee au notre encadreur Mr. BOUFARESS K pour son encadrement fructueux, ses précieux conseils, sa disponibilité et sa gentillesse et ses directives le long de la réalisation de ce travail.*

*(Que dieu vous garde, vous protège et vous donne plus).*

*Nous tenons également à exprimer nos sincères remerciements aux nombres de jury, les présidents Mr. Hassani et l'examinatrice Mdm. Moulay pour avoir accepté d'examiner notre travail et d'assister à notre soutenance.*

*Nous tenons particulièrement remercier les responsables des laboratoires de biochimie, microbiologie et physiologie pour sa collaboration enrichissante pour ses précieux conseils durant la réalisation de ce travail.*

*Enfin, nous remercions tous les enseignants et les techniciens de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université d'ibn Khaldoun de Tiaret.*

## Dédicace

*Je tiens vivement, à dédier ce travail en signe de respect et de reconnaissance à deux personnes très chères qui ont partagé mes joies et mes peines, qui ont été toujours à mes côtés, qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

*A mon père « Khaled » et ma chère mère « Djamila » sur qui j'ai pu compter et me ressourcer d'affection et de bénédictions durant tout ma vie.*

*A mes frères et mes sœurs pour leurs soutiens.*

*Je dédie aussi ce travail à mon cher grand père « Ahmad Chabi », même tu étais loin mais tu as toujours participé sur ma réussite, je te dis merci au fond du cœur.*

*A tous ceux e toutes celles qui m'ont accompagné et soutenue durant cette années de formations.*

*Lidya*

## Dédicace

*Je remercie Dieu qui m'a donné la foi et la volonté d'étudier  
et m'orienté dans le droit sentir.*

*Je remercie Dieu qui m'a aidé à élaborer ce modeste travail.*

*Que je dédie :*

*A mes chers parents, que Dieu tout puissant vous garde et  
vous procure santé, bonheur et longue vie*

*A mes frères « Mohamad » « Omar » « Yousef », et ma sœur  
« Fatíha ».*

*A la personne la plus cher à mon cœur, mon grand-père  
« Amer KARDI », paix a ton âme je souhaitais si tu as été  
parmi nous.*

*J'atteins ce succès grâce à tes prières, ton soutien au long de  
mon parcours universitaire.*

*A mes chers amis : « Djamel DJ », « Salem AIT ».*

*A tous les personnes que j'aime.*

*Hafidha*

<b>Liste des figures .....</b>	<b>i</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>ii</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>ii</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèse bibliographique .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre 01 : Généralité sur le figuier de barbarie.....</b>	<b>3</b>
1. Généralité sur le figuier de barbarie .....	3
1.1. Biologie du figuier de barbarie.....	3
1.2. Description morphologique .....	4
1.2.1. Fleurs.....	4
1.2.2. Fruits .....	4
1.2.3. Cladodes (ou raquettes) .....	5
1.2.4. Épines .....	5
1.3. Taxonomie.....	6
1.4. Physiologie de l’Opuntia et adaptation .....	7
1.5. Origine et distribution géographique .....	8
2. Principales vertus et intérêt industriel .....	9
2.1. Transformation biotechnologique .....	9
2.1.1. Biomasse.....	9
2.1.2. Vinaigre balsamique.....	9
2.1.3. Biocarburant .....	10
2.1.4. Produits agro-alimentaires .....	10
2.2. Produits cosmétiques et pharmaceutiques .....	11
3. Composition chimique du figuier de barbarie .....	12

4. Multiplication .....	12
<b>Généralité sur les milieux de culture .....</b>	<b>14</b>
<b>Chapitre 02 : Généralité sur les milieux de culture .....</b>	<b>14</b>
1. Généralité sur les milieux de culture .....	14
1.1. Définition des milieux de culture .....	14
1.2. Classification des milieux de culture .....	14
1.2.1. Classification d'après l'utilisation.....	14
1.2.1.a) Milieux usuels « de base » .....	14
1.2.1.b) Milieux d'isolement .....	15
1.2.1.c) Milieux différentiels .....	15
1.2.1.d) Milieux de conservation.....	15
1.2.2. Classification d'après la composition.....	15
1.2.3. Classification d'après le mode de stérilisation .....	16
1.2.3.a) Milieux autoclavables .....	16
1.2.3.b) Milieux non autoclavables .....	16
1.3. Principaux ingrédients des milieux de cultures .....	17
1.3.1. Pour les milieux solides.....	17
1.3.2. Pour les milieux liquides.....	17
<b>Partie expérimentale.....</b>	<b>20</b>
<b>Chapitre 01 : Matériel et méthodes .....</b>	<b>20</b>
1. Matériel .....	20
1.1. Matériel végétal .....	20
1.2. Matériel biologique.....	21
1.2.1. Souches bactériennes utilisés .....	21

1.2.1.a) Escherichia coli .....	21
1.2.1.b) Staphylococcus aureus .....	21
1.2.1.c) Fusarium oxysporum.....	22
1.2.1.d) Aspergillus niger .....	22
1.2.2. Matériel de laboratoire .....	22
2. Principales etapes pour les essais in vitro .....	22
2.1. Préparation de la pate du milieu de culture de Figuier de Barberie .....	23
2.2. Préparation des milieux de culture.....	24
3. Analyse de la composition des milieux de culture crée .....	25
3.1. pH.....	26
3.2. Conductivité électrique .....	26
3.3. Cendres .....	26
3.4. Densité .....	27
4. Evaluation de l'efficacité des milieux de culture crée .....	27
4.1. Initiation et preparation des souches bacteriennes.....	28
4.2. Ensemencement bacterien .....	28
4.3. Ensemencement fongique.....	29
<b>Chapitre 02 : Résultats et discussion .....</b>	<b>30</b>
1. Analyses des propriétés physico-organoleptiques .....	30
2. Effet des différents milieux sur la croissance microbienne .....	32
2.1. Criblage de croissance bacterienne .....	32
2.2. Criblage de Croissance fongique .....	35
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>42</b>

## الملخص :

كان الهدف من العمل الذي تم تنفيذه هو البحث عن مواد نشطة بيولوجيًا جديدة مشتقة من النباتات المحلية ، ذات أهمية صيدلانية وصناعية كوسيط مغذي . أجريت هذه الدراسة وفق استراتيجيتين مختلفتين : استخدام مستخلصات التين الشوكي ( لتحضير وسط مغذي صلب أو شبه صلب للاستزراع في المختبر وتقييم نمو الكائنات الحية الدقيقة فيه .وسط غذائي من خلال عمليات التقييم في المختبر .

أتاح الجزء الأول من العمل تسليط الضوء على خصائص التبلور لمستخلصات الصبار ، والتي تعتبر مثيرة جدًا في حالة تحضير وسط صلب . الجزء الثاني من العمل ، وهو تشخيص نمو السلالتين البكتيرية والفطرية ، جعل من الممكن إظهار أن الوسائط خالية من الجلد كانت أكثر كفاءة مع الجلد وسمح بتطور جيد للسلالات البكتيرية والفطريات في المختبر ، وبالتالي التحقق من إمكانية استخدامها كبديل واعد لوسط الاستزراع التركيبي.

لذلك يوضح هذا العمل صحة الاستراتيجيات المعتمدة ، والتي يمكن اعتبار مستخلصات الصبار بديلاً رخيصاً وبيئياً للزراعة في المختبر لبعض الكائنات الحية.

## الكلمات المفتاحية :

العصوية القولونية؛ وسط مغذي؛ الزراعة المخبرية؛ التين الشوكي؛ مواد طبيعية.

## Abstract

The objective of the work carried out was the search for new bioactive substances derived from the local flora, of pharmaceutical and industrial interest as a nutrient medium. This study was carried out according to two different strategies : the use of extracts of prickly pear (*Opuntia ficus indica*), to prepare a solid or semi-solid nutrient medium for in vitro culture and the evaluation of the growth of microorganisms in it. New culture medium through in vitro evaluation processes.

The first part of the work made it possible to highlight the gelling properties of cactus extracts, which are very interesting in the case of preparing a solid medium. The second part of the work, the diagnosis of the growth of the two bacterial and fungal strains, made it possible to show that the media based on skinless cladode was more efficient than the cladode media with skin and allowed a good development of the bacterial strains and fungal in in vitro culture thus validating the possibility of using them as a promising alternative to the synthetic culture medium. This work therefore demonstrates the validity of the strategies adopted, that cactus extracts could be considered as a cheap and ecological alternative for the in vitro culture of some organisms.

## Keywords:

E. coli, culture medium, in vitro, *Opuntia ficus indica*, natural substances.

## Liste des figures

Figure 1 : Morphologie d' <i>Opuntia ficus indica</i> . .....	3
Figure 2 : Fleur du figuier de barbarie. ....	4
Figure 3 : Fruit du figuier de barbarie. ....	5
Figure 4 : Cladodes du figuier de barbarie. ....	5
Figure 5 : Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie. ....	6
Figure 6 : Principe de la photosynthèse chez les plantes de type CAM. ....	8
Figure 7 : Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde. ....	9
Figure 8 : Schéma technologique de la transformation agro-alimentaire du figuier de barbarie. ....	10
Figure 9 : Schéma technologique de la transformation cosmétique et pharmaceutique du figuier de barbarie. ....	11
Figure 10 : Schéma illustrant la technique de bouturage, (a) : meilleur emplacement pour prélever les boutures, (b) : plantation au niveau du sol. ....	13
Figure 11 : Schéma des ingrédients de base d'un milieu solide. ....	17
Figure 12 : Protocole de préparation d'un milieu de culture à partir du figuier de barbarie, et test de son efficacité sur les bactéries et les champignons ....	23
Figure 13 : Organigramme de la transformation des raquettes d' <i>Opuntia ficus-indica</i> en poudre.....	24
Figure 14: Protocole de préparation d'un milieu de culture à base de poudre des raquettes d' <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	25
Figure 15 : Protocole d'évaluation et d'ensemencement des microorganismes. ....	28
Figure 16 : Mise en culture et évaluation de la croissance bactérienne. ....	29
Figure 17 : Mise en culture et évaluation de la croissance fongique. ....	30
Figure 18 : Résultats de la croissance d'E. Coli dans différents milieux. ....	33
Figure 19 : Résultats de la croissance de Staphylococcus dans différents milieux. ....	34
Figure 20 : Croissance radiale mycélienne sur les différents milieux. ....	36
Figure 21 : Résultats de la croissance de Fusarium oxysporum dans différents milieux. ....	38

Figure 22 : Résultats de la croissance d' <i>Aspergillus niger</i> dans différents milieux.....	39
Figure 23 : Résultats de la croissance d' <i>Aspergillus</i> dans différents milieux. ....	40

## Liste des tableaux

Tableau 1 : classifications du figuier de barbarie .....	6
Tableau 2 : Utilisations du figuier de Barbarie. ....	12
Tableau 3 : Composition chimique de la figue de barbarie <i>Opuntia ficus-indica</i> . ....	12
Tableau 4 : Classification des milieux de culture selon leur composition. ....	16
Tableau 5 : Principaux ingrédients des milieux de culture.....	18
Tableau 6 : Caractéristiques physico-organoleptiques.....	30
Tableau 7 : Représentation simplifiée de la croissance des microbienne .....	32

## Liste des abréviations

**CAM** : Crassulacean Acid Metabolism

**pH** : Potentiel hydrique

**E. Coli** : *Escherichia coli*

**SCN** : Staphylocoques à coagulase négative.

**AW** : Activité de l'eau.

**PDA** : Potato dextrose agar

**MCPR** : Milieu de Culture avec Peau, wilaya de Relizane

**MCSPR** : Milieu de Culture Sans Peau, wilaya de Relizane

**MCPT1** : Milieu de Culture avec Peau, wilaya de Tiaret

**MCST1** : Milieu de Culture Sans Peau, wilaya de Tiaret

**MCPT2** : Milieu de Culture avec Peau, wilaya de Tissemsilt

**MCST2** : Milieu de Culture Sans Peau, wilaya de Tissemsilt

# **Introduction**

## INTRODUCTION

Les mots « substances naturelles » ne renvoient pas seulement aux médecines douces ou à la diététique, mais aussi à l'industrie pharmaceutique et à sa cousine la cosmétologie. Ces industries commercialisent des molécules de synthèse qui n'ont toujours pas de meilleurs modèles que les molécules produites par les organismes vivants : l'imagination créatrice de la nature, liée à l'évolution, dépasse de loin celle de l'homme. Les substances naturelles produites par les végétaux, les animaux ou les microbes sont ainsi à l'origine d'environ 70 % des molécules biologiquement actives utilisées en pharmacie (Bencharif, et al., 2007).

Trois étapes, la prospection de la flore et de la faune, l'étude en laboratoire, l'enquête ethnobotanique, scandent la recherche sur les substances naturelles. Toutes les trois ont connu d'importantes évolutions méthodologiques, voire des révolutions théoriques.

Des premières drogues végétales recensées par les Sumériens et les Babyloniens à l'isolement des premiers principes actifs avec les progrès de la chimie aux XVIIIe et XIXe siècles, l'histoire du rôle thérapeutique des plantes est aussi longue que l'histoire de l'humanité elle-même (Benjlali, et al., 2005).

Les substances naturelles d'origine végétale, en général, constituent un atout considérable grâce à la découverte progressive de nouvelles applications dans divers domaines, qui aujourd'hui utilise majoritairement des substances issues de la chimie de synthèse, notamment les produits pharmaceutiques destinés à la culture et croissance des organismes sensibles (culture in vitro de : méristème, bactérie et champignon...etc.). Il est donc nécessaire d'articuler différentes disciplines pour réduire les produits chimiques utilisés dans ce domaine, tout en veillant, à satisfaire les besoins nutritifs des organismes en culture.

Dans ce contexte, notre but d'étude est de formuler un nouveau milieu de culture, à base d'extraits de figuier de barbarie (*Opuntia Ficus indica*), et d'évaluer les propriétés et les capacités de ce nouveau milieu de culture à satisfaire les besoins nutritifs des organismes en culture.

Le travail effectué s'articule selon deux axes : dans un premier temps l'élaboration d'un milieu de culture à base d'extraits de cactus et l'étude de ses propriétés

organoleptiques, pour le deuxième point, le criblage sera approfondi par, des essais in vitro afin d'évaluer la croissance des microorganismes et de tenter d'analyser plus précisément le comportement de ces différents microorganismes (fongique et bactérienne) dans ce nouveau milieu de culture.

# ***Synthèse* bibliographique**

**Chapitre 01 :**

**Généralité sur le figuier de**

**barbarie**

## Synthèse bibliographique

### Chapitre 01 : Généralité sur le figuier de barbarie

#### 1. Généralité sur le figuier de barbarie

*Opuntia ficus indica* est une espèce de plante de la famille des *Cactaceae*, originaire du Mexique. La plante peut survivre à de très longues périodes de sécheresse car elle a réussi à développer une aptitude à se contenter de peu d'eau grâce à ses adaptations morphologiques et physiologiques. En effet, elle préfère le climat chaud et bien ensoleillé. (RANDRIANARISOA , 2015).

##### 1.1. Biologie du figuier de barbarie

*Opuntia* est le nom mexicain, d'origine aztèque de notre Figuier de Barbarie. C'est une plante riche, belle, originale et très utile. ( Schweizer, 1997)

Le figuier de barbarie est une plante arborescente robuste de 3 à 5 m de haut (Reyes, et al., 2006; Neffar , 2012).



Figure 1 : Morphologie d'*Opuntia ficus indica*.

#### Nom commun

Connue sous le nom de figuier de Barbarie ( Habibi , 2004)

Le nom commun est le cactus qui vient du mot grec « kaktos », il signifie : la plante épineuse (Defelice, 2004)

#### Nom latin

*Opuntia ficus indica*, son appellation scientifique vient du latin *Opuntius* d'*Oponte* ; nom de la ville grecque ( Schweizer, 1997)

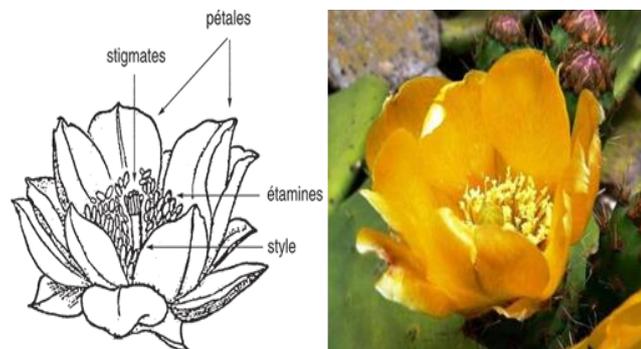
### Autres noms

Selon ( Schweizer, 1997), la plante peut porter un nom différent selon l'idiome local: Nopal, Tuna, Chardon d'Afrique, Prickly pear, El-tin-el-Choki et autres.

## 1.2. Description morphologique

### 1.2.1. Fleurs

Les fleurs se trouvent en abondance sur le dessus des raquettes, de belles et grandes corolles latérales jaunes, oranges ou rouges, aux nombreux pétales soudés à leur base et s'ouvrant gaiement à leur extrémité. ( Schweizer, 1997)



(Schweizer, 1997)

Figure 2 : Fleur du figuier de barbarie.

### 1.2.2. Fruits

Ses fruits sont des baies charnues ovoïdes ou piriformes pourvues d'épines. Ils sont généralement verdâtres ou jaunes à maturité. La pulpe est toujours juteuse, de couleur jaune-orangé, rouge ou pourpre, parsemée de nombreuses petites graines. ( Habibi , 2004)



Figure 3 : Fruit du figuier de barbarie.

### 1.2.3. Cladodes (ou raquettes)

Forme ovoïdale de couleur vert-mat, ayant une longueur de 30 à 50 cm, une largeur de 15 à 30 cm et une épaisseur de 1.5 à 3 cm .Les cladodes assurent la fonction chlorophyllienne et sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration et les protège contre les prédateurs (Reyes, et al., 2006; Neffar , 2012). Les cladodes sont couverts de petites aréoles, d'épines et de glochides blancs (Habibi , 2004).



Figure 4 : Cladodes du figuier de barbarie.

### 1.2.4. Épines

Blanchâtres, clarifiées, solidement implantées et longues de (1 à 2 cm). Les glochides sont de fines épines de quelques millimètres de couleur brunâtre, se décrochent facilement, s'implantant solidement dans la peau (Neffar , 2012).

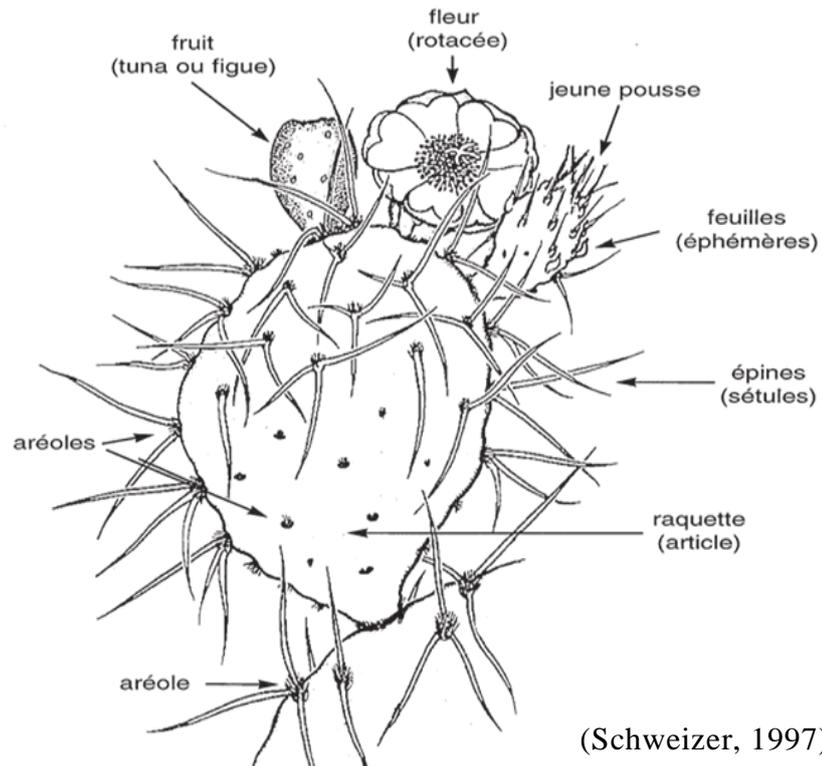


Figure 5 : Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie.

### 1.3. Taxonomie

Tableau 1 : classifications du figuier de barbarie

Règne :	Plante
Sous-règne :	Spermaphyte
Division :	Angiosperme
Classe :	Dicotylédones
Sous- classe :	Caryophyllacée
Famille:	Cactaceae
Sous-famille:	Opuntioideae
Genre:	Opuntia
Espèce:	<i>Opuntia ficus indica</i>

(Wallace, et al., 2002)

#### 1.4. Physiologie de l'*Opuntia* et adaptation

Sur le plan physiologie, l'*Opuntia* se présente comme une plante de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Elle a la particularité de fixer le CO<sub>2</sub> pendant la nuit et de fermer ses stomates pendant le jour. Une telle stratégie avec l'épaisseur et l'imperméabilité de l'épiderme permet à la plante de réduire de façon importante les pertes d'eau par évapotranspiration pendant la journée. L'eau absorbée se lie au mucilage composé hydrophile des cladodes. Le mucilage en retenant l'eau, permet selon (Evêque, 1995) aux organes et cladodes de résister aux hautes températures.

D'après (Mulas , 1993) et (Michel, 1998) la photosynthèse se déroule selon les étapes résumées ci-après et par la figure 06 :

Carboxylation après décomposition des hydrates de carbone ce qui aboutit à la synthèse d'acide organique (acide Malique) pendant la nuit ce qui explique l'augmentation de l'acidité.

décarboxylation du malate et fixation du CO<sub>2</sub> libre et concentré, durant le jour au moment où les stomates sont fermés, ce processus se termine par la synthèse des glucides (dont glucanes et amidon). Une forte réduction de la photo respiration est observée chez ces plantes.

Toutefois, les jeunes cladodes dont les stomates restaient ouverts le jour ont montré que le cycle de la photosynthèse est le même que celui observé chez les plantes de type C3, plantes herbacées non tropicales.

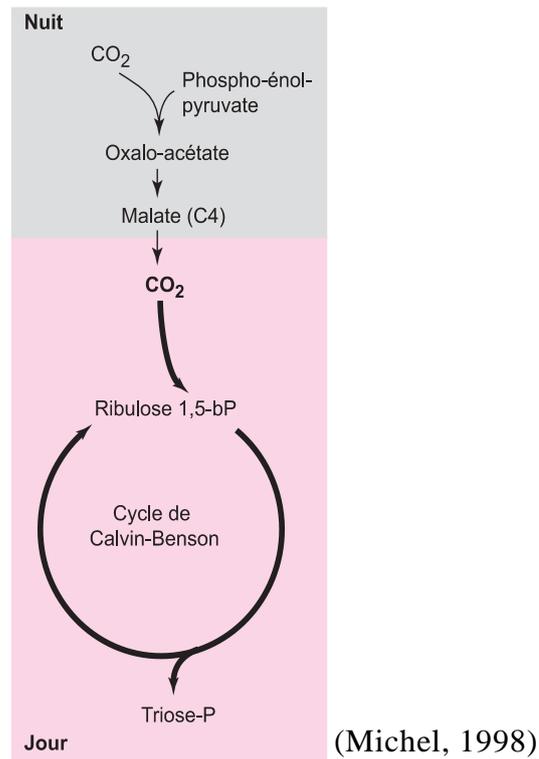


Figure 6 : Principe de la photosynthèse chez les plantes de type CAM.

### 1.5. Origine et distribution géographique

Le genre *Opuntia* est originaire du Mexique ( Schweizer, 1997) . Au 16<sup>ème</sup> siècle, le figuier de barbarie a été introduit en Afrique du Nord. ( Habibi , 2004) . Il s'est diffusé rapidement dans le bassin méditerranéen ( Habibi , 2004) . Il est développé sur la partie Ouest de la Méditerranée: Sud de l'Espagne, le Portugal et l'Afrique du Nord (la Tunisie, l'Algérie et le Maroc) (Bensalem, et al., 2002; Arba, 2009)

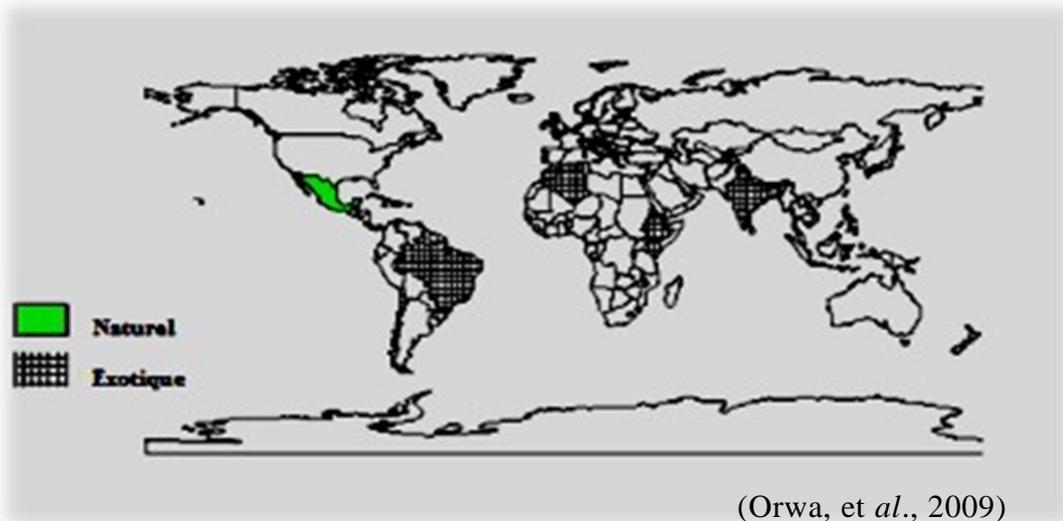


Figure 7 : Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde.

La figure 07 distingue l'aire d'origine du figuier qui est le Mexique (en vert) et les nouvelles aires de distribution (en noir): le Brésil, le Chili, les Etats Unies, l'Inde, l'Italie, l'Espagne, l'Erythrée, le Portugal, l'Algérie, la Tunisie, la Libye, le Maroc, l'Afrique du Sud, l'Éthiopie, le Soudan, la Tanzanie, le Kenya et l'Ouganda.

## 2. Principales vertus et intérêt industriel

### 2.1. Transformation biotechnologique

#### 2.1.1. Biomasse

Deux souches de bactéries acétiques affiliées à l'espèce *Acetobacter pasteurianus*, ont été isolées de cactus. Les résultats obtenus montrent la capacité de cette souche à résister aux conditions de stress thermique en bioréacteur (Mounir , 2016)

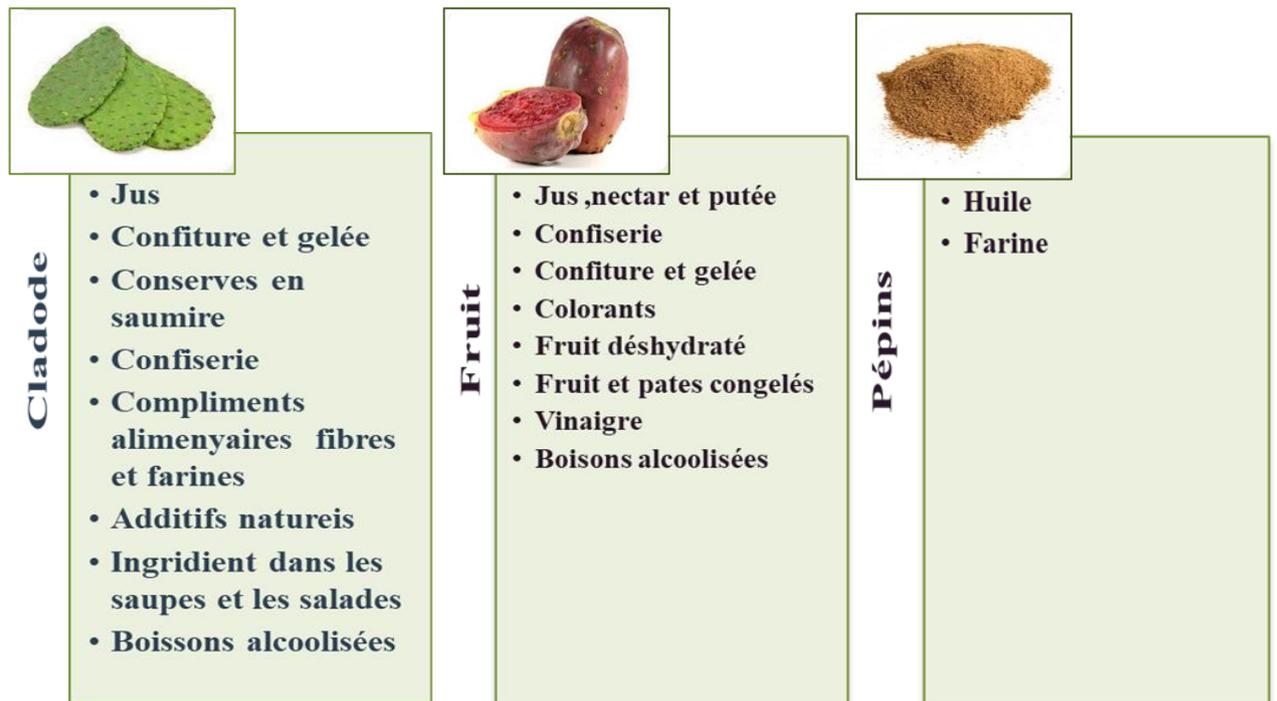
#### 2.1.2. Vinaigre balsamique

Le vinaigre a été produit avec succès à partir de la figue de barbarie par des producteurs artisanaux au Chili; Une expérience similaire a été rapportée en Argentine (Sáenz , 2013). Le vinaigre de la figue de barbarie possède des bienfaits thérapeutiques multiples : Substances antibiotiques, antibactériennes, Bêta-carotène, acide malique important dans la lutte contre les toxines (Bannani , 2011; Cherif , 2016)

### 2.1.3. Biocarburant

L'Opuntia représente un intérêt, en tant que une culture bioénergétique et une biomasse dédiée aux biocarburants, en raison de leurs fractions massives plus élevées de constituants hydrosolubles, de glucides structuraux, de cellulose, d'hémicellulose et de lignine, en plus la masse d'eau élevée de cette espèce (85-94%) peut s'avérer avantageuses pour la déconstruction de la biomasse (Yang , et al., 2015)

### 2.1.4. Produits agro-alimentaires



(Saenz , 2000; Stintzing , et al., 2005; Sáenz, 2013; Arba, 2009)

Figure 8 : Schéma technologique de la transformation agro-alimentaire du figuier de barbarie.

Figure (8) représente un schéma montrant les différentes utilisations du figuier de barbarie dans le domaine agro-alimentaire, où l'on note que cette plante est polyvalente, en plus du fruit, ses pépins peuvent être utilisées pour produire des produits alimentaires tels que l'huile et la farine, aussi à partir de ses cladodes de jus, de confiture, de confiserie et autre sont produites.

## 2.2. Produits cosmétiques et pharmaceutiques

Poudre séchée (raquettes)	Mucilage (raquettes)	Fleurs	Graines des fruits
			
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Effet sur :</b></li> <li>• contrôle du sucre</li> <li>• contrôle cholestérol dans le sang</li> <li>• Amincissant</li> <li>• Anti glycémique</li> <li>• Diminue le plasma</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Fabrication du :</b></li> <li>• Champoings;</li> <li>• Assouplissants des cheveux;</li> <li>• Crèmes dermiques;</li> <li>• Laits hydratants ;</li> <li>• Réduire le taux de cholestérol dans le sang.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Le thé aux fleurs:</b></li> <li>• Traite les maladies rénales</li> <li>• <b>fleurs séchées :</b></li> <li>• Régulant diurétique</li> <li>• Traite la prostate</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'huile</li> <li>• Antiride naturel</li> <li>• Crèmes dermiques antirides</li> </ul>

(Arba, 2009)

Figure 9 : Schéma technologique de la transformation cosmétique et pharmaceutique du figuier de barbarie.

Figure (9) fournit un schéma technologique montrant l'utilisation de figuier de barbarie dans les domaines pharmaceutique et cosmétique. Où l'on note que les raquettes ont un double bénéfice (séchées et mucilage), ainsi que les fleurs, où leurs bénéfices peuvent être exploités en les trempant ou en les séchant, et les graines du fruit de cette plante ont également un avantage, par exemple, la production d'huile et de crème.

Les utilisations du figuier de barbarie dans divers domaines commerciaux et leurs usages spécifiques sont résumés dans la table 2 :

Tableau 2 : Utilisations du figuier de Barbarie.

Aires commerciales	Usages spécifiques
Production alimentaire	Fruit, Nopalitos, jus de fruit, extraction d'huiles des graines.
Production d'énergie	Alcool, biomasse fraîche.
Aliment de bétail	Fourrage, déchets de fruits.
Usage médical	Fleurs pour les diurétiques, cladodes pour diabète, mucilages.
Usage agronomique	Fixation du sol, source d'eau complémentaire, brise-vent.
Colorants	Betalaines dans les fruits, acide carminique.

(Inglese, et al., 1995)

### 3. Composition chimique du figue de barbarie

La valeur nutritive varie en fonction de la variété, l'âge des raquettes, l'évolution thermo-pluviométrique au cours de l'année, le type de sol et les pratiques agricoles (Neffar , 2012) . Le tableau 3 montre la composition chimique de fruit et de pulpe avec la graine et sans graine du figuier de barbarie.

Tableau 3 : Composition chimique de la figue de barbarie *Opuntia ficus-indica*.

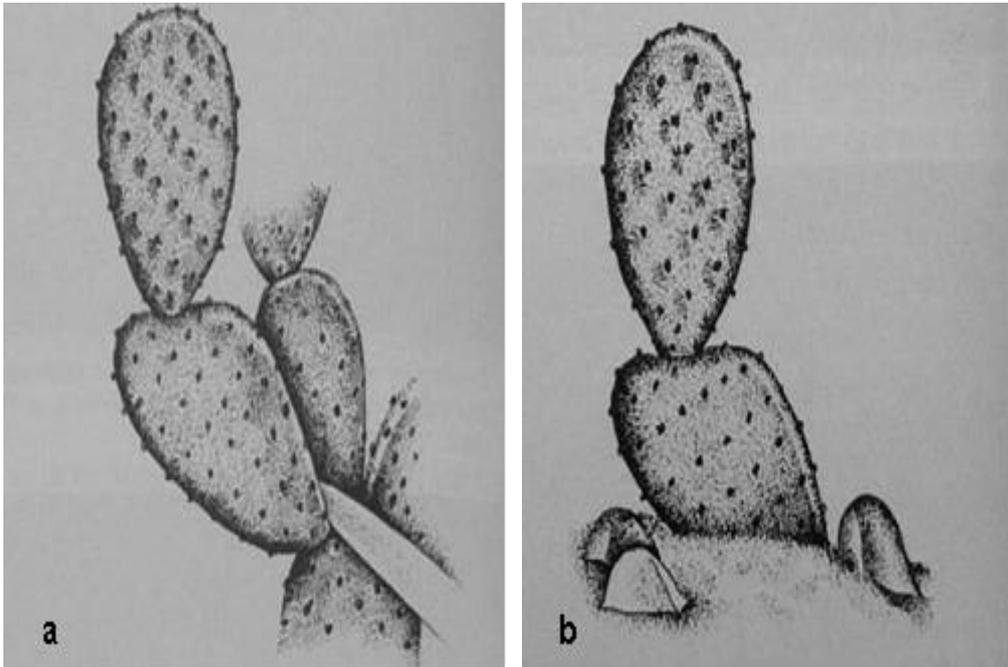
Constituants	Fruit (%)	Pulpe et graine (%)	Pulpe sans graine (%)
<b>Eau</b>	80.0	84.5	83.6
<b>Protéines</b>	1.0	1.3	0.8
<b>Lipides totaux</b>	0.7	1.3	0.3
<b>Glucides disponibles</b>	14.8	8	10.8
<b>Fibres brutes</b>	23	4.4	3.6

( Habibi , 2004)

### 4. Multiplication

Les cactus se reproduire généralement par boutures de tiges, on entend par bouturer la technique qui consiste à prélever une partie de la plante (feuille, tige, branche) et à lui faire prendre racine en la posant sur un sol humide. (Démi , 2009)

Le figuier de Barbarie est multiplié végétativement par bouturage de raquettes. A la plantation, la raquette est placée dans un sillon de 15 cm, une face plaquée sur les 2/3 de sa hauteur contre le sol et inclinée. Le sol est alors tassé autour de la raquette. Les distances de plantation sont variables en fonction de la pluviométrie et du degré d'intensification de la culture. (Walali, 1995).



(LAMB, 1991)

Figure 10 : Schéma illustrant la technique de bouturage, (a) : meilleur emplacement pour prélever les boutures, (b) : plantation au niveau du sol.

# **Chapitre 02 :**

## **Généralité sur les milieux de culture**

## **Chapitre 02 : Généralité sur les milieux de culture**

### **1. Généralité sur les milieux de culture**

Les micro-organismes exigent pour leur croissance des aliments. Ces aliments leur sont fournis au laboratoire par des milieux nutritifs ou milieux de culture. Comme les besoins nutritionnels des microorganismes et les conditions de leurs développements sont très variés, il n'existe évidemment aucun milieu universel sur lequel tous les microbes soient capables de se multiplier. ( BOUSSENA , 2020)

#### **1.1. Définition des milieux de culture**

Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des microorganismes peuvent se multiplier ( Khadir ). Un mélange de substance nutritifs (acides aminés, peptides, bases nucléiques, sucres, etc.).Il est possible d'ajouter d'autre facteur de croissance pour éviter les variations importantes de pH (Sang, protéines, hémoglobine, vitamines) qui sont de nature solides, semi –solides ou liquide (www.uness.fr )

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. (NIAT, et al.)

#### **1.2. Classification des milieux de culture**

Il existe une grande variété de milieux de culture en rapport avec la diversité des exigences nutritives des micro-organismes. Les milieux de culture sont classés en fonction de leur utilisation, de leur composition ou de leur mode de stérilisation (Marchal, et al., 1987).

##### **1.2.1. Classification d'après l'utilisation**

###### **1.2.1.a) Milieux usuels « de base »**

Il n'est pas permis de cultiver toutes les bactéries. Le choix est en fonction de l'habitat naturel des bactéries à isoler. (Marchal, et al., 1987). Il n'existe cependant pas de milieu de culture universel (BOUTALBI, 2002-2003).

Milieux à base d'extraits de viande utilisés pour la culture des microbes commensaux et pathogènes de l'homme et des animaux.

Milieux à base de lait (d'extraits végétaux) utilisés en bactériologie alimentaire... etc. (Marchal, et al., 1987)

#### **1.2.1.b) Milieux d'isolement**

Selon (Marchal, et al., 1987), Ils sont conformes à la technique envisagée et les bactéries en cause, soit :

Des milieux de base déjà cités.

Des milieux non sélectifs enrichis de produits biologiques (sang, sérum, lait, levure...etc.) (Marchal, et al., 1987)

Des milieux électifs : est un milieu sur lequel apparaît une culture abondante et rapide de certaines bactéries, alors que la plupart des espèces bactériennes s'y développent peu et lentement ( BOUSSENA , 2020).

Des milieux sélectifs (ou d'enrichissement) : ce sont des milieux dans lesquels on incorpore un inhibiteur chimique. Celui-ci, judicieusement choisi, entrave le développement de la plupart des bactéries excepté celui de l'espèce recherchée. Ces milieux permettent donc d'isoler une espèce bactérienne au milieu d'un mélange de germes (BOUTALBI, 2002-2003).

#### **1.2.1.c) Milieux différentiels**

La possibilité de résoudre les problèmes d'identification différentielle qui se posent entre des espèces ou des genres voisins. Ces milieux sont actuellement très nombreux. (Marchal, et al., 1987)

#### **1.2.1.d) Milieux de conservation**

Ils permettent la survie des bactéries dans un état de vie ralentie (Marchal, et al., 1987).

### **1.2.2. Classification d'après la composition**

La classification des milieux de culture selon leur composition est divisée en trois types principaux : milieux naturels ou empiriques, milieux synthétiques et milieux semi-synthétiques (Tableau4).

Tableau 4 : Classification des milieux de culture selon leur composition.

Milieu de culture	Caractéristiques
<b>Milieux naturels ou empiriques</b>	Composition complexe, mal définie. ➤ D'origine animale : lait, sérum, bouillon et gélose nutritifs, gélatine, etc; ➤ D'origine végétale : peptone de soja, pomme de terre, eau de levure, etc.
<b>Milieux synthétiques</b>	Ce sont des solutions de corps purs dans l'eau distillée. Utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes (non exigeantes) ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe.
<b>Milieux semi-synthétiques</b>	Ils contiennent, outre des substances chimiques, des produits d'origine naturelle. Ces milieux sont les plus utilisés et commercialisés.

### 1.2.3. Classification d'après le mode de stérilisation

Il existe 02 types de milieux :

#### 1.2.3.a) *Milieux autoclavables*

Milieu de culture dont les composants ne sont pas détruits par la chaleur

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons. (Bensakhria, 2021)

#### 1.2.3.b) *Milieux non autoclavables*

Milieu de culture qui contient des produits labiles pouvant être détruit par la chaleur.

Exemple : Lowenstein-Jensen (cultiver les mycobactéries : Tuberculose) (Bensakhria, 2021).

### 1.3. Principaux ingrédients des milieux de cultures

#### 1.3.1. Pour les milieux solides

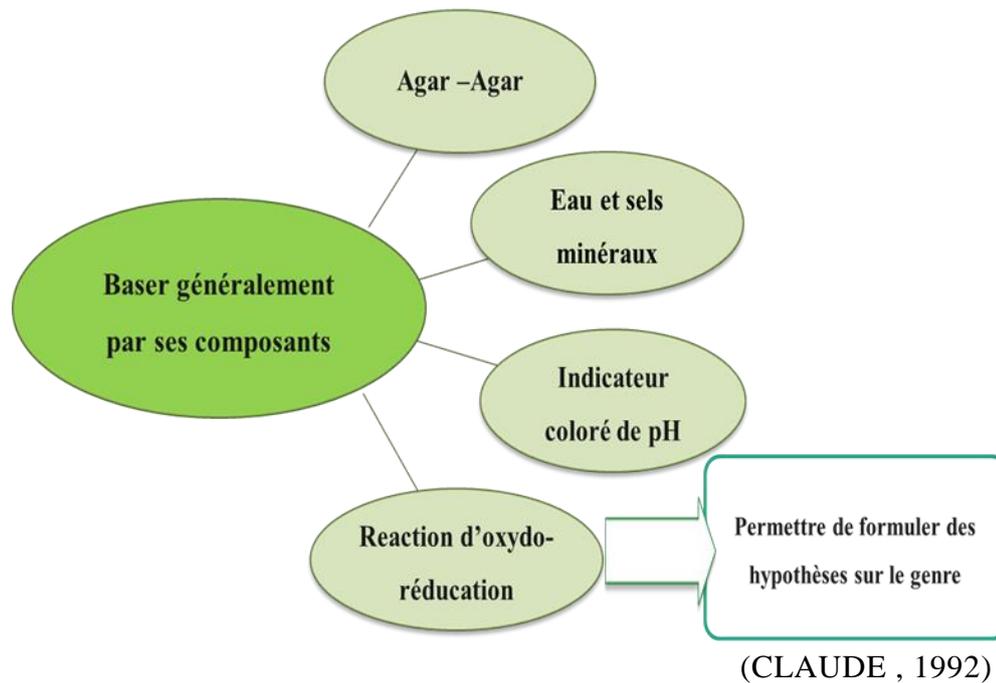


Figure 11 : Schéma des ingrédients de base d'un milieu solide.

Figure (11) représente un organigramme schématique montrant les principaux ingrédients qui composent le milieu de culture solide, il se compose d'une base (agar-agar, eau, minéraux...) ainsi que d'un indicateur coloré de pH ou de réaction d'oxydo-réduction pour permettre de formuler des hypothèses sur le genre.

#### 1.3.2. Pour les milieux liquides

Les milieux liquides ne contiennent pas l'Agar-Agar, ce sont des bouillons de culture avec le même fonctionnement (CLAUDE , 1992). La croissance se traduit par un trouble ou des dépôts et des voiles superficiels. Exemple : bouillon nutritif (BN), Bouillon trypticase soja (TSB), Brain-Heart Infusion Broth BHIB etc.... ( Khadir ) .

Les ingrédients de base d'un milieu de culture, car les milieux de culture contiennent généralement chacun des composants suivants : Extraits de viandes, Peptone, Hydrolysats, Agar-agar ou gélose, Produits biologiques, Base minérale, en plus de l'Eau distillée. Tableau (5) explique les caractéristiques et la fonction de chacun de ces éléments.

Tableau 5 : Principaux ingrédients des milieux de culture.

Constituants	Caractéristiques	Fonction
Extraits de viandes	A partir de tissus animaux sélectionnés (à froid : macération; à chaud: infusion, extraits de viandes).	Source de protéines peu dégradées, glucides, sels minéraux, vitamines hydrosoluble. (vitamine B).
Peptone	Résultats d'action d'enzymes protéolytiques (pancréatine, pepsine, trypsine, papaïne) sur des matières protéiques (viande, caséine, soja, gélatine...)	Source d'acides aminés et des oligopeptides
Hydrolysats	Action d'acide chlorhydrique sur des protéines.	Source d'acides aminés et des ions minéraux.
Agar-agar ou gélose	Extrait d'algue rouge. Mélange de 2 groupes de polysaccharides (agarose 70% et agaropectine 30%). A 90°C se dissout dans l'eau, à 45°C reste en surfusion et à basse température elle forme un gel transparent +/- solide	Solidifier les milieux de cultures.
Produits biologiques	Sang, sérum, lait, gélatine, pomme de terre, etc.	molécules organiques diverses.
Base minérale	Macroéléments ioniques (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cl <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ...). Microéléments ioniques ou oligoéléments (Fe, Co, Ti, Zn, Cu, B, Se, Mo, V, W, Mn.)	Apportent l'équilibre électrique, l'équilibre osmotique, fonctionnement enzymatique.
Eau distillée		

Source :

(

Khadir

)

# **Partie expérimentale**

## **Chapitre 01 :**

### ***Matériel et Méthodes***

## Partie expérimentale

### Chapitre 01 : Matériel et méthodes

L'objectif essentiel visé par ce travail consiste à l'élaboration d'un milieu de culture à base d'extraits de figuier de barbarie (*Opuntia ficus-indica*) optimisant la croissance des microorganismes (champignons et bactéries). Pour parvenir à cela, nous avons testé trois extraits de différentes provenances : Tiaret, Tissemsilt et Relizane.

Cette partie est consacrée à la présentation de l'ensemble du matériel et des protocoles expérimentaux que nous avons utilisés au cours de nos travaux. Dans la première partie, sont précisées l'origine et la nature des matières premières qui ont servi de support à l'étude. Nous présentons, par la suite une description des techniques d'extraction qui ont été utilisées ainsi que les analyses physico-chimique effectuées. Une troisième partie est consacrée au détail de tous les essais in vitro d'évaluation des milieux de culture à base d'extraits végétaux. Enfin une dernière partie présente l'ensemble des résultats et leur discussion.

#### 1. Matériel

Les matériels utilisés dans ce travail sont de trois ordres :

- (1) matériel végétal, constitué de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*),
- (2) matériel biologique constitué de deux souches bactériennes et deux souches fongiques,
- (3) matériel de laboratoire.

##### 1.1. Matériel végétal

Ce projet porte sur l'étude de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), une des plantes à usage multiple les plus communes dans les zones arides en Algérie, et peut constituer, par conséquent, un levier de développement local et régional au niveau de ces zones.

Pour une valorisation de la flore locale.

Les produits que nous avons étudiés tout au long de cette étude, sont des extraits secs de Figuier de Barbarie (*Opuntia ficus-indica*)

Dans ce travail, Les échantillons de raquettes (cladodes) d'*Opuntia ficus-indica* a été récolté le 20/02/2021 au niveau de trois (3) régions différentes d'Algérie, qui sont les suivantes :

La région de Ksar Chellala wilaya de Tiaret, situé entre les isohyètes 200 à 300 mm/an. La moyenne pluviométrique annuelle est de 269,47 mm/an. La moyenne annuelle des températures est de 17,72 °C. ( Benkhetou , et al., 2015)

La région d'Ain-Tarek wilaya de Relizane caractérisée par un climat continental, chaud semi-aride avec des précipitation inférieure à 250mm/an et la température entre 12 et 35 °C.

La région de Lardjam wilaya de Tissemsilt caractérisée par un climat continental sec est froid en hiver et chaud en été de type semi-aride. La pluviométrie varie entre 300 et 420 mm/an et la température entre 8 et 30 °C

## **1.2. Matériel biologique**

Les micro-organismes utilisés dans l'expérimentation sont constitué de deux souches bactériennes et deux souches fongiques qui sont les suivants :

### **1.2.1. Souches bactériennes utilisés**

#### **1.2.1.a) *Escherichia coli***

Egalement appelée colibacille et abrégée en *E. coli*, est une bactérie intestinale (Gram négatif) des mammifères, en forme de bâtonnet, très commune chez l'être humain.

Aéro-anaérobie facultatif. Culture facile sur milieux ordinaires, lactoses.

Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drigalski. (CLAVE , 2015)

#### **1.2.1.b) *Staphylococcus aureus***

Les Staphylocoques sont des Cocci à Gram positif classiquement disposés en amas. Actuellement, on distingue 44 espèces. L'espèce *S. aureus* (plus communément appelé staphylocoque doré) se distingue généralement des autres staphylocoques appelés staphylocoques à coagulase négative (SCN) par la présence d'une coagulase. *S. aureus* est un germe très important aussi bien dans les infections communautaires que nosocomiales. Elle impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers (CLAVE , 2015).

### 1.2.2. Souches fongiques utilisés

#### 1.2.2.a) *Fusarium oxysporum*

Le nom *Fusarium* est donné à un groupe de Champignons imparfaits à la classe des *Deutéromycètes*. Pousse sur milieu Sabouraud, mais se développe mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA. (TABUC, 2007)

Le *Fusarium oxysporum* se caractérise par la présence de macroconidies en forme fusiformes, cloisonnées, sa température optimale pour croissance est comprise entre 22 et 37 °C. Développer dans un milieu très humide ( $A_w > 0,9$ ). (CASTEGNARO, et al., 2002)

#### 1.2.2.b) *Aspergillus niger*

Le nom *Aspergillus* est donné à la classe des *Ascomycètes*. (TABUC, 2007), moisissures à filaments cloisonnés hyalins. (ANOFEL, 2014),

*Aspergillus niger*, l'aspergille noir, est un champignon filamenteux ascomycète de l'ordre des Eurotiales. C'est une des espèces les plus communes du genre *Aspergillus* qui apparaît sous forme d'une moisissure de couleur noire sur les fruits et légumes.

Le champignon se caractérise par sa croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C. (TABUC, 2007)

### 1.2.3. Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé lors de l'expérience sont les suivants : distillateur, béchers, éprouvette graduée, thermomètre, agitateur magnétique, balance à précision, autoclave, bec bunsen, boîtes de Pétri, des tubes à vis ou cotonnés stériles, pince en bois ou gants.

## 2. Principales étapes pour les essais in vitro

La méthodologie adoptée pour répondre aux objectifs fixés par cette étude comprend les principales étapes suivantes (figure 12):

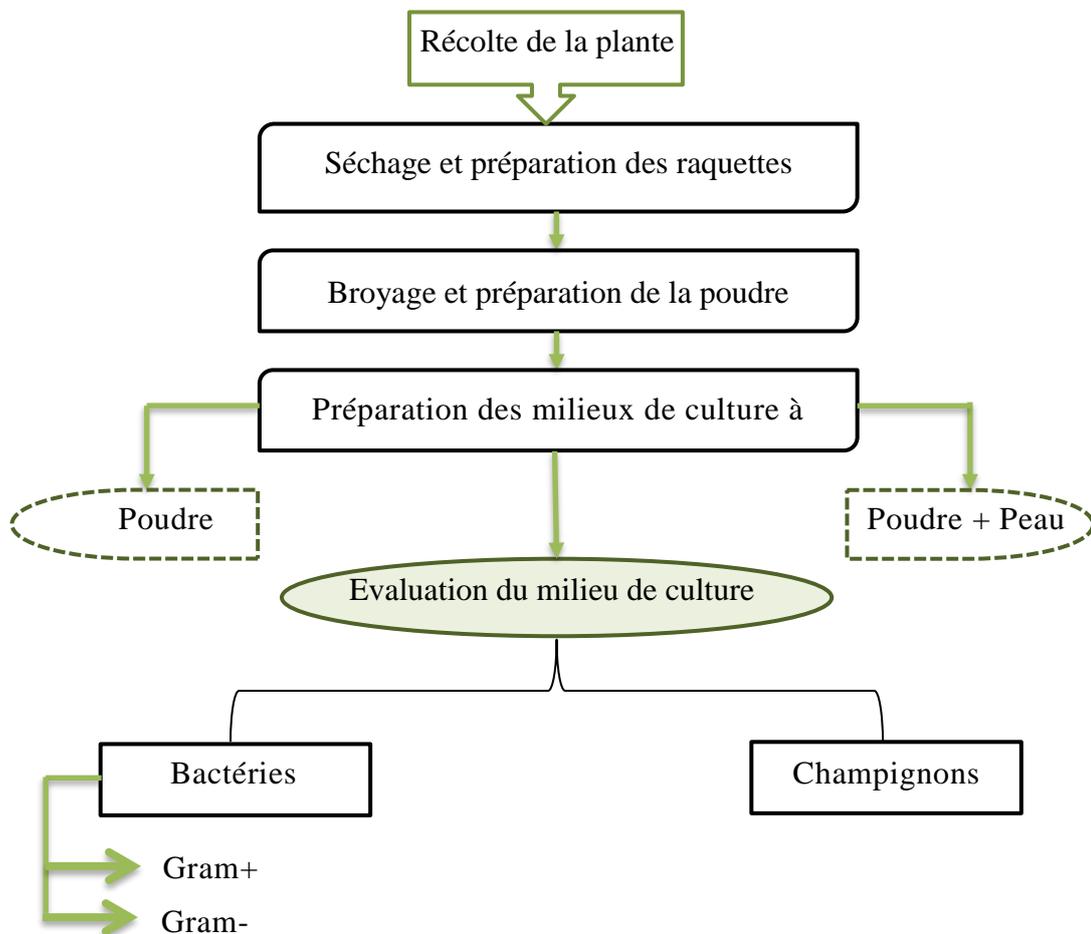


Figure 12 : Protocole de préparation d'un milieu de culture à partir du figuier de barbarie, et test de son efficacité sur les bactéries et les champignons

### 2.1. Préparation de la pâte du milieu de culture de Figuier de Barbarie

Pour préparer l'extrait de Figuier de barbarie, la matière végétale passe par les étapes suivantes. (Figure 13)

1. Nettoyage : les raquettes sont pleines d'épines et il est difficile de les enlever. Cette étape permet de se débarrasser des épines des raquettes ;
2. Epluchage : cette méthode est utilisée pour le cas de « Poudre de raquette sans peau », elle consiste à ôter la couche superficielle de la raquette, l'épluchage est réalisé manuellement à l'aide de lame tranchante.
3. Découpage : la technique consiste à diviser un cladode cactus entier sans enlever la peau en plusieurs morceaux afin d'accélérer le processus de séchage.

4. Séchage : c'est une opération qui a pour but d'éliminer par vaporisation l'eau de constitution des cladodes afin de les transformer en produit solide sec, le séchage se fait à l'air libre à l'abri de la lumière et de l'humidité.

5. Broyage : l'opération consistant à réduire les cladodes séchés en poudre homogènes, en vue d'obtenir une pâte aussi homogène que possible, le broyage se fait à l'aide d'un mortier.

6. Blutage, Tamisage : La poudre est séparée selon la taille de ses grains, la séparation est réalisée au moyen d'un Tamis (diamètre 0.05 mm), ensuite stockée sous forme de poudre dans des sacs en papier.

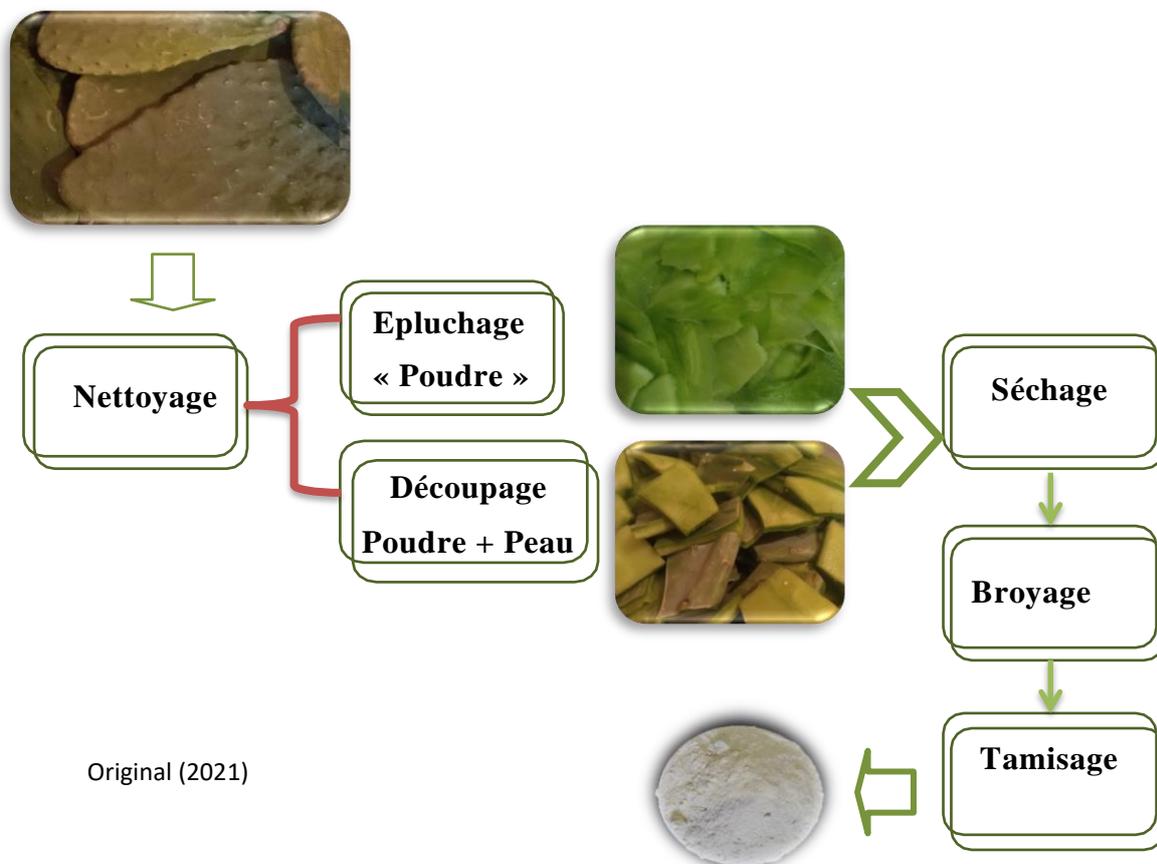


Figure 13 : Organigramme de la transformation des raquettes *d'Opuntia ficus-indica* en poudre

## 2.2. Préparation des milieux de culture

Dissoudre quantité d'adéquate de la poudre du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), dans l'eau distillée stérile (15g de poudre pour 200 ml d'eau distillée) dans une fiole jaugée, ajouter à la solution 2g d'agar-agar si besoin, en versant petit à petit la poudre tout en remuant à l'aide de l'agitateur magnétique (500 tours/80°C) afin d'obtenir une

solution homogène. L'homogénéisation de la solution a été faite à partir d'un agitateur magnétique.

Sitôt que la solution devient bouillonnante la retirer de la plaque chauffante et laisser refroidir jusque 60°C environ. Conditionner le milieu encore chaud dans des flacons en verre stérile ensuite les fermer afin de les autoclaver. La stérilisation de tous les milieux de culture a été faite à l'autoclave pendant 15 minutes sous une température de 121°C. Après stérilisation, les solutions sont refroidies pendant 30 minutes, puis coulées dans des boites de pétri de 90 mm sur une hauteur de 4 mm et laisser solidifier sur pailleasse. Les boites sont conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

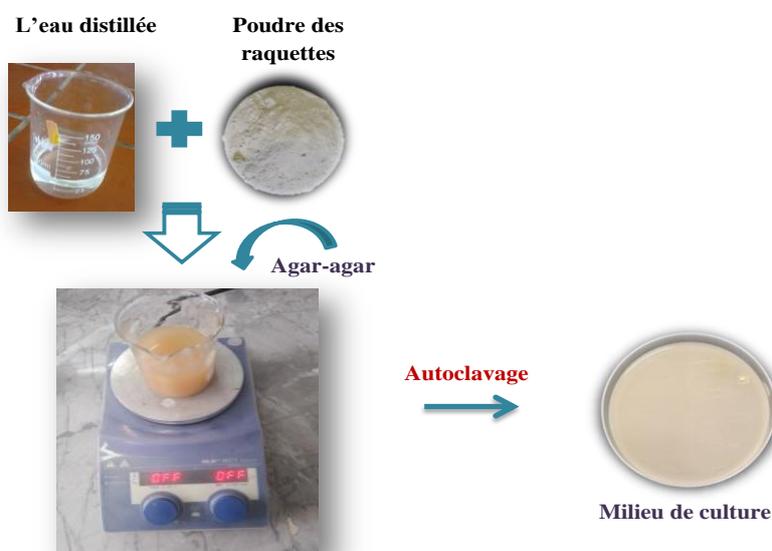


Figure 14: Protocole de préparation d'un milieu de culture à base de poudre des raquettes d'*Opuntia ficus-indica*.

### 3. Analyse de la composition des milieux de culture crée

C'est une étape réalisée juste après la préparation des milieux de culture. L'examen organoleptique comprend toutes les activités relatives à la vérification des paramètres palpables à l'aide des organes de sens sans recourir aux appareils de mesure plus ou moins complexes. L'aspect, la couleur et l'odeur d'un milieu de culture ont été déterminés de façon à apprécier la qualité de celle-ci.

### 3.1. pH

Le pH (potentiel Hydrogène) est en fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution ou par colorimétrie, sur une échelle allant de 1 à 14.

Le papier pH est un papier utilisé en chimie. Il permet de mesurer globalement le pH d'un corps, c'est-à-dire son acidité ou sa basicité.

- Prendre une languette de papier pH avec une pince brucelles.
- Tremper l'extrémité libre du papier pH dans la solution.
- Comparer la couleur du papier pH avec l'étalon universel fourni par le fabricant.

### 3.2. Conductivité électrique

La conductivité électrique caractérise l'aptitude d'un matériau ou d'une solution à laisser les charges électriques se déplacer librement et donc permettre le passage d'un courant électrique. Elle est mesurée à l'aide d'un conductimètre, exprimée (mS/cm).

### 3.3. Cendres

Les cendres totales sont le résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant des substances organiques d'origine animale, végétale ou synthétique. Le taux moyen de la quantité de cendre est déterminé par la différence du poids.

Une quantité de poudre du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*), est incinéré dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures jusqu'à l'obtention un résidu grisâtre, claire ou blanchâtre. Le taux de cendres est calculé par la différence de poids avant et après incinération par la formule suivante :

$$TC = \frac{(P2 - P1)}{P0} \times 100$$

Dont :

TC : taux de cendres en pourcentage.

P0 : poids de l'échantillon au début de l'essai en g.

P1 : poids des creusets vides en g.

P2 : poids d'échantillon après incinération en g. (ADEME, Juillet 2001)

### 3.4. Densité

La densité est le rapport de la masse volumique de l'espèce chimique par la masse volumique de l'eau, est une grandeur sans unité.

Pour déterminer la densité il faut, peser le pycnomètre vide et parfaitement sec (P0), puis rempli d'eau distillée (P1) en g.

Peser le pycnomètre rempli de l'échantillon de milieu de culture (P2) en g.

La densité est donnée par la formule suivante :

$$D = \frac{(P2 - P0)}{(P1 - P0)}$$

## 4. Evaluation de l'efficacité des milieux de culture créés

Afin d'évaluer l'efficacité des extraits des cladodes d'*Opuntia ficus indica* comme nouveau milieu de culture, deux micro-organismes, deux souche bactérienne (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*), ainsi que deux souche fongique (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*) issus d'une collection conservée au sein du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université de Tiaret.

Les essais de la culture *in vitro* ont été menés sous conditions contrôlées (température et humidité), ils se sont déroulées dans des conditions stériles au niveau du laboratoire de microbiologie. Le protocole de la culture des différents micro-organismes est le suivant (figure 15) :

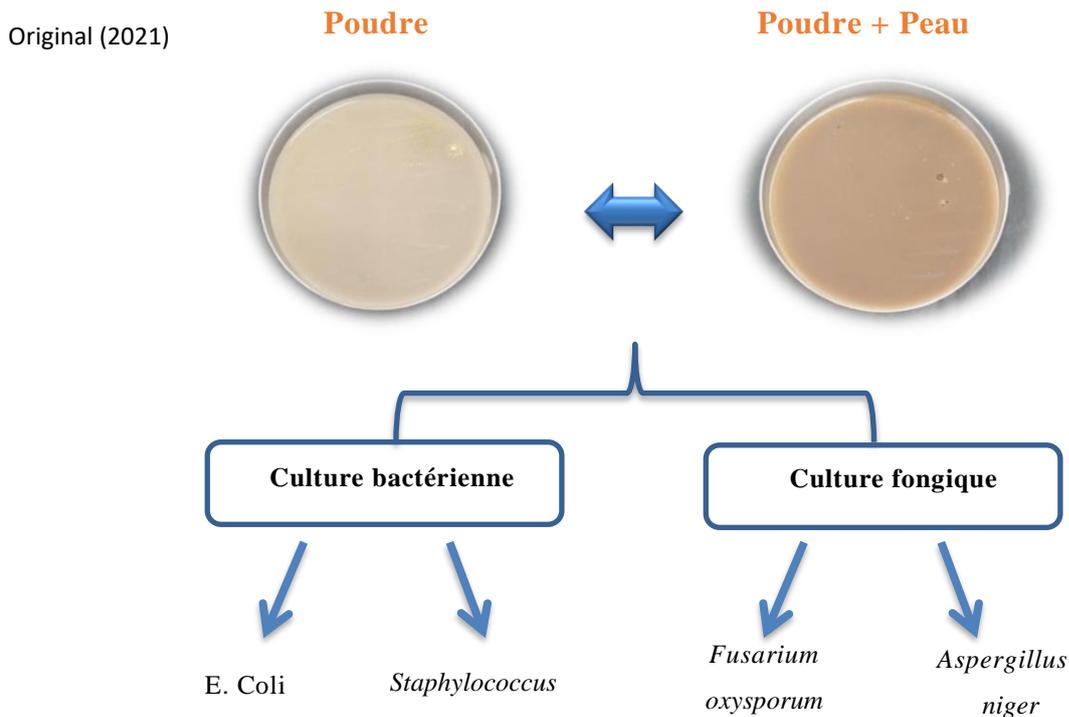


Figure 15 : Protocole d'évaluation et d'ensemencement des microorganismes.

#### 4.1. Initiation et preparation des souches bacteriennes

Dans des conditions stériles, prélever une colonie isolée et représentative de la souche étudiée à l'aide d'une pipette pasteur ; étaler en stries sur une nouvelle boîte de milieu de culture d'initiation, c'est-à-dire un milieu contenant les éléments nutritifs dont elle a besoin pour commencer à se développer, puis l'ensemble est incubé à la température optimale de développements de la souche pendant 18 à 24 heures. Au bout de quelques heures (24h), une partie des cellules bactérienne ensemencées se transforme en colonie présentant un aspect duveteux colorée ou pas. Il s'agit du stade d'initiation ou de reviviscence.

La colonie continue à proliférer tant qu'elle est maintenue dans ce milieu d'initiation. Pendant la phase de prolifération, il est possible de la cryoconserver dans l'azote liquide afin de l'utiliser plus tard pour relancer le processus de nouveau.

#### 4.2. Ensemencement bacterien

La suspension bactérienne de chaque souche préparée à partir d'une culture jeune (24h), car un inoculum trop faible peut donner des colonies isolées, est diluée dans de l'eau physiologique de manière à renfermer  $10^8$  germes/ml, est d'abord ensemencée en surface

sur les différents milieux de culture préparés à partir des extraits de cactus coulés en boîtes de Pétri, l'ensemencement a été fait en stries transversales. L'inoculation des souches bactériennes était faite à côté d'un bec bunsen. Les matériels de prélèvement et de transfert de l'inoculum sont directement stérilisés à la flamme. Les milieux ainsi ensemencés sont transférés à l'incubateur (étuve). La durée d'incubation été de 24 à 48 heures, à une température de  $32\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

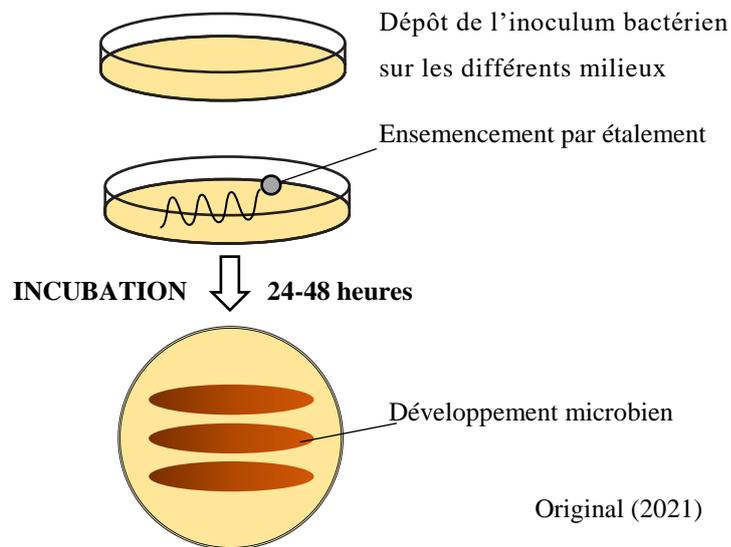


Figure 16 : Mise en culture et évaluation de la croissance bactérienne.

Les surfaces des nappes de croissance bactérienne à la surface de chaque milieu de culture seront comparées entre eux afin de classer ces différents milieux et interpréter la sensibilité des souches bactériennes à chaque milieu de culture.

### 4.3. Ensemencement fongique

Les différents milieux de culture à base de poudre de cactus sont ensemencés par un dépôt de fragments de 5 mm de diamètre de chaque souche fongique (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*) au centre de la boîte de Pétri.

Ces fragments de champignons sont prélevés à partir d'un tapis mycélien issu de culture jeune de 7 jours. L'incubation se fait à l'obscurité à  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .

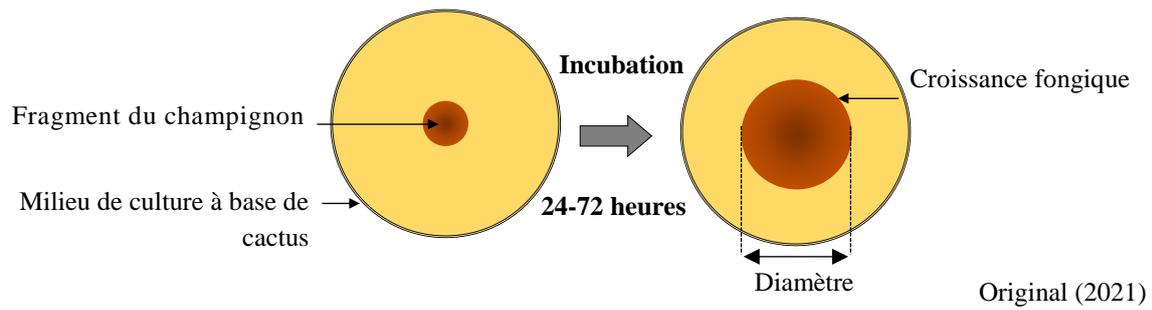


Figure 17 : Mise en culture et évaluation de la croissance fongique.

La croissance mycélienne a été mesurée chaque jour, à la même heure, à l'aide d'une règle graduée, dans deux directions perpendiculaires passant par le centre de l'explant et ôtée du diamètre de l'explant, la moyenne de deux diamètres perpendiculaires et seront comparées entre eux afin de classer ces différents milieux et interpréter la sensibilité des souches fongique à chaque milieu de culture.

# **Chapitre 02 :**

## ***Résultats et Discussion***

## Chapitre 02 : Résultats et discussion

Cet avant-dernier chapitre présente les résultats obtenus durant tout le processus expérimental et leur discussion.

### 1. Analyses des propriétés physico-organoleptiques

Dans cette partie de travail, nous visons la caractérisation des propriétés physico-organoleptiques. De ce fait, après préparation les différents milieux de culture ont subi une batterie de tests. Le tableau 06 montre les rapprochements et les différences dans les valeurs physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques.

Tableau 6 : Caractéristiques physico-organoleptiques.

	MCPR	MCSPPR	MCPT1	MCSPT1	MCPT2	MCSPT2
<b>Caractéristiques physiques</b>						
Densité	1.023	1.011	1.021	1.015	1.030	1.023
Cendre	2.5	2.21	1.85	1.05	2.3	1.92
pH	5.52	5.89	5.12	4.75	5.50	5.21
CE	6,22	6,08	6.75	6.85	6.44	6.38
<b>Caractéristiques organoleptiques</b>						
Couleur	Jaune clair	Jaune foncé	Marron foncé	Marron clair	Jaune clair	Transparent
Odeur	Absence d'odeurs étrangères ou anormales					
Consistance et Viscosité	Plus ou moins solide selon concentration de la poudre dans l'eau (solide : 20~25g/200ml)					
Texture	Sensiblement homogène ; pas de séparation en deux phases liquide et solide.					

D'après les résultats consignés dans le tableau 06, nous pouvons souligner que :

**La couleur :** les milieux préparés à partir de la poudre de cladode sans épluchage ont une couleur foncé ou verdâtre. Cette couleur est généralement due à la présence du pigment de chlorophylle. Pour les autres milieux deux couleur sont observé le jaune et le marron.

Par ailleurs ce même tableau montre que les différents milieux se caractérisent par

**CE :** les valeurs de CE obtenues varient entre 6,08 et 6,85. On constate une légère différence de conductivité électrique entre les six échantillons, et entre échantillon provenant de la même région sans et avec peau.

**pH :** Le pH des milieux de culture varie entre 4.75 et 5.89 est bien conforme avec le seuil de tolérance d'un grand nombre de bactéries et champignons, qui exigent un pH entre 4,5 < pH < 6 (Etienne, et al., 1953). Il est indispensable de contrôler le pH des milieux de culture pour une bonne croissance des micro-organismes. Un milieu agressif peut inhiber le développement des microorganismes en culture. D'après (Sadok, et al., 2006) une acidification ou une alcalinisation importante du milieu a pour effet de ralentir considérablement la croissance bactérienne, voire d'entraîner la mort cellulaire lorsque des enzymes indispensables sont inhibées.

**Taux de cendre :** le taux de cendre dans les poudres à base de cladode avec peau est plus évalué que les poudre sans peau, ceci donne une idée sur la composition minérale des cladodes.

**La viscosité :** la viscosité est un facteur technologique important qui est en relation avec la teneur en substances insolubles dans l'alcool : Protéines, pectines, polysaccharides (Gallais, et al., 1992). Elle est l'effet combiné des liquides, matière soluble, insoluble en suspension qui contribuent à la consistance générale de la pâte d'un milieu de culture. Les résultats de viscosité des échantillons analysés nous ont permis de classer les différents milieux comme plus ou moins solide.

**Densité :** les différents milieux possèdent des valeurs de densité très proches les unes des autres et cela, quelle que soit l'origine de la zone de cueillette et la manière de préparation du milieu (poudre sans ou avec peau).

Selon (Bouzillé, 2014), ces paramètres physiques organoleptiques sont influencés par l'origine intrinsèque (génétique) de la plante utilisée ainsi que par les changements des conditions de croissance des différents environnements (conditions édaphiques et climatiques).

Bien que ce travail ne traite pas la composition chimique du cactus, mais les propriétés physico-organoleptiques étudiées malgré qu'elle reste insuffisante, elle illustre des différences dans ces propriétés physico-organoleptiques entre les différentes plantes utilisées dans la préparation des différents milieux de culture.

## 2. Effet des différents milieux sur la croissance microbienne

### 2.1. Criblage de croissance bactérienne

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué après incubation il a permis d'effectuer une première caractérisation du niveau de croissance et du développement bactérien. Les résultats de l'analyse de croissance bactérienne sont résumés dans tableau 07

Tableau 7 : Représentation simplifiée de la croissance des microbienne

	M CPR	M C SPR	M C P T <sub>1</sub>	M C S P T <sub>1</sub>	M C P T <sub>2</sub>	M C S P T <sub>2</sub>
<b>E. coli</b>	-	+++	-	+	-	++
<b>Staphylococcus</b>	-	+++	-	+	-	+++

Légende :

- (+++): Forte croissance des micro-organismes,
- (++): Croissance modérée des micro-organismes,
- (+): Faible croissance des micro-organismes,
- (-): Absence de colonies microbiennes.

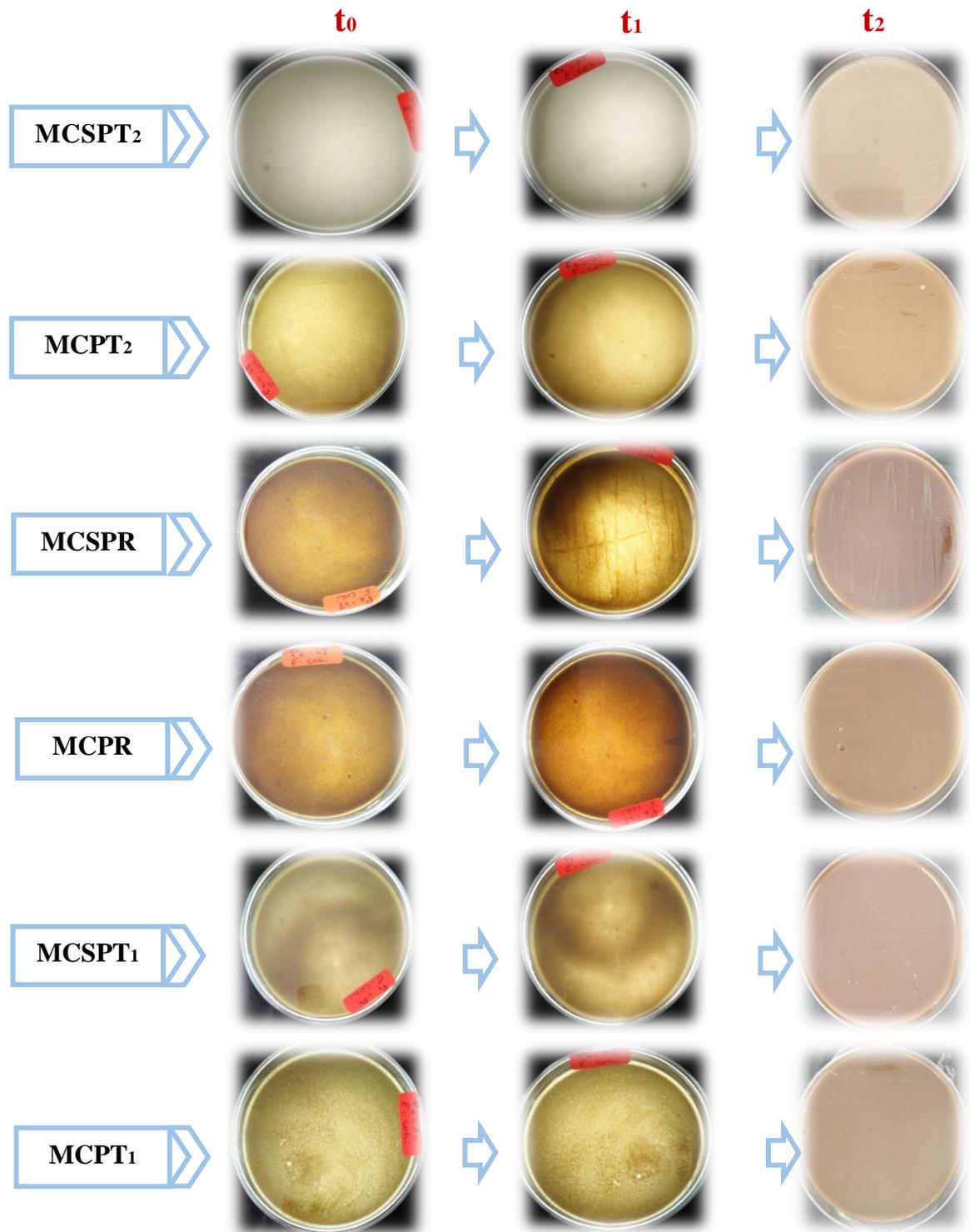


Figure 18 : Résultats de la croissance d'E. Coli dans différents milieux.

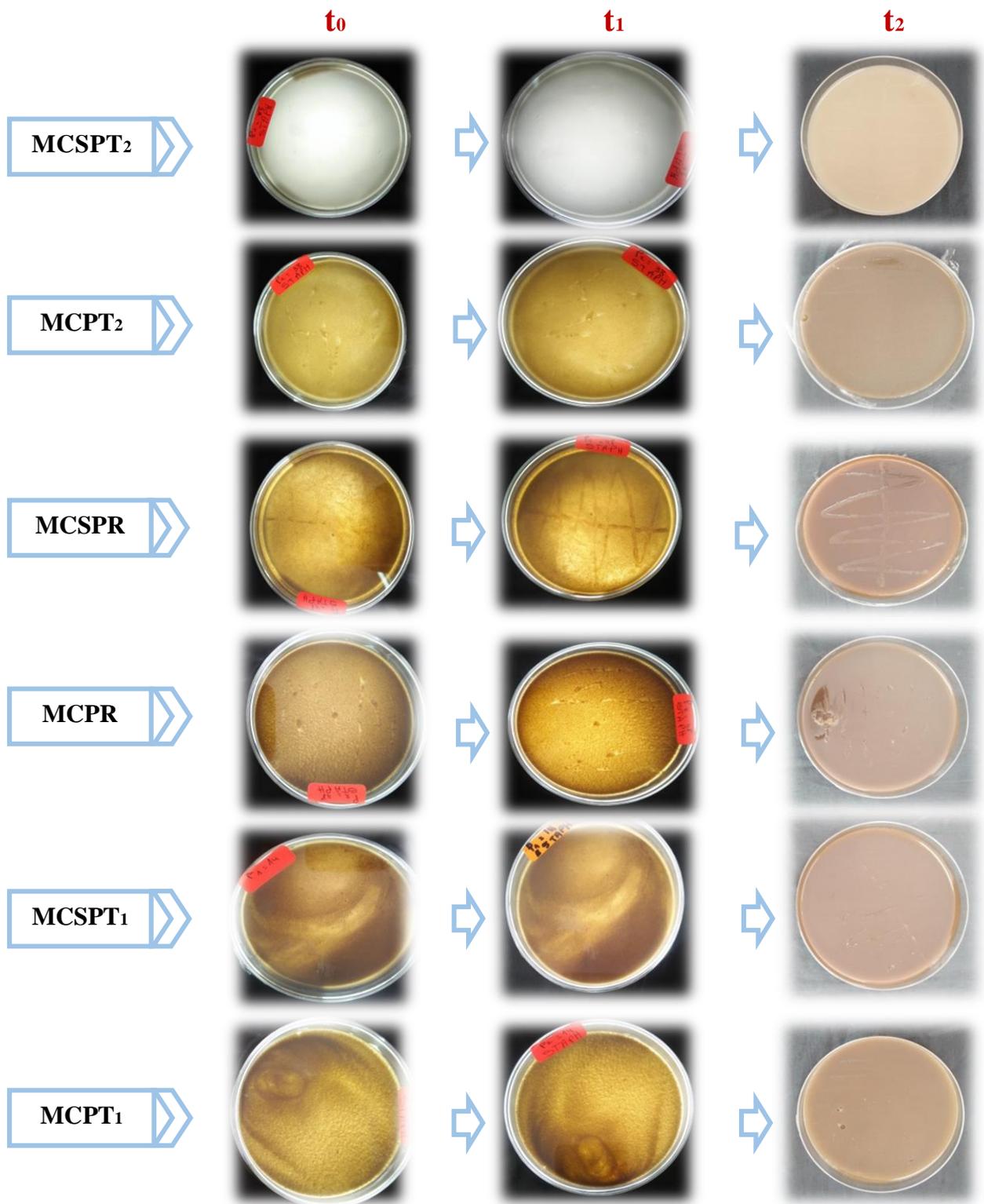


Figure 19 : Résultats de la croissance de *Staphylococcus* dans différents milieux.

Les résultats rassemblés dans le tableau 07 et figure 18 et 19 montrent qu'après 48 heures d'incubation, dans les 6 milieux de culture, il a été observé :

- Les différents milieux de culture peuvent être classés en deux catégories, ceux qui ont enregistré une croissance plus ou moins importante (+++), c'est la classe qui regroupe des milieux préparés à partir de poudre de cladode sans peau : **MCSPR ; MCSPT2**.
- La deuxième catégorie est celle des milieux qui n'ont pas enregistré une croissance microbienne (-), les milieux à base de poudre de cladode avec peau appartiennent à cette classe : **MCPR ; MCPT1 ; MCPT2**. Ces résultats indiquent que la peau de cladode aurait un effet inhibiteur sur le développement des deux souches bactérienne.
- Il a été aussi remarqué qu'une faible formation de colonies (+) a été observée dans le milieu **MCPST1**.

La croissance bactérienne n'est pas similaire à chaque milieu de culture, puisque les facteurs influant sur la croissance et prolifération microbienne *in-vitro* peuvent être liés aux :

- Facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures notamment leur composition, les bactéries doivent trouver dans leur environnement les substances nécessaires à leur énergie et à leurs synthèses cellulaires.
- Facteurs internes, liés à l'organisme bactérien ou champignon, en culture : et d'autre part l'état physiologique de l'organisme mère sur lequel, l'échantillon a été prélevé ;

L'absence de croissance bactérienne dans tous les milieux à base de cladode avec peau (**MCPR, MCPT1, MCPT2**), indique la présence d'une substance inhibitrice dans la peau de cactus, et exprime ainsi la sensibilité des différentes souches à cette substance.

## 2.2. Criblage de Croissance fongique

La deuxième phase de ce travail a consisté à évaluer la croissance radiale mycélienne sur les différents milieux de culture.

Les résultats relatifs aux effets des milieux de culture en culture *in vitro* sur la croissance radiale du mycélium sont représentés à la figure 20.

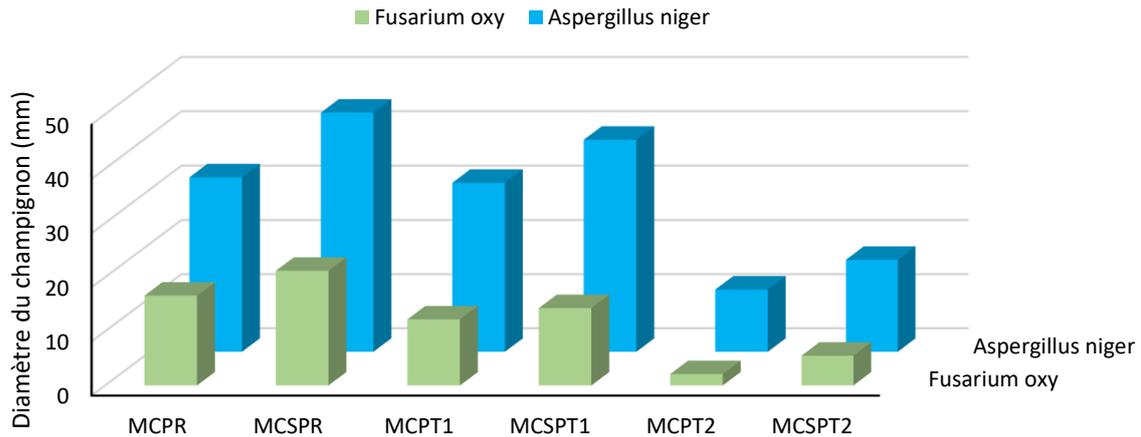


Figure 20 : Croissance radiale mycélienne sur les différents milieux.

L'examen des diamètres de croissance radiale des mycéliums est le premier examen effectué après incubation, il permet d'effectuer une première caractérisation du niveau de croissance microbien dans chaque milieu.

A l'issue de ces résultats il est clair qu'après cinq jours de l'ensemencement, les diamètres de croissance radiale ont varié en fonction du milieu de culture, et en fonction de la souche en culture, le diamètre des mycéliums le plus élevé a été observé avec la souche *Aspergillus niger* et ce quel que soit le milieu de culture, avec des diamètres de 44,1 mm sur le milieu MCSPR, suivi de 39 mm sur le milieu MCSPT1.

Ces résultats indiquent aussi que les différents milieux préparés à partir de poudre de cladode avec peau auraient un effet négatif sur la croissance de la souche puisqu'il a été remarqué que les meilleures croissances radiales ont été toujours enregistrées dans le milieu de cladode sans peau.

En plus, on a constaté que l'inoculum *Fusarium oxysporum* a enregistré le plus court mycélium sur tous les milieux.

Toutes ces tests *in vitro* montrent que les six milieux de culture testés dans cette étude, ont été prématurément sujets aux infections. Ceci serait dû à leur forte concentration en nutriments qui aurait attiré des bactéries qui ont une croissance plus rapide par rapport aux champignons cultivés.

Les résultats relatifs à l'évolution du diamètre du mycélium des deux souches sur les différents milieux de culture tout au long de la période d'observation sont représentés aux figures 21 et 22.

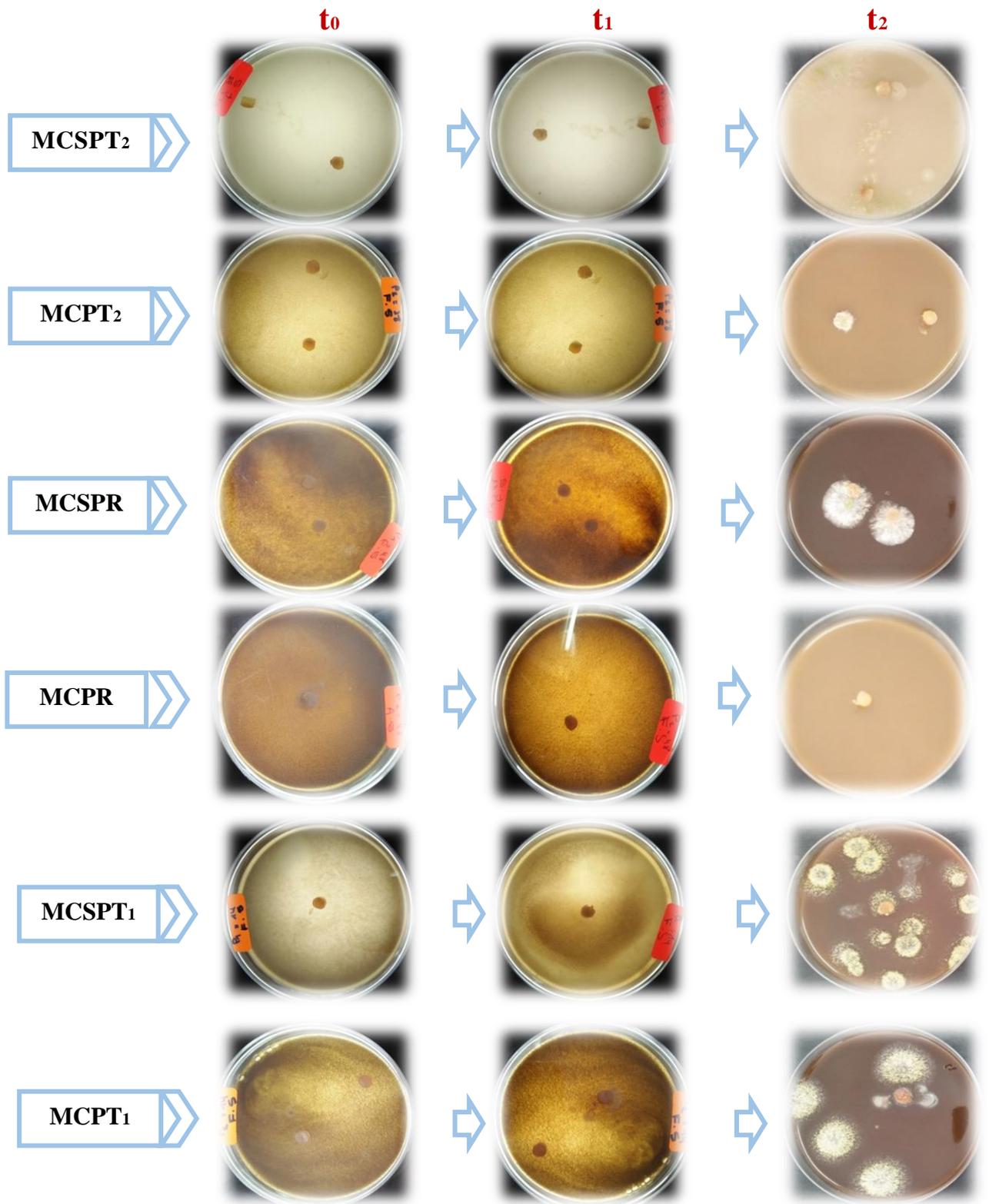


Figure 21 : Résultats de la croissance de *Fusarium oxysporum* dans différents milieux.

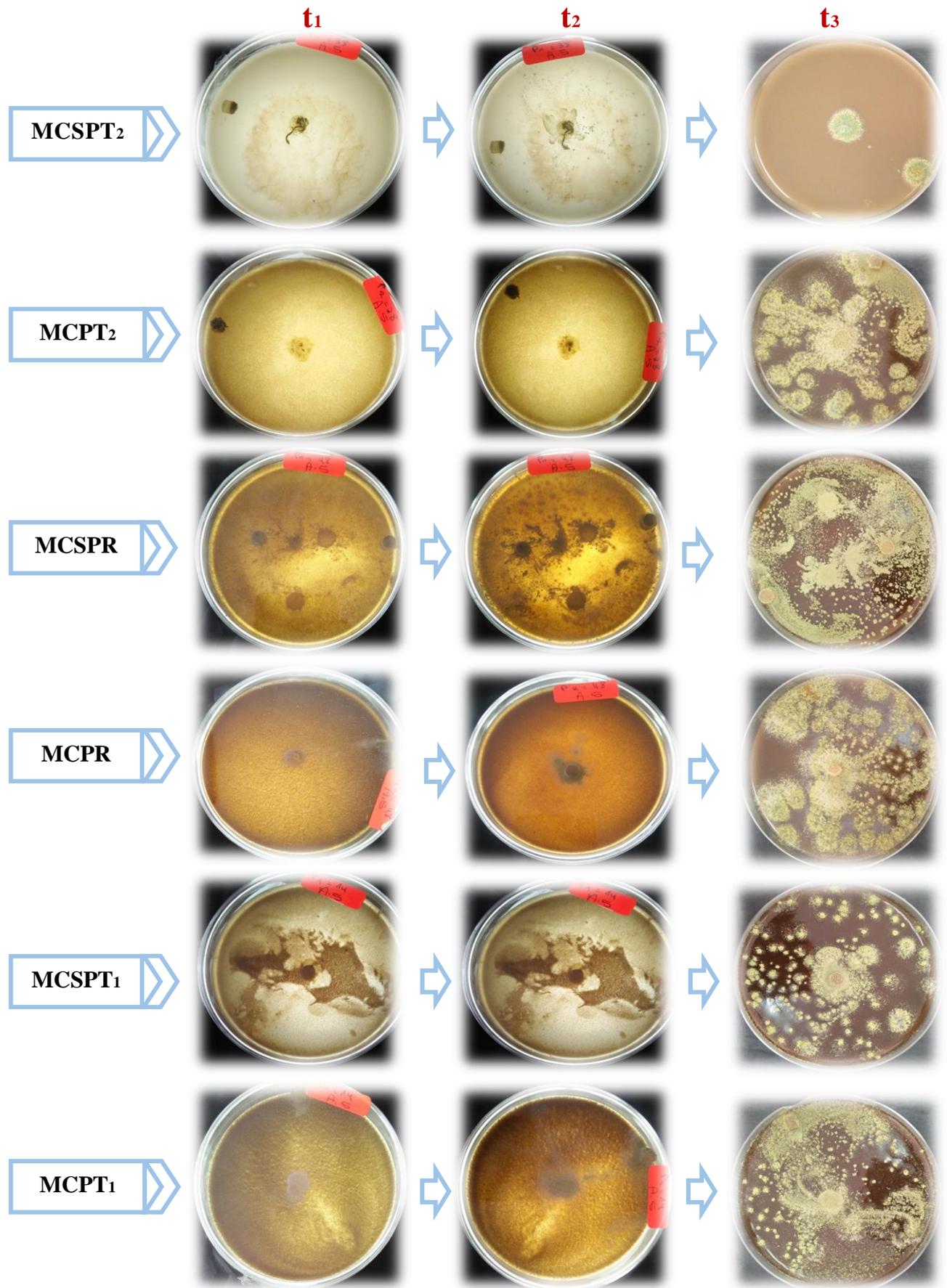


Figure 22 : Résultats de la croissance d'*Aspergillus niger* dans différents milieux.

Légende :

- **t<sub>1</sub>** : Après 24h
- **t<sub>2</sub>** : Après 48h
- **t<sub>3</sub>** : Après 72h

Les résultats trouvés ont montré qu'il y a eu d'effets des milieux de culture sur le développement des champignons en culture *in vitro*. Plusieurs auteurs (Dibaluka, et al., 2010) ont rapporté que, le taux et la quantité de croissance des différentes souches des champignons du genre *Fusarium* et *Aspergillus* diffèrent d'un milieu de culture à un autre.

Le comportement de la souche *Fusarium oxysporum* a été différent d'un milieu de culture à l'autre, la plus faible croissance diamétrale a été enregistrée avec cette souche. Selon (Stanley, 2010), la culture des microorganismes présente aussi un problème d'adaptabilité des souches sur les milieux de culture, puisque, certaines souches ont des préférences pour tel ou tel autre milieu spécifique.

# ***Conclusion***

## CONCLUSION

De nombreux territoires sont à la recherche de nouveaux leviers de développement valorisant davantage leurs ressources parmi lesquelles les ressources agricoles capables de soutenir la sécurité alimentaire, de créer des revenus et d'enclencher une dynamique territoriale surtout en milieu rural. Dans cette gamme de produits agricoles, figure le figuier de barbarie. Cette ressource connaît actuellement un regain d'intérêt dans plusieurs pays en raison de sa contribution dans la mise en valeur des terres marginalisées et des zones arides et semi-arides, son adaptation à divers climats et sols, ainsi que ses multiples utilisations.

Certains pays voisins (Tunisie et Maroc) ont fait de cette ressource de véritables produits économiques, à partir de ses raquettes, ses fleurs, ses fruits, en préparant de multiples denrées (le jus, la confiture, le vinaigre, etc.) mais aussi une vaste gamme d'ingrédients pour des produits cosmétiques médicinaux. Ce qui engendre des revenus, une amélioration du niveau de vie, une réduction de l'exode rural, cela pourrait même participer à la réduction des distorsions territoriales.

Dans ce contexte, viens cette étude, qui a pour objectif la valorisation de cette ressource dans l'obtention de produits à haute valeur ajoutée a travers la formulation d'un nouveau milieu de culture *in vitro*, à base des extraits de poudre de raquettes de figuier de barbarie, et d'évaluer les propriétés et les capacités de ce nouveau milieu de culture à satisfaire les besoins nutritifs de quelques microorganismes.

Les principaux résultats obtenus, nous ont permis de constater une nette différence dans le comportement des deux souche fongiques et bactériennes dans les différents milieux de culture. En effet, MCSPR, MCSPT1, MCSPT2 sont plus productif et affiche le meilleur rendement en terme de croissance des deux microorganismes, par rapport à MCPR, MCPT1, MCPT2. La croissance des microorganismes n'est pas similaire à chaque milieu de culture, puisque les facteurs influant sur la croissance et prolifération microbienne in-vitro peuvent être lie aux facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures notamment leur composition,

Ce point de vue est aussi appuyé par les résultats des analyses de la composition chimique des extraits de raquettes de cactus ayant fait l'objet de cette étude, et confirme bien la spécificité de chaque milieu, nous avons trouvé qu'une stimulation de la croissance semble être observée dans les milieux qui ont une CE élevée, et un pH élevé,

cette relation peut donner une idée sur la composition minérale, un élément important dans un milieu nutritif.

Pour conclure, on peut qualifier notre milieu comme un milieu ordinaire recommandé pour la culture de certaines bactéries et champignons n'ayant pas d'exigence nutritive particulière.

Cette étude n'a pas la prétention d'être exhaustive. Elle est principalement limitée par le temps alloué pour la réalisation et le manque des références.

Le contenu est évidemment perfectible et ne constitue qu'une contribution pour répondre au mieux aux termes de références de l'étude. Comme complément à la présente étude et comme perspectives, les points suivants nous semblent assez pertinents :

- Pousser les recherches par une analyse complète de la composition chimique de la plante.
- Prévoir des études plus approfondies in vitro sur d'autres microorganismes.

## **Bibliographie**

**Benkhetou Abdelkader [et al.]** DIVERSITÉ FLORISTIQUE DU MASSIF DU NADOR EN ZONE STEPPIQUE (TIARET, ALGÉRIE) [Article]. - Juillet 2015. - European Scientific Journal. - No.21 : Vol. vol.11.

**BOUSSENA SABRINA** Manuel des travaux pratiques de bactériologie [Ouvrage]. - 2020. - Institut des Sciences Vétérinaires Département de Productions Animales : p. 12.

**Habibi Youssef** Contribution à l'étude morphologique, ultrastructurale et chimique de la figue de barbarie. Les polysaccharides pariétaux: caractérisation et modification chimique [Ouvrage]. - 2004. - HAL Id: tel-00006273 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006273>.

**Khadir Abdelmounaim** [eleam.univ-oran1.dz](http://eleam.univ-oran1.dz) [En ligne] // <https://eleam.univ-oran1.dz>. - 20 Juin 2021.

**Schweizer Marc** Docteur nopal le médecin du bon dieu [Ouvrage]. - 1997. - APB Aloe Plantes et Beauté 235, rue du Faubourg Saint-Honoré F-75008 PARIS (France) : p. 5.

**J-P Montoroï** Conductivité électrique de la solution du sol et d'extrait aqueux de sol [Article]. - France : Laboratoire des formations superficielles -32, Avenue Henri Varagnat,, 1997. - 93143.

**ADEME** Mesure des caractéristiques des combustibles bois [Ouvrage]. - [s.l.] : Crit Bois- Fibois -CIBA, Juillet 2001.

[alloprof.qc.ca](http://alloprof.qc.ca) [En ligne] = alloprof // [htt://www.alloprof.qc.ca/fr](http://www.alloprof.qc.ca/fr). - 29 06 2021.

**ANOFEL** Aspergilloses et autres champignons filamenteux opportunistes [Ouvrage]. - 2014. - © UMVF - Université Médicale Virtuelle Francophone : p. 6.

**Arba M** Le cactus opuntia, une espèce fruitière et fourragère pour une agriculture durable au Maroc [Ouvrage]. - 2009. - p. 220 .

**Bannani M R** Le spécialiste du cactus Bio [Ouvrage]. - 2011. - NopalTunisie. Kasserine : pp. 1-19.

**Bencharif A et Rastoin J-L** Concepts et méthodes de l'analyse de filières agroalimentaires [Revue]. - Montpellier : CIHEAM, 2007.

**Benjilali B et Zrira S** Plantes aromatiques et médicinales ; Atouts du secteur et exigences pour une valorisation durable [Revue]. - Rabat : ACTES, IAV Hassen II, 2005. - p. 346.

**Bensakhria Ayoub** [Magazinescience.com](http://Magazinescience.com) [En ligne] // <https://www.magazinescience.com>. - 13 JUIN 2021.

**Bensalem H, Nefzaoui A et Bensalem L** Supplementation of *Acacia cyanophylla* Lindl foliage-based diets with barley or shrubs from arid areas (*Opuntia ficus-indica* f. *inermis*) and *Atriplex nummularia* L.) on growth and digestibility in lambs. [Ouvrage]. - 2002. - *Animal Feed Sciences and Technology*, : p. 15-30.

**Bernard Le Gorrec, Claude Montella et Jean-Paul Diard** Equilibres chimiques et électrochimiques en solution aqueuse [Ouvrage]. - Paris : Hermann éditeurs des sciences et des arts, 2007. - 978 2 7056 6700 9.

**BOUTALBI Nidhal** compte rendu du TP de Microbiologie [Conférence]. - 2002-2003.

**Bouzillé Jan-Bernard** Connaissance de la biodiversité végétale, démarches et outils technologiques [Ouvrage]. - Paris : Lavoisier, 2014. - 1e : pp. 1-304.

**CASTEGNARO M et PFOHL-LESZKOWICZ A** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans la sécurité alimentaire du consommateur [Ouvrage]. - 2002. - Lavoisier, Tec&Doc. .

**Cherif E** Figue de barbarie : Un cactus source de richesse [Ouvrage]. - 2016. - *L'essentielle de l'agroalimentaire et de l'agriculture N°100*. Agro ligne : p. 68.

**CLAUDE chastal** histoire des virus de la variole sida [Ouvrage]. - Paris : [s.n.], 1992. - Boubées 1992 : p. 413.

**CLAVE Danielle** Fiche technique \_ Bactériologie [Article]. - 13 Novembre 2015. - Expert biologiste - Bactériologie CHU TOULOUSE. - p. 1.

**cout Centre régional pour l'eau potable et l'assainissement à faible** Protocol de détermination des paramètres physico-chimiques et bactériologiques [Ouvrage]. - Janvier 2007.

**Defelice M.S** Prickly pear cactus, *Opuntia* spp. [Ouvrage]. - 2004. - *Aspinetingling tale. Weed Technology*. : p. 869-877.

**Démi huet** La culture des cactées et des plantes succulentes [Ouvrage]. - 2009. - Editions Numériques : p. 48.

**Dibaluka S [et al.]** Essais de culture de quelques champignons lignicoles comestibles sur divers substrats lignocellulosiques [Revue] // *Biotechnol Agron. Soc. Environ.*, - 2010. - pp. 417-422.

**Etienne Wolff, Katy Haffen et Madeleine Kiény** Essais de cultures in vitro d'organes embryonnaires en milieux synthétiques [Revue]. - Paris : *J. Embryol. exp. Morph.*, 1953. - 1 : Vol. 1. - pp. 55-84.

**Evêque V D** optimisation of tissues cultures for Opuntia [Ouvrage]. - 1995. - thésis, University of Texas, [http // www. Lawrence.edu/Fast/magnov/Valthesis. html](http://www.Lawrence.edu/Fast/magnov/Valthesis.html).

**Gallais A et Bannerot H** Amélioration des espèces végétales cultivées : objectifs et critères de sélection [Revue]. - Paris : INRA, 1992. - pp. 379-391.

**Geoffrey..C-P.** Food Science and technology [Ouvrage]. - USA : John Wiley and son, 2011. - p. 520.

**Guiraud J-P** Microbiologie alimentaire [Ouvrage]. - Bruxelles : Dunod, 1998. - p. 390.

**HIRECHE Messaouda** Etude de l'activité antioxydante de la tomate séchée [Ouvrage]. - 2013.

**Inglese Paolo, Barbera Guisepe et La Mantia Tommaso** Research strategies and improvement of cactus pear ( Opuntia ficus indica ) fruit quality and production [Ouvrage]. - 1995. - Journal of Arid Environnements .

**Marchal N, Bourdon J L et Richard D** les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries [Ouvrage]. - 1987. - DOIN EDITEURS 8 place de d'Odéon 75006 Paris : p. 4 7.

**Michel M** Encyclopédie of medicinal plants [Ouvrage]. - 1998. - librairie du Liban publishers .

**Mounir M** Application des biotechnologies post-récolte pour la valorisation des produits de terroirs marocains par des microorganismes sélectionnés impliqués dans la fermentation de fruits : cas du vinaigre. [Ouvrage]. - 2016. - Thèse doctorat Maroc.

**Mulas M** Medicinal properties and yield possibilities of the prickly pear (Opuntia spp.) in the Mediterranean Environment [Ouvrage]. - 1993. - Acta Horticulturae : pp. 79–84. .

**Neffar S** Etude de l'effet de l'âge des plantations de figuier de Barbarie (Opuntia ficus indica L. Miller) sur la variation des ressources naturelles (sol et végétation) des steppes algériennes de l'Est. Cas de Souk- ahras et Tébessa. Thèse de doctorat [Ouvrage]. - 2012. - Université de badji mokhtar. Annaba.

**NIAT Si hassan et OUAFIK Naoufal** rapport de microbiologie [Rapport]. - settaf : faculté des sciences et techniques .

**Nielsen S-S** Food Analysis Laboratory Manuel [Ouvrage]. - New York . USA : Kluwer Academic Plenum Publishers, 1997. - p. 800.

**Orwa C [et al.]** Agro forestree Database: a tree reference and selection guide version 4.0 <http://www.worldagroforestry.org/af/treedb> [Ouvrage]. - 2009.

**RANDRIANARISOA Salohy** ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DES FLORES BACTERIENNES SAUVAGES DU FRUIT D'Opuntia ficus indica, FAMILLE DES CACTACEAE [Ouvrage]. - 2015. - UNIVERSITE D'ANTANANARIVO : p. 3.

**Reyes Agüero et Valiente Banuet** Reproductive biology of Opuntia [Ouvrage]. - 2006. - A review. Journal of Arid Environments : pp. 549-552.

**Sadok D et Zedak S** Etude de Qualité Physico-chimique et Microbiologique [Revue]. - 2006.

**Sáenz C** Agro-industrial utilization of cactus pear. FAO. [Ouvrage]. - 2013. - Agricultural Services of FAO. Roma.

**Sáenz C** Agro-industrial utilization of cactus pear [Ouvrage]. - 2013. - FAO. Agricultural Services of FAO. Roma : pp. 162:4-30.

**Stanley H** Effect of substrates of spawn production on mycelial growth of oyster mushroom species [Revue]. - [s.l.] : Agriculture and Biology Journal of North America, 2010. - 5 : Vol. 1. - pp. 817-820.

**TABUC Cristina** FLORE FONGIQUE DE DIFFERENTS SUBSTRATS ET CONDITIONS OPTIMALES DE PRODUCTION DES MYCOTOXINES [Ouvrage]. - 2007. - UPSP de Mycotoxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse Laboratoire Biologie Animale, IBNA Balotesti : pp. 25-26.

**Walali LOUDYI** Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc [Ouvrage]. - 1995. - DEPARTEMENT D'HORTICULTURE INSTITUT AGRONOMIQUE ET VETERINAIRE HASSAN II : p. 53.

www.uness.fr [En ligne] // [https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Milieu\\_de\\_culture](https://fr.m.wikipedia.org/wiki/Milieu_de_culture). - 2 MAI 2021.

**Yang L [et al.]** Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential bio fuel feed stocks [Ouvrage]. - 2015. - biomass and bio energy 76 : pp. 43-53.