

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

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 : Sciences biologiques

Spécialité : Génétique moléculaire et amélioration des plantes

Présenté par :

BEN FATMA Hayet

OUANID Imen

YAHY BOCHRA

Thème

Conception et évaluation d'un milieu de culture à base d'extraits
végétaux spécifique à la culture *in vitro*

Soutenue le : 00 / 07 / 2021

Devant le jury composé de :

Jury:

Présidente Mme. SOUALMI Nadia

Promoteur Mr. BOUFARES KH

Examineur Mr. CHOUHIM K

Année universitaire 2020 - 2021

Remerciements

Avant tout, nous remercions ALLAH tout puissant de nous avoir guidé

Tout au long de nos vies qu'il nous a donné courage et patience pour passer tous les moments difficiles et qu'il nous a permis d'achever ce travail et de pouvoir le mettre entre vos mains aujourd'hui.

Tout d'abord nous remercions notre encadreur M. Boufares Kh qui a accepté de nous encadrer pour nous avoir toujours soutenue, conseillée et guidée.

Nous remercions également Mme Soualmi N qui a accepté de présider ce jury et M. Chouhim K d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Dédicace

❖ À ma grand-mère

❖ À mon père

C'est pour moi l'occasion de vous remercier pour tous les services que vous m'avez rendus. Que ce travail soit pour vous l'expression de ma profonde affection et ma reconnaissance pour les efforts consentis.

❖ À ma mère

Avec l'âge, j'ai mieux compris encore toute la tendresse et la valeur des sacrifices pour l'avenir de toute la famille. Je voudrais par le biais de ce modeste travail, pouvoir à mon tour t'entourer de soins et te payer mon immense dette de gratitude.

❖ À tous mes frères, mes cousins, cousines

Restons solidaires car l'union fait la force, persévérons.

❖ À monsieur Boufares Khaled

❖ À tous ceux qui ont participé à ma formation

Imen

Dédicace

- ❖ Je dédie ce travail à :
- ❖ Mes chers parents
- ❖ Mes frères
- ❖ Mes sœurs
- ❖ Mes amies
- ❖ A tous ceux qui ont participé à ma formation

Bohra

Dédicace

A mes parents, Pour tout ce que vous m'avez inculqué et appris. A mon père, pour sa présence pour les sacrifices et l'amour inlassable que tu as consenti pour mon bien être, mon instruction et ma réussite. Merci pour ta confiance. A ma mère, pour l'amour et le soutien que tu m'as apportés. Pour avoir toujours cru en moi. Ta présence et tes encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis et de ce que je fais. Que cette thèse témoigne de mon respect et de mon amour.

A mon frère KHALED

Mes sœurs HALIMA et GHANIA

À toute ma famille, A tout mes ami surtout CHEBIL.K et BELGHANDOZE , T HATAB.N et KASMI.T et trinôme IMAN et BOUCHRA

Hayet

Table des matières

Liste des tableaux	i
Liste des figures	i
INTRODUCTION.....	1
Synthèse bibliographique	2
Chapitre 01 : Figuier de barbarie.....	2
1. Generalité	2
1.1. Taxonomie du figuier de barbarie.....	2
1.2. Classifications	2
1.3. Description morphologique	3
1.4. Description botanique	4
1.5. Physiologie de la plante	5
1.5.1. La plantation de la figue de barbarie	6
1.6. Composition de la figue de barbarie	7
1.7. Exigences écologiques du figuier de barbarie	8
1.7.1. Facteurs édapho-climatiques.....	8
1.7.2. Facteurs biotiques	8
1.8. Historique et origine	9
1.9. Figue de barbarie dans le monde	9
1.10. Distribution géographique de la figue de barbarie dans le monde	10
1.10.1. En Afrique	11
1.10.2. En Algérie.....	12
1.11. Utilisation du figuier de barbarie	12
1.11.1. Utilisation agro-industriel.....	12

1.11.2. Utilisation médicinale.....	12
1.11.3. Utilisation comme source d'énergie	13
1.11.4. Cactus et environnement.....	15
Culture <i>in vitro</i>.....	16
Chapitre 02 : Culture <i>in vitro</i>	16
1. Généralité	16
1.1. Définition	16
1.2. Historique.....	16
1.3. Applications de culture <i>in vitro</i>	17
2. Techniques de culture <i>in vitro</i>	17
2.1. Micropropagation	17
2.2. Organogénèse	17
2.3. Culture de méristème	18
2.4. Microbouturage	18
2.5. Embryogénèse somatique.....	19
2.5.1. Principales étapes de l'embryogénèse somatique.....	20
2.6. Haplo-diploïdisation	20
3. Facteurs influençant la culture <i>in vitro</i>	21
3.1. Lumière et la photopériode	21
3.2. Température	21
3.3. Milieu de culture	21
3.3.1. Les éléments minéraux	22
3.3.2. Les éléments organiques.....	22
Partie expérimentale.....	23

Chapitre 01 : Matériel et méthodes	23
1. Matériel	23
1.1. Matériel végétal	23
1.2. Matériel biologique.....	23
2. Principales étapes pour l'élaboration du milieu de culture.....	24
2.1. Techniques de préparation des milieux de culture	25
2.1.1. Milieu au poudre	25
2.1.2. Milieu au mucilage.....	27
3. Analyse de la composition des milieux de culture	27
3.1. PH.....	27
3.2. Conductivité électrique	27
3.3. Cendres	28
3.4. Densité	28
3.5. Dosage des protéines	29
3.6. Sucres totaux	30
4. Méthodes microbiologiques.....	31
4.1. Ensemencement bacterien par inondation	31
4.2. Ensemencement fongique.....	32
Chapitre 02 : Résultats et discussion.....	34
1.1. Analyses des propriétés physico-organoleptiques	34
1.1.1. La densité	35
1.1.2. Le pH.....	35
1.1.3. La Conductibilité électrique.....	36
1.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles	36
1.2.1. La teneur en protéines	36

2. Effet des différents sur la croissance microbienne	37
2.1. Effet des différents milieux sur la croissance bacterienne	37
2.2. Effet des différents milieux sur la croissance fongique	40
CONCLUSION	42
Bibliographie	44

Resume

L'objectif de la présente étude était de contribuer à la mise en place d'un nouveau milieu de culture, à base d'extraits de figuier de barbarie (*Opuntia Ficus indica*), et d'évaluer ses propriétés et ses capacités à satisfaire les besoins nutritifs de deux microorganismes. Trois types de substrats ont été utilisés. Il s'agit de poudre de cladode sèche (épluchée ou pas) et du mucilage de cactus obtenu par décoction.

À l'issue de cette étude, le type de substrat utilisé dans la préparation des différents milieux a fortement influencé la croissance des deux microorganismes en culture *in vitro*. Les meilleures performances en termes de croissance fongique et bactérienne ont été obtenues sur le substrat à base de mucilage alors que les moyennes les plus faibles ont été obtenues sur le substrat à base de poudre de cladode sans épluchage. De ce fait, 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.

Mots clés : Culture microorganisme, *in vitro*, E-coli, milieu de nutritif, *Opuntia ficus indica*, *Staphylococcus aureus*, substances naturelles.

الملخص :

كان الهدف من هذه الدراسة هو المساهمة في إنشاء وسط استنبات جديد ، يعتمد على مستخلصات التين الشوكي (*Opuntia Ficus indica*) ، وتقييم خواصه وقدراته لتلبية الاحتياجات الغذائية لمجموعة من الميكروبات. تم استخدام ثلاثة أنواع من المواد في تحضير الوسط المغذي : بودرة الصبار (مقشر أو لا) ومحلول صمغي تم الحصول عليه بعد طبخ الصبار.

نتيجة لهذه الدراسة ، ظهر تأثير نوع المادة المستخدمة في تحضير مختلف الأوساط المغذية على نمو الميكروبات المستعملة في الزراعة الزجاجية أين تم الحصول على أفضل أداء من حيث النمو الفطري في الوسط المغذي الصمغي بينما تم الحصول على أدنى المتوسطات في الوسط المغذي المصنع من بودرة الصبار على بدون تقشير. نتيجة لذلك ، يمكننا تصنيف وسطنا على أنه وسط نمو عادي موصى به لاستزراع بعض البكتيريا والفطريات التي ليس لها متطلبات غذائية معينة.

الكلمات المفتاحية : زراعة الكائنات الحية الدقيقة ، *in vitro* ، وسط المغذي ، المواد الطبيعية.

Abstract

The objective of the present study was to contribute to the establishment of a new culture medium, based on extracts of prickly pear (*Opuntia Ficus indica*), and to evaluate its properties and its capacities to satisfy the nutrient requirements of two microorganisms. Three types of substrates were used. It is dry cladode powder (peeled or not) and cactus mucilage obtained by decoction.

As a result of this study, the type of substrate used in the preparation of the different media strongly influenced the growth of the two microorganisms in in vitro culture. The best performances in terms of fungal and bacterial growth were obtained on the substrate based on mucilage while the lowest averages were obtained on the substrate based on cladode powder without peeling. As a result, we can qualify our medium as an ordinary medium recommended for the culture of certain bacteria and fungi having no particular nutritional requirement.

Keywords: Culture microorganism, in vitro, E-coli, nutrient medium, *Opuntia ficus indica*, *Staphylococcus aureus*, natural substances.

Liste des tableaux

Tableau 1 : La composition chimique de la figue de barbarie.	7
Tableau 2 : Principaux pays producteurs de la figue de barbarie dans le monde.	10
Tableau 3 : Principaux produits dérivés du figuier de barbarie.	14
Tableau 4 : Principales caractéristiques organoleptiques.	34
Tableau 5 : Valeurs de la densité des trois milieux de culture.	35
Tableau 6 : Valeurs du pH des trois milieux de culture.	35
Tableau 7 : Valeurs de la conductibilité électrique des trois milieux de culture.	36
Tableau 8 : Valeurs de la teneur en protéines obtenues.	36
Tableau 9 : Valeurs de la teneur en sucres totaux.	37
Tableau 10 : Représentation simplifiée de la croissance microbienne.	38

Liste des figures

Figure 1 : Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie.	4
Figure 2 : Fiquier de barbarie : a) plante, b) cladodes, c) fleurs, d) fruit.	5
Figure 3 : Principe de la photosynthèse chez les plantes de type CAM.	6
Figure 4 : Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde.	10
Figure 5 : Schéma de la régénération d'une plante.	18
Figure 6 : Schématisation du microbouturage.	19
Figure 7 : Principales étapes pour l'élaboration et l'évaluation des nouveaux milieux de culture.	25
Figure 8 : Principales étapes pour l'élaboration d'un milieu de culture.	26
Figure 9 : Mise en culture et évaluation de la croissance bactérienne.	32
Figure 10 : Mise en culture et évaluation de la croissance fongique.	32
Figure 11 : Résultats de la croissance bactérienne dans les différents milieux.	39
Figure 12 : Croissance radiale mycélienne sur les différents milieux.	40
Figure 13 : Résultats de la croissance fongique dans les différents milieux.	41

Introduction

INTRODUCTION

Aujourd'hui on assiste, presque partout dans le monde, à un regain d'intérêt pour les produits locaux et les pratiques traditionnelles ce qui témoigne du mouvement d'opportunités qui affecte les économies contemporaines.

En Algérie, les terroirs et les produits de terroir sont aujourd'hui l'objet d'enjeux économiques majeurs et sont érigés en véritables outils du développement durable. C'est le cas du figuier de barbarie, appelé aussi « Handi », qui entame un nouveau destin. Longtemps marginalisé, il est devenu très répandu dans les paysages des hauts plateaux et le sud algérien.

La culture du figuier de barbarie se présente comme une ressource économique importante dans les zones arides et semi-arides, c'est une plante succulente dont les raquettes ont une grande capacité de rétention d'eau et elle est considérée comme une filière efficace de lutte contre la dégradation des sols.

Cette ressource est un véritable produit économique, 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.

Un nouveau champ de recherche scientifique s'ouvre avec le figuier de barbarie qui connaît actuellement un regain d'intérêt en Algérie dans le but de mobiliser le terroir au service du territoire.

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

Ce travail est structuré en deux parties, la première partie représente des rappels bibliographiques sur le figuier de barbarie, et la culture *in vitro*. La deuxième partie présente le matériel et les méthodes utilisées, les essais réalisés, ainsi que les résultats obtenus et leurs interprétations.

***Synthèse* bibliographique**

Chapitre 01 :

Figuier de barbarie

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Figuier de barbarie

1. Generalité

Le figuier de Barbarie appartenant plus précisément au genre *Opuntia*. Il est cultivé dans les climats arides, comme dans les régions méditerranéennes et d'Amérique centrale, Les régions semi-arides du Mexique renferment la plus grande diversité de cactus dans le monde , Le genre *Opuntia* contient environ 300 espèces et beaucoup d'entre elles produisent des tiges et des fruits bien tendres et comestibles (Souleyman D. D., 2018)

Il occupe une partie importante dans l'alimentation humaine et il est également utilisé comme fourrage pour le bétail. C'est une plante intéressante en raison des conditions environnementales dans lesquelles elle se développe et sa résistance aux conditions climatiques extrêmes (Boutakiout, 2015)

1.1. Taxonomie du figuier de barbarie

La taxonomie des opuntias est très difficile pour différentes raisons :

Leurs phénotypes varient largement selon les conditions écologiques.

La polyploïdie existe chez de nombreuses populations qui se reproduisent végétativement et sexuellement.

L'existence de nombreux hybrides. (Barbera, et al., 1995)

1.2. Classifications

De nombreux auteurs ont élaboré des classifications du genre *Opuntia*. La classification considérée comme la plus valable à ce jour est sans doute celle établie par Britton et Rose en 1963 :

Règne :	Plantes
Ordre :	Caryophyllales
Sous-classe :	Caryophyllidae
Famille :	Cactaceae
Groupe :	Opuntiaeeae

Genre : Opuntia
Sous-genre : Platyopuntia
Espèces : *Opuntia ficus-indica*
(Boutakiout, 2015)

1.3. Description morphologique

Le figuier de Barbarie est une plante arborescente, caractérisée par des tiges en forme de raquettes plates charnues et ovales pouvant atteindre 3 à 4 mètres de haut.

Les raquettes, appelées cladodes, mesurent 30 à 40 centimètres de long, sur 15 à 25 cm de large et 1,5 à 3 cm d'épaisseur, de couleur verte, elles s'unissent les unes aux autres, en formant des sortes de branches. Elles sont recouvertes d'une cuticule cireuse (la cutine) qui limite la transpiration de la plante et la protège tout en assurant la fonction chlorophyllienne à la place des feuilles. Leur surface est parsemée d'alvéoles au sein desquelles naissent, sur les cladodes en formation, des feuilles fragiles, éphémères et caduques. Elles portent de redoutables épines munies de minuscules aiguillons recourbés vers leur base. Les cladodes de la base, en vieillissant, finissent par se lignifier pour former un véritable tronc. Le figuier de Barbarie donne des fleurs et des fruits en abondance. Les fleurs apparaissent sur le dessus des raquettes, larges de 4 à 10 cm et de couleur jaune, orange ou rouge. Ces fleurs sont comestibles, comme le fruit auquel elles donnent naissance qui se présente sous la forme d'une grosse baie ovoïde et charnue, dont la peau verte jaunâtre est, elle aussi, ornée de petites épines. Dans les climats tempérés, la floraison a lieu en avril, mai et les fruits sont cueillis fin juillet à septembre, dès qu'ils deviennent un peu mous. Dans certaines contrées arides et chaudes, la plante peut donner des fruits deux fois par an. Appelé figue de Barbarie, ce fruit a une chair d'une couleur variant du jaune clair au rouge violacé et dont le goût se révèle délicieux et subtil. Ses graines, riches en vitamines et en oligoéléments, lui confèrent de nombreuses propriétés et c'est à partir de ces graines que l'on obtient une huile très recherchée (Souleyman D. M., 04 /07 /2018)

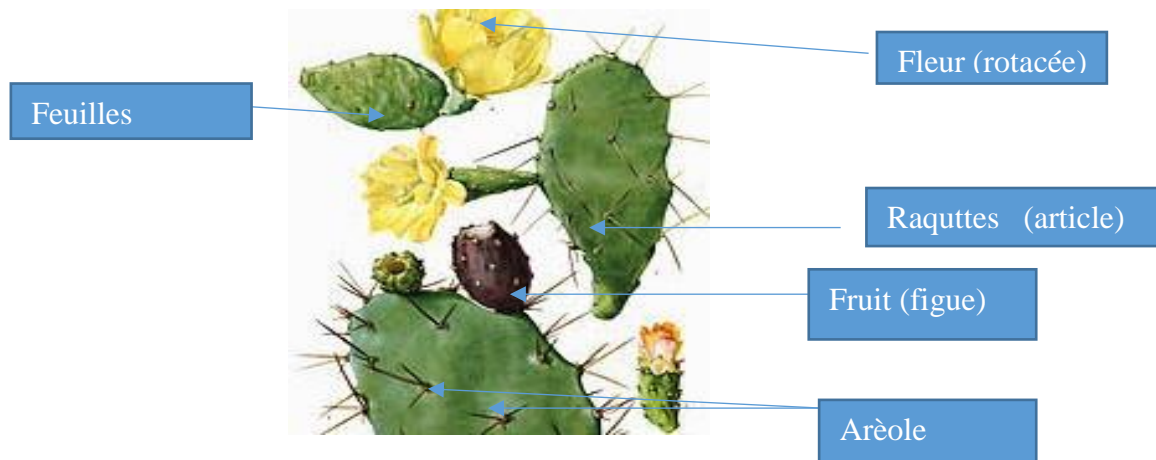


Figure 1 : Schéma illustrant les différentes parties du figuier de Barbarie.

1.4. Description botanique

La figue de Barbarie est une plante arborescente, caractérisée par des tiges en forme de raquettes plates charnues et ovales pouvant atteindre 3 à 4 mètres de haut. Les raquettes, appelées cladodes, mesurent 30 à 40 centimètres de long, sur 15 à 25 cm de large et 1,5 à 3 cm d'épaisseur. Le figuier de Barbarie donne des fleurs et des fruits en abondance. Les fleurs apparaissent sur le dessus des raquettes, larges de 4 à 10 cm et de couleur jaune, orange ou rouge (Boutakiout, 2015).

Les cladodes (raquettes) : une organisation en articles aplatis, de forme elliptique ou 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, Ils sont couverts de petites aréoles, d'épines et de glochides blancs (sarra, Juin 2019)

Les fruits : une grosse baie (100 à 150g), ovale ou allongée et charnue, avec une pulpe juteuse, en générale contenant de nombreuses graines (polysémique). La couleur et la forme du fruit sont variables selon les variétés : jaune, rouge, blanche. Les composés rouges sont les bétacyanines et les jaunes sont les bétaxanthines (sarra, Juin 2019).

Les fleurs : les fleurs, marginales sur le sommet des cladodes, sont hermaphrodites, larges de 4 à 10 cm de couleur jaune et deviennent rougeâtres à l'approche de la

sénescence de la plante. Un cladode fertile peut porter jusqu'à une trentaine de fleurs (sarra, Juin 2019).

Les graines : sont dures, indigestes, mais riches en vitamines. On en obtient, après préparation, une huile très recherchée et une farine nourrissante (sarra, Juin 2019)



Figure 2 : Figuier de barbarie : a) plante, b) cladodes, c) fleurs, d) fruit.

1.5. Physiologie de la plante

Le Figuier de Barbarie est une plante qui a une photosynthèse de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Elle a la particularité de fixer le CO_2 pendant la nuit, le stocker et de fermer ses stomates pendant le jour. Une telle stratégie permet d'éviter les pertes en eau par évapotranspiration qui peuvent avoir lieu le jour et d'optimiser ainsi l'utilisation d'eau. Les stomates s'ouvrent uniquement la nuit, car à ce moment, la température est plus basse que durant la journée et le taux d'humidité est plus élevé. Cela provoque une faible évapotranspiration et donc de faibles pertes d'eau. C'est pourquoi les plantes CAM se sont spécialisées dans la fixation du CO_2 pendant la nuit. Cette fixation est réalisée par la phospho-énol-pyruvate carboxylase (PEP), qui provient de la dégradation de l'amidon et du saccharose produit dans le chloroplaste le jour. Cette fixation permet de former de l'oxaloacétate, qui sera immédiatement réduit en malate, puis stocké dans une vacuole sous forme d'acide malique, d'où le nom de plante à métabolisme acide.

Autrement dit, durant la nuit, le figuier de Barbarie fait "le plein" de CO₂ sous forme d'acide malique, mais il ne peut pas le transformer tout de suite en sucre du fait de l'obscurité. En effet, comme toutes les autres plantes, les plantes CAM ont besoin de l'énergie lumineuse du jour pour compléter le cycle de Calvin et pour ainsi accomplir la photosynthèse en entier (Souleyman D. M., 04 /07 /2018)

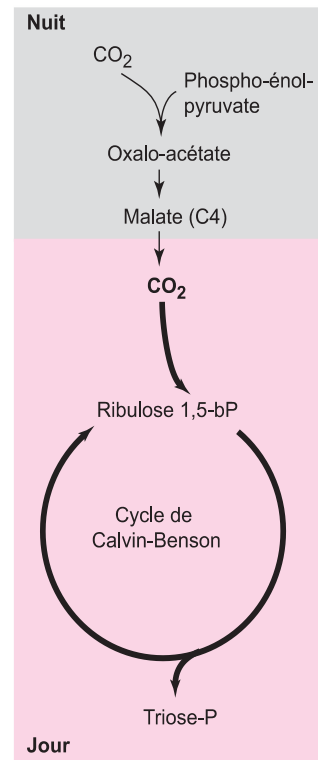


Figure 3 : Principe de la photosynthèse chez les plantes de type CAM.

1.5.1. La plantation de la figue de barbarie

La période de plantation du cactus varie avec la latitude et les conditions environnementales. Deux époques sont considérées :

L'automne : de septembre à novembre pour les régions à hivers doux et de septembre à octobre dans les régions à hivers frais.

Le printemps : pendant les mois de février, mars et avril dans les zones à hivers doux et pendant le mois d'avril et mai dans les régions à hivers frais (NEFFAR, 2011/2012)

La plantation se fait soit par des raquettes simples (une seule raquette) ou doubles (raquette terminale fixée sur une raquette subterminale). L'avantage de la plantation des raquettes doubles est l'entrée plus rapide en production de ces raquettes par rapport

aux raquettes simples. La multiplication du figuier de barbarie par bouturage est le mode le plus simple et le plus courant.

La saison de récolte des figues de barbarie varie selon le cultivar et le lieu de production. Afin d'avoir l'optimum de la qualité du fruit, les fruits colorés nécessitent d'être récoltés quand elles atteignent au moins 50% de leur couleur finale (,2012)

Les plantations constituent aussi un habitat pour la faune domestique ou sauvage. C'est une source mellifère importante pour l'apiculture durant la période de floraison.

1.6. Composition de la figue de barbarie

La figue de barbarie est un fruit succulent, peu acide et riche en sucres, ce qui le rend délicieux et doux, La composition moyenne de la figue de barbarie est résumée dans le tableau suivant (Assia, (2011/2012))

Tableau 1 : La composition chimique de la figue de barbarie.

Paramètres	Valeur	Paramètres	Valeur
Pulpe (%)	43-57	Mg (mg/100g)	16.1-98.4
Graines (%)	44-71	Na (mg/100g)	0.6-1.1
Epluchure (%)	33-55	P (mg/100g)	90-217
pH	5.3-7.1	P (mg/100g)	15-32.8
Acidité (% ac.citrique)	0.05-0.18	Proline (mg/L)	17
Eau (%)	84-90	Glutamine (mg/L)	574.6
Protéines (%)	0.2 – 1.6	Taurine (mg/L)	572.1
Lipides (%)	0.09-0.7	Serine (mg/L)	217.5
Fibres (%)	0.02-3.1	Alanine (mg/L)	96.6
Sucres totaux (%)	43	acide Glutamique (mg/L)	83.0
Vitamine C (mg/100g)	12	Méthionine (mg/L)	76.9
Ca (mg/100g)	12.8-59	Lysine (mg/L)	53.3

L'Opuntia ficus-indica est caractérisée par un pH relativement élevé (5.3-7.1) comparé à celui d'autres fruits, et une acidité relativement faibles (0.05-0.18%). En raison de sa haute teneur en eau, sa valeur calorique totale est faible, elle est de 50 Kcal/100g comparable à celle d'autres fruits tels que les poires, les abricots et les oranges. Le fruit est riche en sucres, majoritairement représentés par le glucose et le fructose. Le

glucose, dominant, est une source d'énergie immédiatement disponible pour le cerveau, tandis que le fructose permet une amélioration de la saveur du fruit.

Une teneur plus élevée en vitamine C, comparée à d'autres fruits tels que la pomme, la poire, les raisins et la banane, a été notée, des traces de vitamines B1, B6, niacine, riboflavine et acide pantothénique ont été trouvées.

La figue de barbarie montre une composition intéressante en minéraux, particulièrement, le potassium (90-217 mg/100g), le calcium (12.8-59 mg/100g) et le magnésium (16.1-98.4 mg/100g); des niveaux élevés d'acides aminés libres, dont la proline (1768.7mg/L), glutamine (574.6 mg/L) et la taurine (572.1 mg/L) ont été également rapportés (Assia, (2011/2012))

1.7. Exigences écologiques du figuier de barbarie

1.7.1. Facteurs édapho-climatiques

Le figuier de barbarie possède une grande adaptation aux conditions les plus hostiles (aridité du climat, salinité des sols, terrains de faible potentiel agricole). Son extension est limitée surtout par les basses températures hivernales, son seuil de tolérance étant de -10°C. Le cactus s'accommode mal des sols hydro morphes et asphyxiants. Les sols préférés sont les sols légers, sablonneux-limoneux. Il s'agit des sols légèrement pauvres en matière organique (0.1-1.8 %) ayant des pH légèrement acides (5.1-6.7). Pour plusieurs espèces *Opuntia* le pH est un facteur limitant, mais l'*Opuntia ficus indica* est rencontré même dans des sols calcaires (S., 2010, 12-16)

1.7.2. Facteurs biotiques

De nombreuses parasites et maladies sont rencontrés dans le cactus :

➤ La rouille (*Phyllostica opuntiae*) : se manifeste par des tâches de couleur jaune-rouille, circulaires, pouvant s'étendre en plaques irrégulières d'un blanc sale ou cendré sur les raquettes.

➤ Le mildiou des cactus (*Phytophthora cactorum*) : les symptômes de la maladie se présentent sous forme de cloques soulevant l'épiderme, d'état chlorotique prononcé et de taches brunâtres qui envahissent les fruits et les raquettes.

➤ La cératite (*Ceratitis capitata Wied*) : une mouche méditerranéenne des fruits qui peut occasionner des dégâts importants dans les plantations mal entretenues.

➤ Les cochenilles : bien que généralement polyphages, certaines espèces de cochenilles sont des parasites spécifiques à l'espèce *Opuntia* (Nerd A)

1.8. Historique et origine

Suite au retour des arabes à leur pays dans le nord-africain suite à leur expulsion par Philippe III en 1610, les expulsés appelés « morisqués » ont ramené avec eux l'espèce de figue de barbarie d'origine Mexicaine. Il était inconnu en Europe avant les voyages de Christophe Colomb et fut décrit de façon précise pour la première fois en 1535 par l'Espagnol Gonçalo Hernández de Oviedo y Valdés dans son « Histoire des Indes Occidentales ».

Endémique au Mexique, le figuier de barbarie a été introduit en Europe vers 1552 par les Espagnols. A l'aube du seizième siècle, la plante s'est répandue dans le bassin des raquettes qu'ils ont plantées autour de leurs villages. La plantation du figue de barbarie a été considérablement étendue dans la région du sud de l'Afrique (1772), l'Inde (1780), les Philippines (1695), la Chine (1700) et l'Indochine (1790) , (FAO, 2018). En Tunisie, l'*Opuntia ficus indica* est connu sous le nom de « hendi », au Maroc la figue de barbarie possède plusieurs noms vernaculaires : « hindia », « zaâboul », et « aknari ». Dans les deux pays le figue de barbarie est utilisé pour ses fruits comestibles et comme fourrage pour ses raquettes en particulier pendant les périodes de sécheresse. Il est utilisé également pour lutter contre l'érosion hydrique et éolienne, ainsi que pour la protection et la mise en valeur des sols dans les régions arides et semi arides.

1.9. Figue de barbarie dans le monde

Les *Opuntias* font maintenant partie de l'environnement naturel et des systèmes agricoles, *Opuntia ficus-indica* L. est l'espèce ayant la plus grande importance économique dans le monde. Ils sont cultivés en Amérique, en Afrique, en Asie, en Europe et en Océanie. On peut les retrouver du Canada à la Patagonie en Argentine, du niveau de la mer jusqu'à 5100 m d'altitude au Pérou. Quand ils ont été découverts pour la première fois par les explorateurs Européens, les opuntias étaient distribués de la Mésoamérique à Cuba et à d'autres îles caribéennes. Ils sont devenus invasifs dans les zones ayant une saison des pluies caractérisée par des températures élevées, par exemple en Afrique du Sud et en Australie. Dans les climats méditerranéens, l'invasion naturelle est limitée par l'humidité et les températures froides d'hiver qui contrastent avec les conditions chaudes et sèches des étés. Les usages traditionnels et populaires du figuier de Barbarie dans un grand nombre de pays ainsi que ses multiples fonctions

ont attiré l'attention des agriculteurs, des éleveurs et de la communauté scientifique (international, 2018)

1.10. Distribution géographique de la figue de barbarie dans le monde

La répartition géographique du figue de barbarie est illustrée dans la carte suivante ; La couleur verte désigne le pays d'origine du figuier de barbarie (Mexique), la couleur noire désigne les aires de distribution : Brésil, Chili, Etats Unies, Inde, Italie, Espagne, Erythrée, Portugal, Algérie, Tunisie, Libye, Maroc, Afrique du Sud, Ethiopie, Soudan, Tanzanie, Kenya, Uganda (lynda, 10/07/2017)

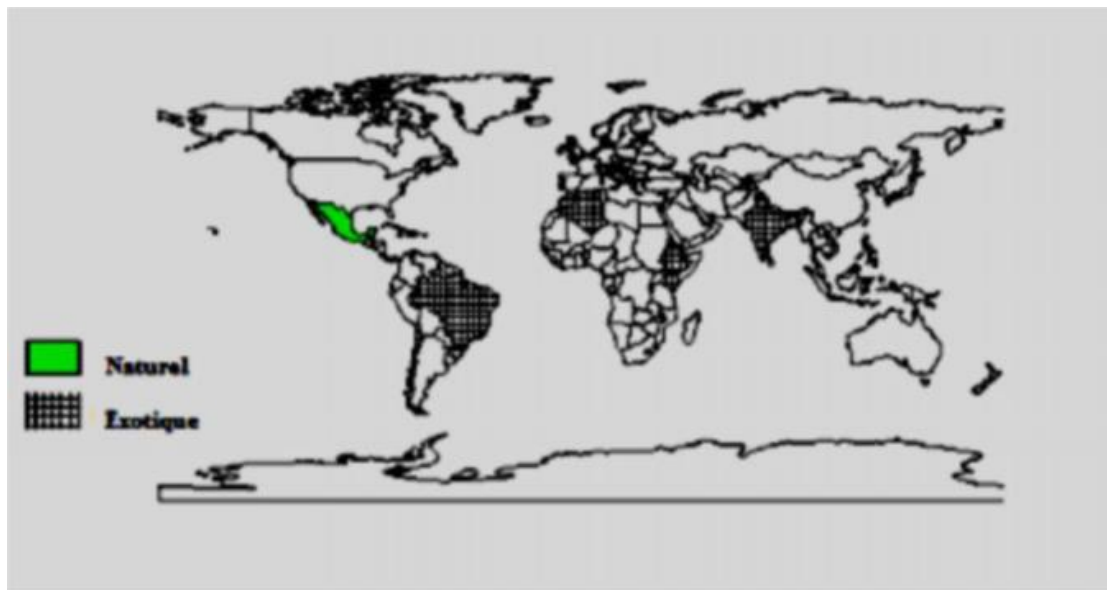


Figure 4 : Distribution géographique du figuier de barbarie dans le monde.

Principaux pays producteurs de la figue de barbarie dans le monde

Tableau 2 : Principaux pays producteurs de la figue de barbarie dans le monde.

Pays	Superficie (ha)	Utilisations
Mexique	3000000	Fourrage, fruit, légume, colorant
Brésil	500000	Fourrage, fruit
Afrique du Nord	200000	Fourrage, fruit
Pérou	35000	Colorant
Italie	8000	Fruit
Espagne	3000	Colorant
Afrique du Sud	1500	Fruit
Bolivie	1200	Fruit, colorant
Chili	1000	Fruit
Argentine	800	Fruit
Californie	1500	Fruit

Ce tableau présente les principaux pays producteurs du figuier de barbarie. Nous remarquons que sur le continent Américain, c'est surtout au Mexique que le figuier de barbarie est le plus abondamment exploité avec une superficie de 3 000 000 d'hectares. Son utilisation est multiple : aliment pour bétail, légume, fruit, colorant. Quant aux États-Unis d'Amérique, c'est la forme inerme qui est la plus répandue. La culture du figuier de barbarie est surtout présente dans les États du sud : Arizona, Texas, Californie. Au Brésil, elle constitue dans la région nord-est l'aliment de base du cheptel bovin laitier.¹ En Europe, la culture du figuier de barbarie est développée dans la partie sud notamment dans le sud de l'Espagne, du Portugal et de l'Italie (Sicile, Calabre, Sardaigne). En ce qui concerne le continent Africain, le figuier de barbarie présente une répartition aussi bien au sud dans les pays comme l'Afrique du Sud ou Madagascar qu'au nord. En Afrique du nord, il fait l'objet d'un grand intérêt en raison du changement climatique et du surpâturage. Il est utilisé depuis plusieurs siècles d'une part comme haie pour délimiter les propriétés foncières et d'autres part pour la consommation de son fruit durant la période estivale. Ces dernières décennies les pays du Maghreb, principalement la Tunisie et le Maroc, ont pris conscience de l'intérêt économique et des effets que peut entraîner cette culture, et les États ont engagé des politiques de développement intégrées associant défense des terres, élevage, production du fruit et sa transformation en produits agro-industriels. L'Algérie, quant à elle, ne s'est intéressée que tardivement à cette ressource contrairement à ses pays voisins (hayat, 2015)

1.10.1. En Afrique

L'introduction du cactus en Afrique du Nord a été favorisée par l'expansion Espagnole durant le seizième et dix-septième siècle et aussi par le retour des Maures vers leur terre natale quand ils ont finalement été expulsés d'Espagne en 1610. Ils emmenèrent avec eux « l'arbre à figue Indien » avec ses fruits succulents et le plantèrent autour de leurs villages.

Au 19^{ème} siècle, le comte Adrien De Gasparin, un personnage considérable, s'intéressa lui aussi au figuier de Barbarie, et par ses analyses originales de l'économie rurale et par son enthousiasme employé à la diffusion des techniques nouvelles, il contribua beaucoup à l'application des sciences exactes à l'agriculture. Considérant le figuier de barbarie comme la providence des pays pauvres au sol aride, il voulut développer sa

culture en Afrique du Nord et y créer des nopalérais, notamment en Algérie. (international, 2018)

1.10.2. En Algérie

La culture algérienne du cactus est largement représentée dans le paysage rural en plantation plus au moins régulières, autour des villages en haies limitant les parcelles de culture ou de vergers. La culture de cactus se trouve parfaitement intégrée dans le système d'exploitation traditionnel. En Algérie, les plantations du figuier de barbarie sont réparties dans les hauts plateaux, jusqu'à 1100 mètres, du centre à l'ouest l'Opuntia occupent une superficie dépassent les 25 000 hectares par exemple, on le trouve sur les hauteurs de Chréa, Bouarfa (wilaya de Blida), dans les wilayas de, Boumerdès, Tipaza, Tissemsilt, Chlef, Relizane, Mostaganem, AinTemouchent, Oran, Mascara, Sidi-bel Abbès, Tlemcen, dont la meilleure cueillette des figues de barbarie, est celle qui se réalise sur les hauteurs des montagnes, spécialement en milieu rocailleux, A l'exception des montagnes et des zones sahariennes. L'Algérie déploie ces dernières années un effort important pour encourager la culture de la figue de Barbarie, pour son importance socioéconomique et écologique . (nouara, 2017/2018)

1.11. Utilisation du figuier de barbarie

Le figuier de barbarie est une plante dont les différentes parties peuvent être consommées par l'homme ; son fruit est le plus bénéfique et le moins cher. C'est aussi un produit à haute valeur ajoutée qui présente plusieurs vertus thérapeutiques et pharmaceutiques.

1.11.1. Utilisation agro-industriel

Dans le domaine agro-industriel, les fruits du figuier de barbarie sont transformés en confiture, en jus, en miel, en boisson alcoolisée. Les jeunes raquettes du figuier de barbarie sont consommées comme un légume et l'ingrédient principal de nombreuses spécialités en Amérique et conservées en petits morceaux dans des boîtes de conserve sous le nom de « nopalitos ». D'ailleurs, il existe au Mexique et aux États-Unis des usines modernes de mise en boîte des « nopalitos » . (hayat, 2015)

1.11.2. Utilisation médicinale

Le figuier de barbarie fait partie depuis longtemps aux plantes médicinales les plus utilisées. La recherche médicale moderne redécouvre ses propriétés. Elle étudie les molécules actives la composant et lui permettent de lutter efficacement contre

quelques-unes des affections les plus graves de notre temps, comme la réduction de taux de sucre et de cholestérol dans le sang.

-Production des alicaments sous forme de gélules ou capsules. Ce sont des aliments naturels qui ont des fonctions thérapeutiques pour le traitement de maladies comme l'obésité, le cholestérol, la constipation, les coliques. Ils contribuent à la régulation du transit intestinal.








-Le mucilage extrait des raquettes présente un grand intérêt comme alicament et connaît un développement dans la pharmacopée.


-Le Nopal est une fibre naturelle entièrement végétale avant tout lipophile qui se comporte comme un «absorbant naturel des graisses ingérées » et favorise le gommage des rondeurs et améliore le confort intestinal.

1.11.3. Utilisation comme source d'énergie

Certains pays, comme le Chili, cultivent le figuier de barbarie afin d'obtenir assez de biomasse pour produire de l'électricité d'une manière durable. Une source d'énergie renouvelable qui pourrait s'avérer moins coûteuse que les énergies fossiles (pétrole, charbon et gaz) et beaucoup moins dangereuse pour le l'environnement (hayat, 2015)

Tableau 3 : Principaux produits dérivés du figuier de barbarie.

Les domaines	Les organes utilisés	Les produits fabriqués	Illustrations
Agro-industriel	-Le fruit	-Confiture -Jus -Vinaigre -Miel -Boissons alcoolisées -Colorant Alimentaire	  
	-La raquette	-Filets de raquettes -Farine	
Cosmétique	-Mucilage de la raquette	-Shampoings -Masque cheveux -Laits hydratants -Huile -Crèmes dermiques	 
Pharmaceutique	-Poudre de raquettes séchées - Les fleurs séchée	-Complément alimentaire -Tisane	
Alimentaire, cosmétique et médicinal	-Les raquettes (l'élevage de la Cochenille)	-Teinture rouge (carmins)	

Domaine de l'énergie	-Les raquettes	-Biogaz	
----------------------	----------------	---------	--

1.11.4. Cactus et environnement

Les plantations de cactus jouent un rôle très important en créant :

- un microclimat pour la végétation herbacée (unités fourragères supplémentaires) ;
- un milieu favorable pour le développement et la protection du gibier et de la faune sauvage ;
- une réserve mellifère intéressante pour le développement des activités apicoles et la sauvegarde de l'abeille.

Chapitre 02 :

Culture in vitro

Chapitre 02 : Culture *in vitro*

1. Généralité

1.1. Définition

De très nombreux ouvrages ont traité de la culture *in vitro* au cours de la deuxième moitié de ce siècle décrivant toutes les méthodes déployées aussi bien dans le domaine animal que végétal. C'est une méthode de culture des plantes en condition aseptiques en utilisant des milieux de culture assez complexes (hormones, sucres, vitamines, acides aminés (Augé et al., 1989 ; Margara, 1989).

Le principe de la culture *in-vitro* est de cultiver une plante en milieu nutritif. Ce milieu étant également favorable au développement des microorganismes qui est plus rapide que celui de la plante il convient de cultiver en conditions aseptiques c'est-à-dire en absence de tout microorganisme. L'asepsie est donc le problème majeur de ce mode de culture. C'est aussi son avantage : l'absence de germe favorise le développement et la multiplication de la plante qui se trouve dans des conditions "idéales" (Jay-Allemand, (1992).).

1.2. Historique

La culture *in vitro* est par comparaison, une technique très récente puisqu'elle fut développée seulement au début de 19^{ème} siècle. Les premiers pas de culture *in vitro* sont dus à un.... . Il obtient ainsi sur un milieu KNOP amélioré, la survie durant plusieurs mois de petits amas cellulaires. Mais il n'y avait de multiplication cellulaire en 1912, Alexie Carrel réussissait la culture indéfinie de cellules de cœur d'embryon de poulet par repiquages successifs. Il fallut attendre 1922 et les travaux de Rablens pour voir apparaître une croissance chez les pointes et racine isolées sur milieu synthétique. Mais la date qui marque réellement le début de la culture *in vitro* est 1932 avec les travaux de White aux USA sur la croissance indéfinie en milieu liquide de racine de tomates. Ce succès fut sans doute à l'origine du regain d'effort qui se portera sur les cultures tissues végétales. Dès 1934, Gautheret obtient à partir de prélèvement de tissus cambiaux d'arbre des proliférations de tissus qui malheureusement ne dépassèrent pas huit mois. Après les travaux de White aux USA en (1932) sur le tabac, Nobecourt en France sur la carotte, Limasset et Cornuet en (1949) qui publiaient leurs observations sur l'absence de virus dans les méristèmes de tabac virosé, en (1952) Mirent à profit ces observation et entreprirent de mettre en culture *in vitro* des

méristèmes de Dahliya et de pomme de terre atteints de maladies à virus. A partir de méristèmes, ils obtiennent in vitro des plantes entières qui furent remises en culture normale et révélèrent saines au contrôle (Farah, 06/06/2018)

1.3. Applications de culture in vitro

Les outils de culture in vitro de végétaux reposent sur la même technique de base, mais en fonction du matériel végétal de départ, diverses d'applications de la culture in vitro sont possibles :

- produire des végétaux de meilleure qualité,
- faciliter l'exploitation des ressources génétiques,
- accélérer la création variétale.

2. Techniques de culture in vitro

Dans le laboratoire on utilise plusieurs techniques de culture in vitro qui respectent toutes les conditions d'asepsie convenable. Parmi ces techniques on trouve :

2.1. Micropropagation

Les plantes se multiplient par multiplication végétative, ce dernier est indispensable quand on veut conserver les caractères d'une variété donnée. La micropropagation in vitro apporte un progrès considérable par rapport aux méthodes traditionnelles avec un taux de multiplication de 100 à 1000 fois plus élevé (C, 2005). La micropropagation consiste en une prolifération des bourgeons axillaires préexistants sur l'explant mère, Ceci offre une bonne garanti de conformité génétique et une bonne stabilité des caractères au cours de repiquages successifs (Demol J., 2008). Cette technique permet la multiplication végétative de plusieurs plantes alimentaires, médicinales, horticoles, agroforesteries (Bretaudeau A., 2006).

Elle a pour objectif de produire en grande quantité des cultivars d'intérêt horticole, sylvicole, ou agronomique qui viennent d'être créés ou découverts ou qui ont toujours un intérêt.

2.2. Organogénèse

L'organogénèse consiste à la néoformation d'organes, souvent ce terme est utilisé pour décrire la formation de bourgeons mais il s'applique également à des racines (Auge et al., 1989 ; Simonin, 2006). Elle est la base fondamentale de la multiplication végétative

qui s'appuie sur la formation de nouveaux méristèmes (Margara, 1984) et peut être réalisée soit par :

- La voie directe, qui conduit à la morphogénèse directe de tiges (caulogénèse) ou de racines (rhizogénèse) donnant ainsi naissance à des plantules viables, qui peuvent être acclimatées progressivement au milieu naturel (Margara, 1984).
- La voie indirecte, qui passe d'abord par une callogénèse (la néoformation d'une cal, tissu cellulaire indifférencié) et dont l'organogénèse, suite à des repiquages, apparaît plus tardivement (Margara, 1984 ; Zryd, 1988).

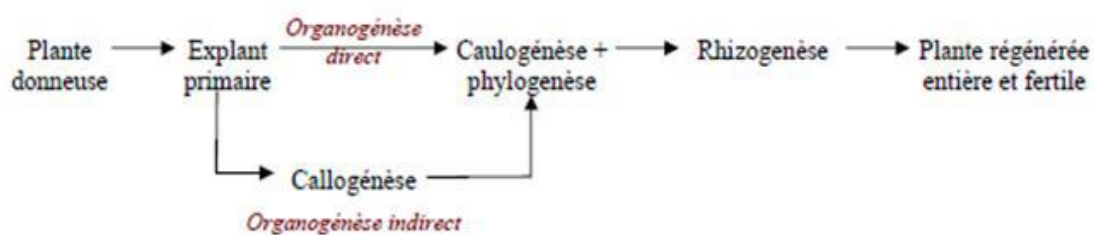


Figure 5 : Schéma de la régénération d'une plante.

2.3. Culture de méristème

Cette méthode consiste à prélever le cœur d'un bourgeon ou l'extrémité d'une racine où se trouve le méristème, zone de cellules qui se divisent activement pour assurer la croissance de la plante. Cette région est toujours dépourvue de virus, de bactéries ou de champignons, même chez les plantes contaminées. Cette méthode permet donc de créer des plants sains et a assuré le sauvetage de variétés entières des espèces tels que le Pélargonium, le dahlia, le chrysanthème, la pomme de terre, l'artichaut, le fraisier, framboisier. Contrairement aux techniques bouturages, marcottage ...etc, car cette voie favorise la transmission des virus à la descendance.

2.4. Microbouturage

Le micro bouturage est la technique la plus répandue pour produire en un minimum de temps un maximum de plantes. L'explant sera repiqué sur un milieu permettant son développement en nouvelle plante qui se sera enracinée. Cette technique passe cependant par plusieurs étapes qui doivent être réalisées de manière la plus stérile possible

Le microbouturage est un mode de multiplication conforme qui accélère le fonctionnement normal des bourgeons formés sur une plante (Montes, 2009). La

prolifération des méristèmes préexistants peut être réalisée en utilisant trois types d'explants: méristème, apex ou nœuds (unique ou multiple) (Gonçalves et Romano, 2012). Ils sont cultivés pour régénérer des multiples pousses sans passer par une phase cal (Pati et al., 2006). De nombreuses espèces ont été régénérées via le microbouturage.

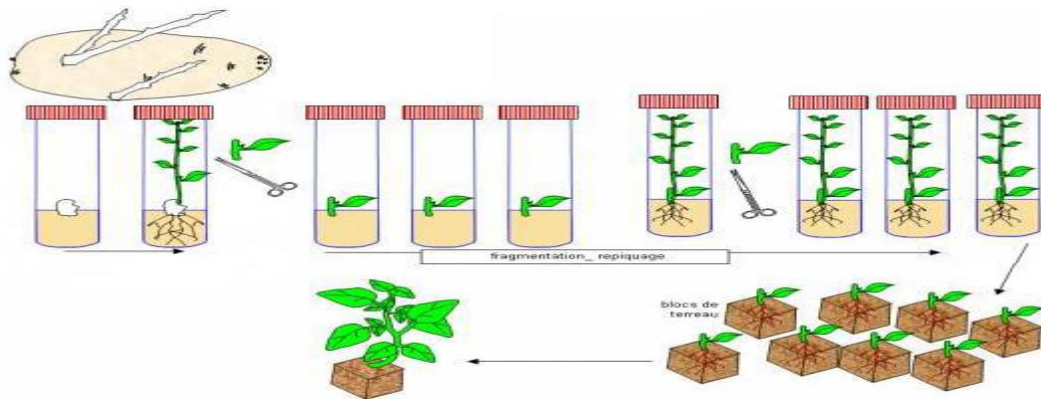


Figure 6 : Schématisation du microbouturage.

2.5. Embryogénèse somatique

L'embryogénèse somatique est une forme de multiplication végétative permettant d'obtenir des plantules génétiquement identiques à la plante mère. Dans une graine, on trouve la future plante sous forme d'embryon (embryon zygotique) qui résulte de la reproduction sexuée. Cette technique consiste alors à provoquer l'apparition d'embryons à partir des tissus végétaux mis en culture *in vitro* qui provoquent de nombreuses divisions cellulaires. Cette embryogénèse somatique génère alors des embryons dans ces divisions cellulaires ou dans les cals, c'est-à-dire un amas de cellules indifférenciées (qui ont été dédifférenciées sur l'explant de la plante mère avec le phénomène de totipotence végétale). Sous certaines conditions, les cultures cellulaires s'organisent ensuite en nombreux petits massifs à structure bipolaire nommés embryons somatiques (avec un méristème de tige et un méristème de racine). Comme les embryons zygotiques (présents dans les graines), les embryons somatiques, obtenus à partir de cellules non sexuées (sans fécondation), se développent en un nombre illimité de plantes génétiquement identiques. C'est actuellement la technique la plus performante pour la multiplication végétative des conifères (Agnès et al., 2013). Cependant, d'autres types d'embryons peuvent également se développer à partir de cellules du sporophyte ou du gamétophyte, embryons qui ne sont pas le produit d'une fusion gamétique et qui sont appelés « embryons somatiques ». Parfois, chez certaines espèces, ils résultent d'une embryogénèse somatique naturelle qualifiée d'apomixie.

Dans certains cas en effet, les anthérozoïdes, l'oosphère, voire d'autres cellules gamétophytiques peuvent engendrer des embryons parthénogénétiques. Dans d'autres cas, certaines cellules saprophytiques localisées au niveau des tissus intra-ovulaire, en particulier le nucelle, fournissent naturellement des embryons apoméiotiques appelés aussi l'embryons nucellaires. Ce type d'embryogenèse est très développé dans la famille des Rutacées, spécialement chez les Citrus (Tisserat et al., 1979 ; Vardi et al., 1990) Toutefois, cette appellation est essentiellement appliquée, selon certains auteurs comme Piatti (1988) et Margara (1989), aux embryons obtenus à partir de culture de tissus *in vitro* du sporophyte. Il y'a deux types de l'embryogenèse somatique :

- **Embryogenèse somatique directe** : dans ce processus, les embryons somatiques se développent directement à partir des explants initiaux mis en culture sans qu'il y ait formation de cal. Ce processus est cependant rarement observé (Guedira, 1989).
- **Embryogenèse somatique indirecte** : c'est un processus beaucoup plus fréquent et au cours duquel la formation d'embryons nécessite une callogénèse, caractérisée par une activité cellulaire élevée. Dans ce modèle, la formation d'embryons se fait à partir de cal.

2.5.1. Principales étapes de l'embryogénèse somatique

- Initiation des cultures embryogénies par culture de l'explant initial sur un milieu contenant des régulateurs de croissance surtout l'auxine avec souvent des cytokinines
- Prolifération des cultures embryogénèse sur milieu solide contenant une composition en régulateurs de croissance similaire à celle de l'étape précédente. Pour la propagation à grande échelle, il est souvent préférable d'établir des suspensions cellulaires (Von Arnold et al. 2002).
- Prématuration des embryons somatiques sur milieu généralement dépourvu de régulateurs de croissance ce qui inhibe la prolifération cellulaire mais stimule la formation des embryons et le début du développement (Von Arnold et al. 2002).
- Maturation des embryons somatiques par culture sur un milieu contenant de MS.
- Développement de plants sur milieu dépourvu de régulateurs de croissance.

2.6. Haplo-diploïdisation

L'aplodiploïdisation est une méthode utilisée pour fixer plus rapidement le matériel génétique en cours de sélection. Elle repose sur l'obtention de plantes haploïdes (n) à

partir des organes mâles ou femelles puis sur le doublement stock chromosomique. Ainsi le sélectionneur va disposer de plantes diploïdes ($2n$) homozygotes ou l'ensemble du génome est fixé. C'est donc une technique rapide de production de lignées pures en une seule étape au lieu de 7 à 8 générations. Avec cette méthode la durée d'un cycle de sélection est raccourcie de 3 à 4 ans, de plus cette méthode permet d'observer l'expression aussi bien des gènes récessifs que des gènes dominants.

3. Facteurs influençant la culture in vitro

Quelque soit la technique, la culture in vitro requiert des conditions de culture précises en effet, il est indispensable de contrôler les conditions de température d'éclairement (durée et intensité) et humidité relative.

3.1. Lumière et la photopériode

La lumière est un facteur déterminant pour la culture in vitro des plantes. Elle est indispensable au déclenchement et au bon déroulement de certains processus morphogénétiques. L'intensité lumineuse nécessaire dépend de la durée de l'éclairement et de la qualité spectrale de la lumière reçue par la culture. En effet selon Hussey et al (1981) la longueur de jour affecte la vigueur et développement des proliférations ainsi que la croissance des cals.

3.2. Température

La température est également un élément important lors de la pratique des cultures in vitro, elle doit être en générale constante et régulée suivant les besoins de l'organisme en culture.

3.3. Milieu de culture

Le milieu nutritif (ou base nutritive) doit fournir tous les éléments chimiques nécessaires au développement de l'organisme de culture (plante, bactérie, champignon...etc) : carbone azote oligoéléments vitamines régulateurs de croissance etc...

3.3.1. Les éléments minéraux

Pour la plupart des plantes supérieures, les sels minéraux sont de 2 types :

- Les macroéléments (N, P, K, S, Mg et Ca) qui sont absorbés sous forme d'ions.
- Les micro-éléments ou oligo-éléments (B, Mn, Zn, Cu, Ni, Co, Mo, Al, I, Fe), bien qu'ils ne soient nécessaires à la plante qu'en faibles concentrations, leur rôle est essentiel.

3.3.2. Les éléments organiques

Le saccharose :

Le saccharose permet assurer la survie et le développement de l'explant il est indispensable d'ajouter une source d'énergie

Les vitamines :

L'emploi de diverses vitamines tels que : la thiamine, l'acide nicotinique, la pyridoxine, favorise fréquemment la croissance des tissus des cultures in vitro.

Les régulateurs de croissance :

Ce sont des substances indispensables au bon démarrage et à l'entretien des tissus végétaux des cultures in vitro, les régulateurs naturels de croissances des végétaux, appelés aussi hormones de croissance, se répartissent actuellement en cinq groupes : Auxines, Cytokinines, Gibbérellines, Acides abscissiques, Ethylènes. Ces substances de croissance peuvent agir en synergie ou en antagonisme.

Caractères communs à ces composés:

- Agissent à très faible dose ; risque de toxicité à trop forte dose.
- Ils agissent en synergie entre eux ; leur fonctionnement dépend de leurs concentrations relatives.
- Aucune hormone n'a donc d'action spécifique.
- Les hormones synthétisées par le végétal seront régulées par la plante tandis que les hormones de synthèse mettront beaucoup plus de temps à être métabolisées; on se sert de ces hormones pour des dosages en laboratoire et la composition de milieux de croissance spécifique.

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 végétaux optimisant la croissance des microorganismes (champignons et bactéries) et des tissus végétaux (microbouturage et/ou culture de méristème) *in vitro*.

Pour parvenir à cela, nous avons testé trois extraits figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). 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 consacré 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 bactérienne et deux souches fongique, (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. Les produits que nous avons étudiés tout au long de cette étude, sont poudres et mucilage de figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica*).

1.2. Matériel biologique

Les micro-organismes utilisés dans l'expérimentation sont constitué de deux souches bactérienne et deux souches fongique.

Souche bactérienne :

➤ **Escherichia coli**, également 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 (CLAVE , 2015).

➤ **Staphylococcus** est une bactérie du genre : coques, (Gram positifs). Elle impliquées dans des pathologies variées et de degrés de gravité divers (CLAVE , 2015).

Souche fongique:

➤ **Fusarium oxysporum** : est un genre de champignons imparfaits (deutéromycètes). Il est très variable et présente beaucoup de formes spécialisées pathogènes pour un type de plantes, ex : *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* (Ambrosini, et al., 2016).

➤ **Aspergillus** : est un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections. Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc....) (Ambrosini, et al., 2016).

Matériel de laboratoire

Le matériel de laboratoire utilisé lors de l'expérience sont les suivants : béchers, éprouvette graduée, agitateur magnétique, balance à précision, autoclave, bec bunsen, boîtes de Pétri, autoclave, pipettes Pasteur, incubateur, pince en bois, gants.

2. Principales étapes pour l'élaboration du milieu de culture

La méthodologie adoptée pour répondre aux objectifs fixés par cette étude sont illustrées dans la figure ci-dessous :

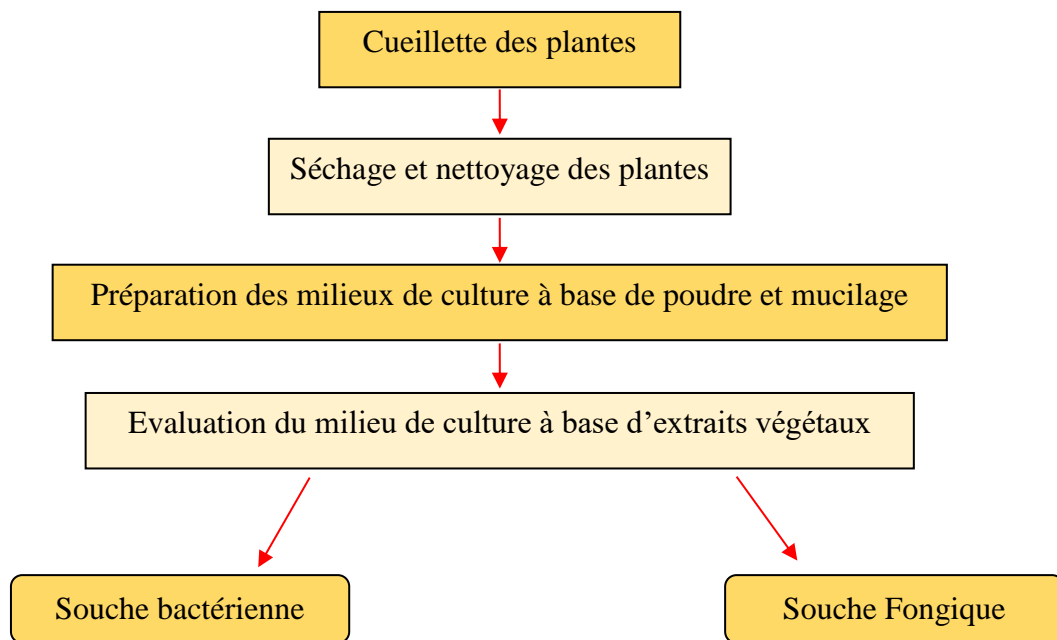


Figure 7 : Principales étapes pour l'élaboration et l'évaluation des nouveaux milieux de culture.

2.1. Techniques de préparation des milieux de culture

La préparation d'un milieu de culture peut se faire soit à partir de la poudre, soit directement à partir d'un mélange de décoction à base en fragment de figuier de barbarie, que l'on peut couler telle quelle, ou l'enrichir en quelques grammes d'agar agar avant de le conditionner en boîtes de pétri.

2.1.1. Milieu au poudre

Dissoudre quantité 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 jusqu'à 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.



Figure 8 : Principales étapes pour l'élaboration d'un milieu de culture.

Après stérilisation, les solutions sont refroidies pendant 30 minutes, puis coulées dans des boîtes de pétri de 90 mm sur une hauteur de 4 mm et laisser solidifier sur paille. Les boîtes de Pétri sont conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur utilisation.

2.1.2. Milieu au mucilage

Faire fondre le mucilage de la plante par décoction dans l'eau distillée bouillante 45 min à 100°C, homogénéiser délicatement jusqu'à obtention d'une solution visqueuse (gel). Laisser refroidir à 60°C à l'air libre. Conditionner le milieu encore chaud dans des flacons en verre stérile ensuite les fermer afin de les autoclaver.

Au moment de l'emploi, faire fondre le milieu au bain-marie bouillant et le couler en boîtes de Petri, de façon à ce que l'épaisseur de la couche de gélose soit de 4 mm. Sécher les boîtes 30 minutes à 37°C.

3. Analyse de la composition des milieux de culture

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

Principe : le PH (potentiel Hydrogène) est mesuré par un PH mètre dont sa valeur est en fonction de la concentration des ions hydronium présents dans la solution ou par colorimétrie., sur une échelle allant de 1 à 14. (Geoffrey..C-P., 2011)

Mode opératoire : le mode opératoire est le suivant :

- Rincer l'électrode par de l'acétone et nettoyer avec du papier absorbant
- Etalonner le PH mètre à l'aide des solution tampons (PH =7 ,7 ; PH = 4 ,4)
- Plonger l'électrode du PH mètre dans un volume suffisant de l'échantillon.
- Attendre la stabilisation puis lire le pH indique sur l'écran de l'affichage du pH mètre à la température désirée à 20° C.
- Pour une bonne mesure de pH, il faut agiter le milieu avec un agitateur magnétique. On plonge la sonde dans la solution et on lit le pH (il faut veiller à ce que l'agitateur magnétique de touche pas les électrodes). (cout, Janvier 2007)

3.2. Conductivité électrique

Principe :

la conductivité est une technique d'analyse quantitative, permettant d'accéder aux concentration des ions en solution (.J-P, 1997), cette technique est basée sur la connaissance de la conductivité de la solution, grandeur directement liée à la conductance

G (l'inverse de la résistance R), mesurée avec un appareil appelé conductimètre. (Bernard , et al., 2007) .

Mode opératoire :

- Rincer la cellule à l'eau distillée.
- Plonger la cellule conductimétrique dans le milieu à analyser qui est laissée au repos sans agitation.
- Une fois la valeur affichée par le conductimètre est stabilisée on la noter de 20° C ou 25 C puis enlever la cellule de la solution la rincer à l'eau distillée.
- La lecture de la conductivité a été faite directement sur l'afficheur du conductimètre .
(cout, Janvier 2007)

3.3. Cendres

Principe : 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.

Mode opératoire : 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 (HIRECHE, 2013).

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

Principe : 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.

Mode opératoire : peser le pycnomètre vide et parfaitement sec (P0) en g.

Peser le pycnomètre rempli d'eau distillée (P1) en g.

Vider le pycnomètre et sécher à l'aide d'une étuve.

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

La densité est donnée par la formule suivante :

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

3.5. Dosage des protéines

Le dosage des protéines totales a été réalisé à l'aide de la méthode de BIURET (Gormol ,1949) utilisant le réactif Biuret amélioré par (Goodwin et al ,1965) et (Flack C.P and Woollen ,1984).

Principe : en milieu alcalin, les protéines qui possèdent au moins 4 liaisons peptidiques forment avec les ions cuivre (Cu^{2+}) un complexe bleu-violet. Un dosage colorimétrique est par conséquent envisageable à 540 nm. Le réactif de coloration utilisé est le réactif de Gornall ; il est composé :

- de sulfate de cuivre, qui donne la coloration bleu du réactif due aux ions cuivre ;
- d'hydroxyde de sodium, qui rend le milieu basique ;
- de tartrate double de sodium et de potassium, qui «chélate» (piège) l'ions Cu^{2+} et évite leur précipitation en milieu basique sous forme d'hydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ insoluble ;
- d'iodure de potassium, pour éviter la réduction du cuivre.

Un temps de réaction d'environ 30 minutes à l'obscurité est indispensable à l'obtention d'une coloration stable. La lecture étant spectrophotométrique, il faut cependant réaliser une gamme d'étalonnage mais aussi des témoins de compensations adaptés.

Mode opératoire : cette méthode consiste à doser la quantité de liaisons peptidiques.

Le biuret (formule $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}_2$, soit deux molécules d'urée) donne avec les ions cuivriques Cu^{2+} et en milieu alcalin un complexe absorbant fortement à 540 nm (coloration bleue violette due à la formation du complexe Cu^{2+} -biuret).

La liaison peptidique établie entre deux acides aminés est également capable, dans les mêmes conditions expérimentales, de former un complexe avec les ions cuivriques.

Ce complexe peut être dosé par spectrophotométrie d'absorption à 540 nm.

On réalise une gamme étalon à partir d'un standard de concentration connue ; la mesure de la concentration protéique de l'échantillon est déterminée par comparaison avec cette gamme étalon.

Le dosage par la méthode du biuret est réalisé grâce au réactif de Gornall, qui contient :

- du sulfate de cuivre : source d'ions Cu^{2+} ;
- de l'hydroxyde de sodium NaOH permettant l'alcalinisation du milieu ;
- de l'iodure de potassium qui évite la réduction (gain d'électron) du cuivre en Cu^+ ;
- du tartrate de sodium ou de potassium qui forme avec les ions Cu^{2+} un complexe, ce qui empêche leur précipitation sous forme de dihydroxyde de cuivre $\text{Cu}(\text{OH})_2$ à pH alcalin.

L'échantillon à doser est incubé en présence du réactif de Gornall pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance à 540 nm est alors déterminée à l'aide de cuves spectrophotométriques en plastique.

3.6. Sucres totaux

Principe : la méthode du phénol sulfurique donnée par *dubois et al* permet de doser les sucres totaux en utilisant le phénol et l'acide sulfurique concentré en présence de ses deux réactifs les oses donnent une couleur jaune orangé dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des glucides, les résultats sont exprimés par rapport à une gamme étalon de glucose préparée à 490nm (Nielsen, 1997).

Mode opératoire :

- Préparation de la solution à analyser

L'extraction des sucres a été faite à partir de 3g de l'échantillon par l'ajout de 30ml d'éthanol (80), le mélange a été laissé 48 heures à température ambiante, au moment du dosage, les tubes ont été placés dans l'étuve à 80°C afin d'évaporer l'alcool, par la suite 20 ml d'eau distillée ont ajoutées à l'extrait (solution à analyser). (Cuiyand et Brummer, 2005) .

- Dosage

Dans un tube à essai, 1ml de phénol et 5 ml d'acide sulfurique concentré ont été ajoutés à 1ml de la solution à analyser, après 10 min, le mélange a été placé dans bain marie pendant 20 min à 25 à 30°C.

La lecture de l'absorbance a été faite à 490 nm et la concentration en sucres totaux a été déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant le glucose comme solution standard d'étalonnage. (Dubois *et al* 1956).

La quantité des sucres totaux est déterminée à partir de la courbe d'étalonnage par la formule suivante : (sadasivam et manickarn 1996)

$$\text{ST (\%)} = \frac{(X \times V \times D)}{P} \times 100$$

Dont :

ST : Taux de sucres totaux en pourcentage.

X : Quantité de sucres calculée à partir de la courbe d'étalonnage (mg/ml).

D : Facture de dilution.

V : Volume de la solution analysée en ml.

P : Poids de la d'essai en g.

4. Méthodes microbiologiques

4.1. Ensemencement bactérien par inondation

L'ensemencement doit être effectué dans des conditions d'asepsie rigoureuses à partir d'un prélèvement d'une colonie ou d'un bouillon bactérien avec une pipette de pasteur, prélever 3 à 5 ml de la suspension bactérienne et les mettre dans une boîte de Pétri dont il faut inonder la surface par une légère rotation de la boîte, laisser la boîte inondée pendant quelques minutes (de 3 à 5 minutes et ne jamais excéder 15 minutes) afin que la milieu puisse absorber l'humidité à la surface et éliminer ensuite l'excès dans un récipient.

L'inoculum doit être toujours de bonne concentration (10^8 germes/ml) et provient d'une culture jeune, car un inoculum trop faible peut donner des colonies isolées.

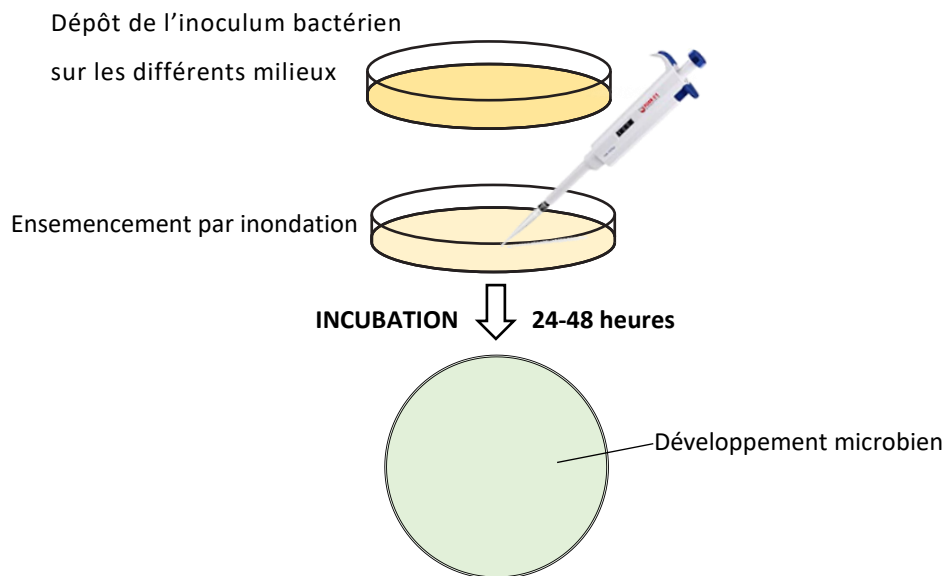


Figure 9 : Mise en culture et évaluation de la croissance bactérienne.

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.

4.2. 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 ± 2 °C.

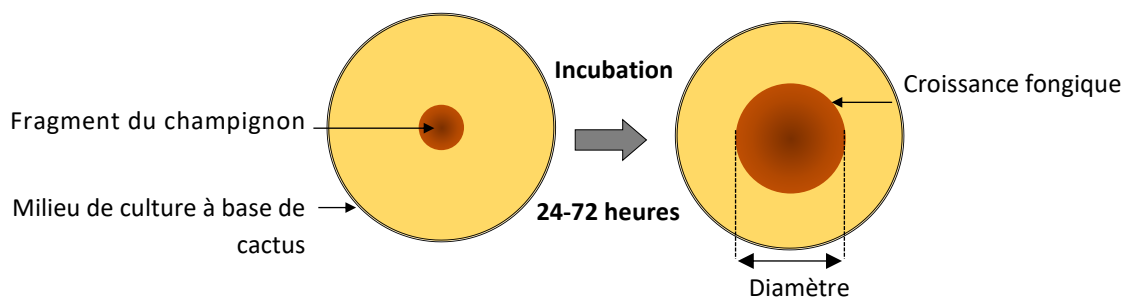


Figure 10 : Mise en culture et évaluation de la croissance fongique.

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

1.1. 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. Les tableaux ci-dessous montrent les rapprochements et les différences dans les valeurs physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques.

Tableau 4 : Principales caractéristiques organoleptiques.

Milieu	Poudre 1	Poudre 2	Mucilage
Couleur	Marron foncé	Marron clair	Jaune
Odeur	Absence d'odeurs étrangères ou anormales		
Consistance	visqueux	Plus ou moins solide	Solide
Texture	Sensiblement homogène ; pas de séparation en deux phases liquide et solide.		

D'après les résultats consignés dans le tableau 04, nous pouvons souligner que :

Les milieux préparés à base de cladode de figuier de barbarie ont une couleur marronne foncé pour poudre 1 (cladode sans épluchage) et clair pour poudre 2 (cladode épluché). La teinte foncé est généralement due à la présence du pigment de chlorophylle dans la peau de cladode. Pour les autres milieux préparés à partir du mucilage seul (méthode de décoction) la couleur observée est le jaune clair.

La plupart des milieux n'ont pas une odeur particulière, leur consistance varie suivant leur composition, les milieux à base de mucilage forment un milieu solide (dû à leur richesse en polysaccharide), et ceux à base de poudre ont un aspect très visqueux à température ambiante.

Selon (Stanley, et al., 2011), ces paramètres organoleptiques sont influencés par l'origine intrinsèque (génétique) de la plante ainsi que par les changements des conditions de croissance des différents environnements (conditions édaphiques et climatiques).

1.1.1. La densité

Tableau 5 : Valeurs de la densité des trois milieux de culture.

Densité	Origine du milieu
1.43	Milieu 1 : Poudre de cladode entier
1.38	Milieu 2 : Poudre de cladode sans peau
1.14	Milieu 3 : mucilage (décoction)

L'examen du tableau 05 nous révèle les densités des trois milieux de culture, nous remarquons ainsi que la densité des milieux est comprise entre 1.14 et 1.43.

(Mosibono, et al., 1991) indique que les variations de la densité d'un milieu de culture proviennent surtout des variations de la teneur en eau et le substrat que entre dans la composition du milieu, plus un milieu est riche en eau et moins il est dense, c'est ainsi que l'échantillon 1 présente le milieu le plus dense à 1.43 avec une teneur en eau la plus faible. En revanche, on observe que l'échantillon 3 est le moins dense avec une densité de 1.14, ce milieu présente une teneur en eau de plus grande puisqu'il est préparé par décoction.

1.1.2. Le pH

Les résultats issus de cette analyse nous donnent indication sur la réaction acide des différents milieux de culture analysés. Les valeurs du pH sont présentées dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Valeurs du pH des trois milieux de culture.

pH	Origine du milieu
5.14	Milieu 1 : Poudre de cladode entier
5.49	Milieu 2 : Poudre de cladode sans peau
5.89	Milieu 3 : mucilage (décoction)

Il est indispensable de contrôler le pH des milieux de culture pour une bonne croissance des micro-organisme, les valeurs du pH de nos échantillons des différents milieux de culture oscillent entre 5.14 et 5.89 avec une moyenne de 5.50. Donc tous les milieux étudiés sont légèrement acides, ce qui est bien conforme avec le seuil de tolérance d'un grand nombre de

bactéries et champignons, qui exigent un pH entre $4,5 < \text{pH} < 6$ (Etienne, et al., 1953), (Sadok, et al., 2006) .

1.1.3. La Conductibilité électrique

Les résultats issus de cette analyse sont portés sur le tableau 07.

Tableau 7 : Valeurs de la conductibilité électrique des trois milieux de culture.

CE (mS/cm)	Origine du milieu
6,17	Milieu 1 : Poudre de cladode entier
6,22	Milieu 2 : Poudre de cladode sans peau
6.45	Milieu 3 : mucilage (décoction)

Les valeurs de la conductibilité électrique obtenues comprises entre 6.17 et 6.22 mS/cm. Sadok, et al., (2006), signale que les milieux les plus riches en matières minérales ionisables, ont une bonne conductance électrique, et puisque nos milieux de culture sont obtenus à partir d'extraits de végétaux, ces sels entrent dans la composition minérale de la plante et donc sous influence de l'environnement ou elle a vécu.

Une relation indirecte peut apparaître entre le pH et la conductibilité électrique des différents milieux, et nous avons trouvé que les milieux de culture ont une CE élevée, enregistrent un pH élevé, cette relation peut donner une idée sur la composition minérale.

1.2. Analyse de la composition chimique des huiles essentielles

1.2.1. La teneur en protéines

Tableau 8 : Valeurs de la teneur en protéines obtenues.

Taux de protéine (%)	Origine du milieu
0.88	Milieu 1 : Poudre de cladode entier
0.75	Milieu 2 : Poudre de cladode sans peau
0.73	Milieu 3 : mucilage (décoction)

Les milieux 2 et 3 enregistrent des valeurs très proches respectivement 0.75 et 0.73 %, excepté le milieu 1 qui enregistre la plus grande valeur avec une teneur en protéines de 0.88 %.

Selon (Madigan, et al., 2007) pour synthétiser leurs protéines, les microorganismes ont besoin de substances azotées organiques (acides aminés) ou inorganiques (les nitrates et les nitrites). Dans notre cas les milieux de culture sont à base des extraits végétaux, la protéine apportée par les différents milieux de culture représente la quantité d'acides aminés disponibles pour la synthèse protéique couvrant les besoins des microorganismes en culture.

Tableau 9 : Valeurs de la teneur en sucres totaux.

Sucres totaux (%)	Origine du milieu
2,69	Milieu 1 : Poudre de cladode entier
3.75	Milieu 2 : Poudre de cladode sans peau
4.38	Milieu 3 : mucilage (décoction)

L'analyse de tableau 09 nous a permis de constater que la teneur en sucres totaux varie selon l'extrait utilisé dans la préparation du milieu de culture, le milieu 3 à base de mucilage enregistre la plus haute teneur 4.38 %, la plus faible valeur a été enregistrée avec le milieu 1 (poudre sans épluchage) avec 2.69 %.

Les micro-organismes se multiplient à partir des aliments ou nutriments présents dans les milieux de culture. Ils ont tous un certain nombre de besoins communs: nécessité de source d'énergie, de source de carbone, de source d'azote et d'éléments minéraux. Ces besoins de base sont appelés besoins élémentaires (Leveau, et al., 1993).

Les bactéries et champignons utilisés dans le cadre de ce travail sont chimiotrophes incapables de réaliser la photosynthèse, les protéines et les sucres même s'ils sont présents qu'en toute petite quantité, il s'avère que leur présence est indispensable à la survie de ces microorganismes.

2. Effet des différents sur la croissance microbienne

2.1. Effet des différents milieux sur la croissance bactérienne

La caractérisation du niveau de croissance et du développement bactérien après incubation a permis d'établir le tableau ci-dessous :

Tableau 10 : Représentation simplifiée de la croissance microbienne.

	Milieu 1	Milieu 2	Milieu 3
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	+	++

M1 : Poudre de cladode entier, **M2** : Poudre de cladode sans peau, **M3** : mucilage (décoction)

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

Le tableau 10 nous indique que la croissance bactérienne n'est pas similaire à chaque milieu de culture, au milieu 1, il a été observé que la souche *Staphylococcus aureus* n'a pas pu se développer dans ce milieu alors que E-coli se développe d'une manière très faible et elle garde cette tendance dans le milieu 2, ou aucune différence n'a été enregistrée entre les deux souche ou leur croissance reste est faible. La souche E-coli a donné une croissance importante sur milieu 3 par rapport aux autres milieux de culture, ce milieu à base de mucilage de cladode a aussi permis une croissance modérée de la souche *Staphylococcus aureus*.

Ces résultats montrent donc que les deux souches sont sensibles à la composition du milieu 1, soit parce qu'elles ne peuvent plus assurer leur métabolisme, soit à cause de la présence d'une substance inhibitrice. La peau de cladode, n'étant pas épluchée, dans le milieu 1, cela signifie qu'elle contient des substances qui inhibe le développement des souches cultivées sur ce milieu puisque les autres milieux sans peau ont permis une croissance même modérée dans les pires des cas.

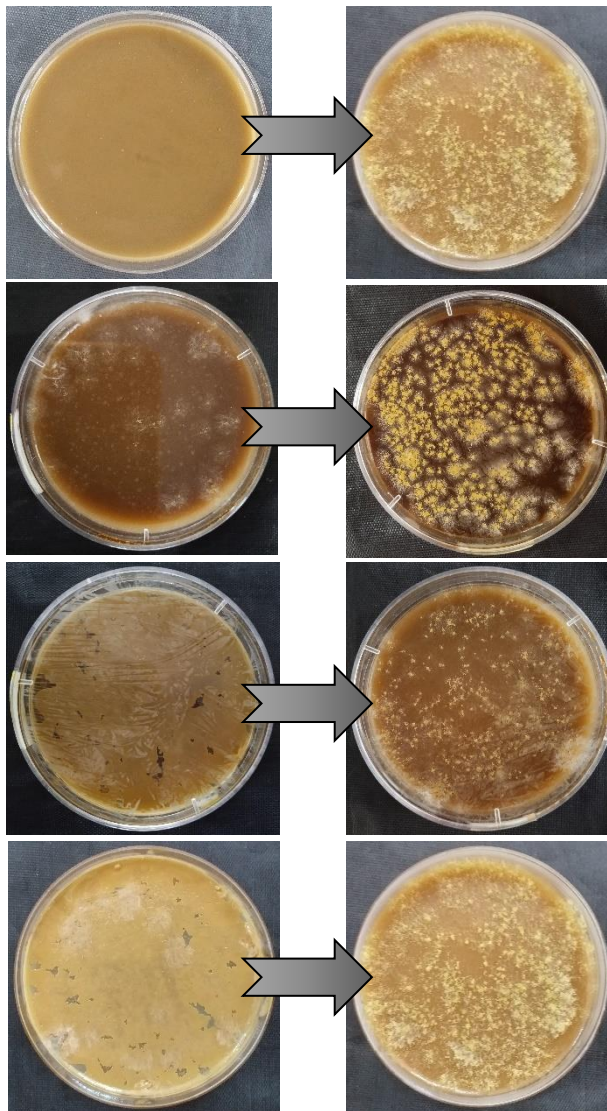


Figure 11 : Résultats de la croissance bactérienne dans les différents milieux.

2.2. Effet des différents milieux sur la 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 sur la croissance radiale *in vitro* du mycélium sont représentés à la figure 10.

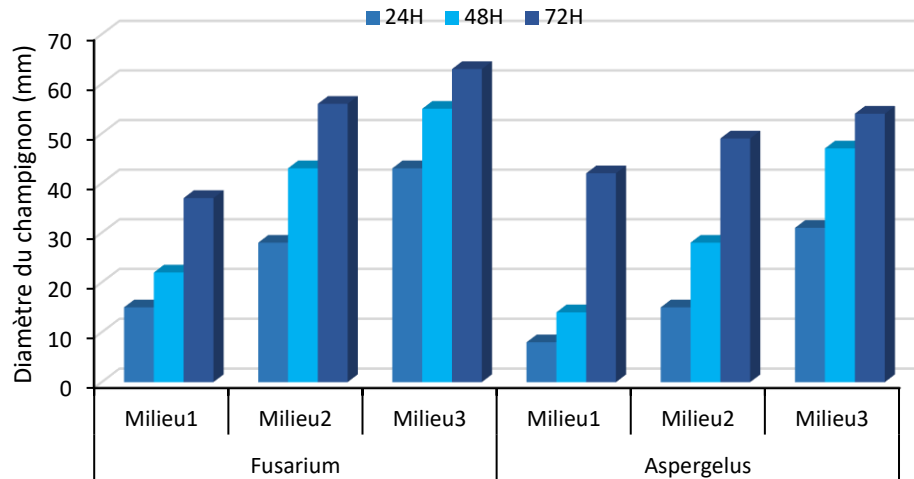


Figure 12 : Croissance radiale mycélienne sur les différents milieux.

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 microbienne dans chaque milieu. A l'issue de ces résultats il est clair qu'après trois 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 *Fusarium oxysporum* et ce quel que soit le milieu de culture, avec des diamètres de 37, 56 et 63 mm après 72 heures de culture sur respectivement sur le milieu 1, 2 et 3. En plus, on a constaté que l'inoculum *Aspergillus niger* a enregistré le plus court diamètre de mycélium sur tous les milieux, avec des valeurs de 42, 49 et 54 mm après 72 heures de culture sur les trois milieux 1, 2 et 3 respectivement. Ces résultats indiquent aussi que le milieu 1 préparé à partir de poudre de cladode avec peau aurait un effet négatif sur la croissance des souches puisqu'il a été remarqué que les plus faibles valeurs de croissances radiales ont été enregistrées sur ce milieu.

Il est à noter aussi que les meilleures croissances radiales ont été toujours enregistrées dans le milieu à base de mucilage.

Toutes ces tests *in vitro* montrent que les trois 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.

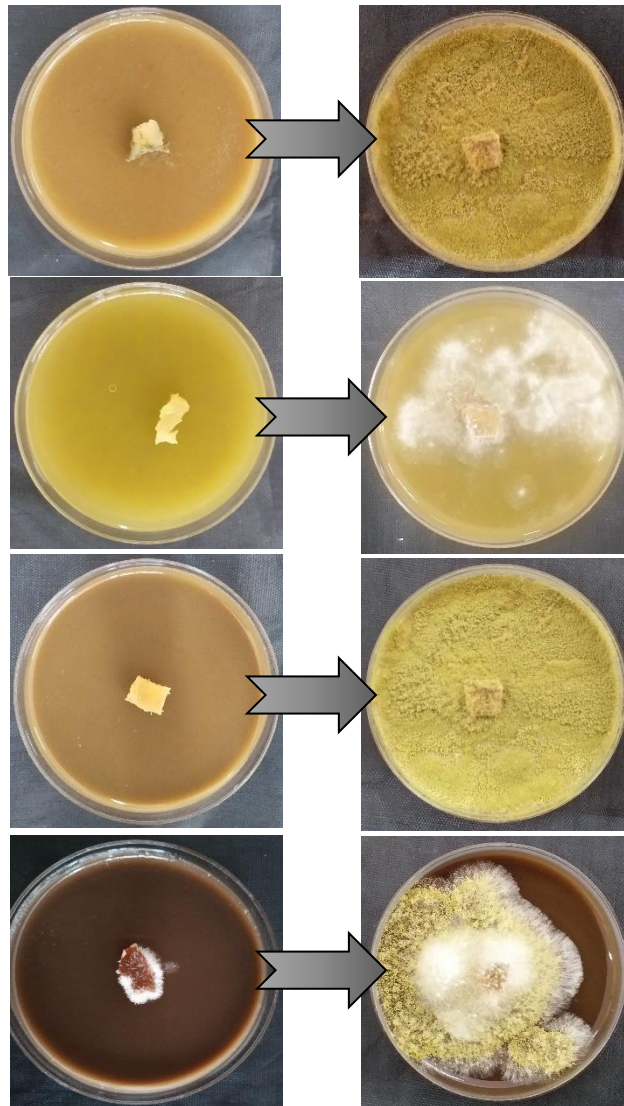


Figure 13 : Résultats de la croissance fongique dans les différents milieux.

Conclusion

CONCLUSION

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, viens cette étude, qui a pour objectif de formuler un nouveau milieu de culture *in vitro*, 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.

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, le milieu 3 (à base de mucilage seul) est plus productif et affiche le meilleur rendement en terme de croissance des deux microorganismes, par rapport aux milieu 1 et 2. 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

J-P Montoroi 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.

Ambrosini Adriana, de Souza Rocheli et Passaglia Luciane M.P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity [Revue]. - [s.l.] : Springer International Publishing, 13 2016. - 1-2 : Vol. 400. - pp. 193-207. - <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2727-7>.

Assia Boudjellaba Siham Melle YASSA Activité antioxydante des graines de quelques variétés de figue de barbarie (*Opuntia ficus-indica* L. [Ouvrage]. - (2011/2012).

Barbera G, Inglese P et Pimienta B Culture agro-écologique et utilisations de la poire de cactus [Rapport]. - 1995.

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.

Boutakiout Amale Etude physico-chimique, biochimique et stabilité d'un nouveau produit : jus de cladode du figuier de Barbarie marocain (*Opuntia ficus-indica* et *Opuntia megacantha*). [Ouvrage]. - (Maroc) : [s.n.], 2015.

Bretaudeau A. Les techniques de culture in vitro et la micropropagation des espèces végétales [Ouvrage]. - 2006.

C Ochatte quality and biotechnology [Ouvrage]. - 2005.

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.

Demol J. Baudoin J.P. & Louant application aux principales espèces cultivées en régions tropicales. [Ouvrage]. - 2008.

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.

FAO Ecologie culture et utilisation du figuier de barbarie [Revue]. - 2018.

- Farah Aabouch** Initiation aux techniques de la culture in vitro [Ouvrage]. - 06/06/2018.
- 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.
- hayat belkacem siham m elle hammiche** Développement local, tourisme et valorisation du patrimoine
Une ressource territoriale à valoriser : cas du figuier de barbarie [Ouvrage]. - 2015.
- HIRECHE Messaouda** Etude de l'activité antioxydante de la tomate séchée [Ouvrage]. - 2013.
- international l'organisation des nation unies pour l'alimentation et l'agriculture et le centre**
ecologie culture et utilisation du figuier de barbarie [Ouvrage]. - Italie : [s.n.], 2018.
- Jay-Allemand C., Capelli, P., et Cornu, D** Root development of in vitro hybrid walnut microcutting
in vermiculite containing gelrite medium. [Ouvrage]. - France : [s.n.], (1992).. - Vol. 335-342.. - 45160..
- Kenza Benattia Farah** Chimie bio-organique et thérapeutique [Ouvrage]. - 21/11/2017.
- Leveau J et Bouix M** Microbiologie industrielle: Les micro-organismes d'intérêt industriel [Ouvrage] /
éd. T&d Edition. - Paris : Edition Technique et documentation, 1993. - Vol. 1 : p. 612.
- lynda drali manel ikhlef** Etude physico-chimique de la pulpe et de l'huile extraite à partir des graines de
figue de barbarie [Ouvrage]. - 10/07/2017.
- Madigan M et Martinko J** Brock Biologie des micro-organismes [Ouvrage] / éd. Education Edition
Pearson. - Paris : Edition Pearson Education, 2007. - 11 : p. 1047.
- Mosibono E, Habari H et Paulus J** Essai de culture mycélienne de quelques champignons comestibles
zaïrois sur milieu semi-synthétique [Revue] // Tropicultura. - 1991. - 9. - pp. 135-142.
- NEFFAR Souad** (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 Tébessa) [Ouvrage]. - 2011/2012.
- Nerd A Karadi A, Mizhari Y.** Plant soil [Ouvrage]. - 137 (2).
- Nielsen S-S** Food Analysis Laboratory Manuel [Ouvrage]. - New York . USA : Kluwer Academic
Plenum Publishers, 1997. - p. 800.
- nouara benabdallah hadjer melle daoud** effet du stress salin sur le comportement de quelques
écotypes du figuier de barbarie (*Opuntia ficus indica* Mill) dans la région Hodna [Ouvrage]. - 2017/2018.
- S. Abidi** Potentiel nutritionnel de quelques génotypes de cactus et voies d'amélioration et d'utilisation
en alimentation animale [Ouvrage]. - 2010, 12-16.

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

sarra Berrahil el-kattel benameur melle. Miloud Etude physico-chimique de l'huile des graines de figues de barbarie [Ouvrage]. - Juin 2019.

Souleyman DELMI Mohammed Effet antimicrobien d'extrait d'Opuntia ficus-indica sur certain bactérie pathogène [Ouvrage]. - 04 /07 /2018.

Souleyman Dr Delmi Mohammed Mémoire effet antimicrobien d'extrait d'Opuntia ficus- indica sur certain bactérie pathogène [Ouvrage]. - 2018.

Stanley H et Nyenke U Cultural Studies on Mycelia of Pleurotus pulmonarius (Oyster Mushroom) in Selected Culture Media [Revue] // Int. Journ. Sci. Nat. - 2011. - 2 : Vol. 2. - pp. 183-185.