

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

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 :

ABDELLAH Hayat

ABDELLAOUI Khadidja

RAHMANI Mohammed Soufiane

Thème

« Valorisation de la flore locale dans l'obtention de produits à haute valeur ajoutée ; cas d'*Aloe vera* issu des sites différents »

Soutenu le : 00/ 06/2022

Devant le jury composé de :

Président M. BOUBEKEUR Mohamed

Promoteur M. BOUFARES Khaled

Examinatrice Mm. SOUALMI Nadia

Année universitaire 2021 - 2022

Remerciements

Nous tenons à remercier en premier lieu notre promoteur M. BOUFARES KH, pour avoir accepté de nous encadrer et pour ses conseils qui nous ont permis d'évoluer dans notre vision de la recherche et de la façon de la mener, qu'il trouve ici l'expression de notre profonde gratitude

Nous tenons à remercier particulièrement notre Co-promoteur M. Magni, pour nous assister dans le travail de laboratoire

C'est un honneur pour nous que M. BOUBEKEUR Mohamed et Mm. SDUALMI Nadia aient accepté de bien vouloir juger la qualité de notre travail, nous leur présentons nos remerciements les plus respectueux

Nos remerciements également à : M. Houari pour son aide et conseils

L'ensemble des personnels de la faculté des sciences de la nature et de la vie nos enseignants du fondamentale à l'université.

Dédicace

A mes *chers parents*

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect,
Mon amour et considération pour tous les sacrifices que vous avez
consenti pour mon instruction, que je puisse réussir mes études et de
bien-être.

J'espère avoir répondu aux espoirs que Vous avez fondés en Puisse
Dieu, le très haut :

Vous accordes sante, bonheur et longue vie.

A ma chère grande sœur *Ibtissem*

A mes chers frères : *Ahmed, Belkacem*

A mes chères cousines *Amel* et *Rima*

A tous les membres de ma famille, petits et grands

A mes chères amies *Khadidja, Malika* et *Soufiane*

A tous mes amies avec qui je partage les bons moments de mes
études et ma vie

A tous mes *enseignants* de puis mes premières années d'études

Abdellah hayat



Dedicace

A ma très chère *mère* :

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point te remercier comme il se doit. Ton affection me couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à mes côtés a toujours été ma source de force pour affronter les différents obstacles.

A mon très cher *père* :

Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.

A mes très chers frères : *youcef* et *ali*, et mes belles sœurs :

hadjira et *sondos*.

A mon fils *Anes* et mon mari *Abd el kader* :

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes meilleurs amis *hayat* et *soufiane* :

Puisse Dieu vous donne santé, bonheur, courage et surtout réussite .

ABDELLAOUI Khadidja



Dedicace

Au nom d'*ALLAH* le tout miséricordieux le très miséricordieux

Je dédie ce mémoire

À ma *chère mère*, je vous remercie pour tout le soutien et l'amour que vous me portez depuis mon enfance, pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être et j'espère que votre bénédiction m'accompagne toujours
Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.

A mon cher oncle :

Mon conseiller, je ne te remercierai jamais assez
Pour ton amabilité, ta générosité, ton aide précieuse.

À mon *cher frère* source de joie et de bonheur

À tous les membres de *la famille*

À mes chères amies *Hayat et Khadidja*

À mes amies de toujours, qui n'ont jamais cessé de
m'encourager et me soutenir,

A tous mes enseignants depuis mes premières *années d'études*

Je vous remercie tous pour vos encouragements et votre
soutien.

Rahmani Mohammed Soufiane



Table des matières

Liste des abréviations	i
Liste des tableaux	i
Liste des figures	ii
INTRODUCTION.....	1
Synthèse bibliographique	3
Chapitre 01 : Généralité sur l’Aloe vera	3
1. Généralité sur Généralité sur l’Aloe vera	3
1.1. Origine et historique	3
1.2. Biologie de l’Aloe vera.....	4
1.3. Systématique	4
1.4. Description morphologique	5
1.5. Physiologie et adaptation d’Aloe vera	7
1.6. La récolte	7
2. Composition chimique de l’Aloe vera	8
3. Multiplication	9
4. Principales vertus de l’Aloe vera	10
4.1. Améliore la digestion.....	10
4.2. Renforce le système immunitaire	10
4.3. Apporte une dose de vitamines.....	10
5. Intérêt industriel de l’Aloe vera	10
Chapitre 02 : Généralité sur les milieux de culture	12

1. Généralité sur les milieux de culture	12
1.1. Définition des milieux de culture	12
1.2. Classification des milieux de culture	13
1.3. Principaux ingrédients des milieux de cultures	14
Partie expérimentale.....	18
Chapitre 01 : Matériel et méthodes	18
1. Matériel	18
1.1. Matériel végétal.....	18
1.2. Matériel biologique.....	18
1.3. Matériel de laboratoire.....	20
2. Principales étapes pour les essais <i>in vitro</i>	20
2.1. Préparation du milieu de culture d'Aloe vera	21
2.2. Analyses physico-chimiques et organoleptique	23
3. Evaluation de l'efficacité des poudres d'Aloe vera comme nouveau milieu de culture pour différents organismes.....	25
3.1. Ensemencement et mise en culture des bactéries.....	25
3.2. Ensemencement et mise en culture des champignons	27
3.3. Ensemencement <i>in vitro</i> des explants de tomate.....	27
Chapitre 02 : Résultats et discussion	29
1. Analyses des propriétés physico-organoleptiques	29
1.1. Composition chimique	29
1.2. Effet des différents milieux sur la croissance bactérienne	30
1.3. Effet des différents milieux sur la croissance fongique	32
1.4. L'effet des différents milieux sur microboutures de tomate	34

Conclusion	36
Références bibliographiques.....	37

Resume

La culture *in vitro* est généralement réalisée dans un milieu nutritif solide ou semi-solide, en utilisant des agents gélifiants. L'objectif de la présente étude était de contribuer à la mise en place d'un nouveau milieu de culture *in vitro*, à base de poudre d'Aloe vera, qui est riche en mucilages et forme avec de l'eau une pâte idéale pour préparer des milieux de culture naturels. Une évaluation des propriétés et capacités des différents milieux à satisfaire les besoins nutritifs de quelques organismes a été faite. 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 milieu MCSP. 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, *Aloe vera*, *Staphylococcus aureus*, substances naturelles.

الملخص :

يتم إجراء الاستزراع في المختبر بشكل عام في وسط مغذي صلب أو شبه صلب ، باستخدام عوامل. التبلور.

كان الهدف من هذه الدراسة هو المساهمة في إنشاء وسط جديد للزراعة في المختبر يعتمد على مسحوق الصبار ، الغني بالصبغ ويشكل معجونًا مثاليًا بالماء لتحضير وسائط الاستزراع الطبيعي

تم إجراء تقييم لخصائص وقدرات الوسائط المختلفة لتلبية الاحتياجات الغذائية لبعض الكائنات الحية

في نهاية هذه الدراسة ، أثر نوع الركيزة المستخدم في تحضير الوسائط المختلفة بشدة على نمو الكائنات الحية الدقيقة في الزراعة المختبرية ,تم الحصول على أفضل أداء من حيث النمو الفطري والبكتيري في وسط زراعة بدون جلد لذلك ، يمكننا تصنيف وسيطنا على أنه بسيط عادي موصى به لزراعة بعض .البكتيريا والفطريات دون متطلبات غذائية معينة

الكلمات المفتاحية : البكتيريا والفطريات وسائط الاستزراع الطبيعي ,وسط زراعة بدون جلد

Abstract

In vitro culture is generally carried out in a solid or semi-solid nutrient medium, using gelling agents. The objective of the present study was to contribute to the establishment of a new in vitro culture medium, based on Aloe vera powder, which is rich in mucilages and forms with water an ideal paste for prepare natural culture media. An evaluation of the properties and capacities of the different media to satisfy the nutritional needs of some organisms was made. At the end 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 MCSP medium. Therefore, we can qualify our medium as an ordinary medium recommended for the cultivation of certain bacteria and fungi with no particular nutritional requirement.

Keywords:

Microorganism culture, in vitro, E-coli, nutrient medium, Aloe vera, Staphylococcus aureus, natural substances.

Liste des abréviations

MCP : Milieu de Culture avec Peau

MCSP : Milieu de Culture Sans Peau

pH : Potentiel hydrique

E. Coli : *Escherichia coli*

CAM : Crassulacean Acid Metabolism

CE : conductivité électrique

Liste des tableaux

Tableau 1 : Synthèse des deux principales classifications botaniques utilisées aujourd'hui.....5

Tableau 2 : Résumé de la composition chimique des feuilles d'Aloe vera.9

Tableau 3 : Principaux ingrédients des milieux de culture.....15

Tableau 4 : La différence entre les supports solides et liquides.16

Tableau 5 : Principales caractéristiques organoleptiques.....29

Liste des figures

Figure 1 : Aloe vera à l'état spontané à Ain El Hadid (W de Tiaret).....	4
Figure 2 : Photographie et planche illustrée de l'Aloe vera.	6
Figure 3 : Morphologie générale et la coupe transversale d'une feuille.	7
Figure 4 : Illustration représentant divers produits fabriqués à partir de gel d'Aloe.	11
Figure 5 : Protocole expérimental.	20
Figure 6 : Différentes étapes de la préparation du substratum.	21
Figure 7 : Les étapes de la préparation du milieu de culture.	22
Figure 8 : Mise en culture des souches bactériennes.	26
Figure 9 : Mise en culture des souches fongiques.	27
Figure 10 : Micro-bouturage in vitro d'explant de tomate sur les deux milieux.	28
Figure 11 : Représentation graphique de la croissance bactérienne.	30
Figure 12 : Croissance bactérienne dans les deux milieux.	31
Figure 13 : Evolution de la croissance radiale des mycéliums durant les 7 jrs.	32
Figure 14 Représentation graphique de Taux de croissance fongique	33
Figure 15 : Croissance fongique sur les deux milieux de culture.	34



Introduction

INTRODUCTION

Depuis des temps immémoriaux, les humains se sont tournés vers la nature pour satisfaire leurs besoins alimentaires et médicaux. Au cours de la dernière décennie, marquée par le formidable essor des biotechnologies, l'exploitation des substances naturelles de toutes origines, terrestres ou marines, végétales et animales, utilisées comme produits en soi ou comme sources de nouvelles molécules, a suscité un intérêt croissant de la part des industriels et du grand public. Le phénomène trouve ses manifestations les plus nombreuses et les plus « médiatiques » dans les secteurs des produits et compléments alimentaires, de la cosmétologie et de la parfumerie. Dans le domaine thérapeutique, il suscite de grandes attentes, plus ou moins fondées. Mais il concerne également bien d'autres secteurs : produits phytosanitaires, dépolluants, nouveaux matériaux, pour ne citer que quelques exemples de ce qu'on appelle la « chimie verte ».

Dans ce contexte, viens cette étude, qui a pour objectif la valorisation des ressources végétale locale, ou nous nous intéressons tout particulièrement à l'Aloe vera, afin de trouver de nouvelle substance ayant des propriétés intéressantes et pouvant être avantageusement utilisées comme substitut aux produits de synthèse.

L'histoire a montré que l'Aloe vera est l'une des plantes mentionnées les plus anciennes jamais enregistrées en raison de ses propriétés médicinales et de ses bienfaits pour la santé. (Mehta, 2017). L'Aloe vera a été adoptée pour ses vertus thérapeutiques dans les médecines traditionnelles de nombreuses régions du monde, ou sa culture s'est rapidement développée dans la plupart des régions africaines et dans le bassin méditerranéen surtout dans l'ouest algérien (Mehta, 2017) .

Souvent appelée « plante miracle » ou « guérisseur de la nature », l'Aloe vera est une plante aux multiples vertus.

Le nom 'Aloe' vient du mot arabe "alloeh" ou du mot hébreu "halal", signifiant substance amère et brillante ; « Vera » en latin signifie « réel ». En raison de son toucher de cactus, Aloe est souvent appelé à tort un "Cactus du désert". Il en existe près de 420 espèces mais seules quelques-unes sont reconnues pour leurs propriétés thérapeutiques. (Mehta, 2017)

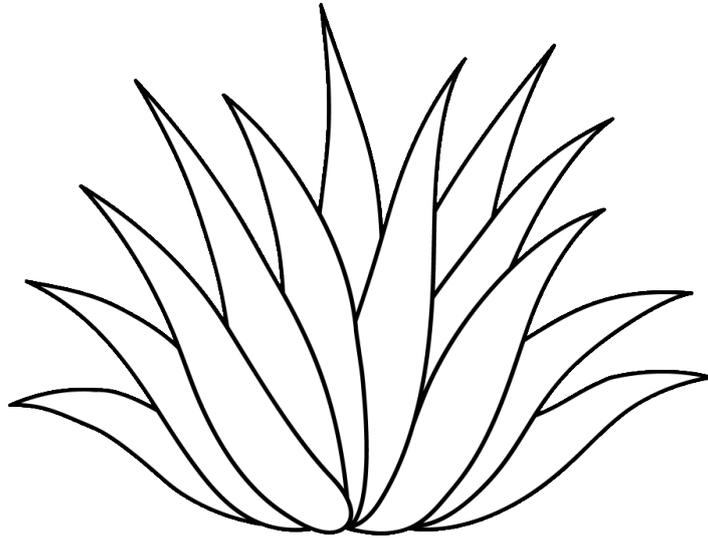
Cette ressource est un véritable produit économique, à partir de ses feuilles, en préparant une vaste gamme d'ingrédients pour des produits cosmétiques et médicinaux. Ce qui engendre des revenus, une ressource économique importante dans les zones arides et semi-arides, où la plante pousse, avec une amélioration du niveau de vie des populations de ces régions reculées, cela pourrait même participer à la réduction des distorsions territoriales.

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

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de recherche est l'obtention de produits à haute valeur ajoutée à travers la formulation d'un nouveau milieu de culture *in vitro*, à base de poudre d'Aloe vera, et d'évaluer les propriétés organoleptiques et les capacités de ce nouveau milieu de culture à satisfaire les besoins nutritifs des organismes en culture.

***Synthèse* bibliographique**

Généralité sur l'Aloe vera



Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Généralité sur l'Aloe vera

1. Généralité sur Généralité sur l'Aloe vera

L'Aloe vera est une espèce végétale semblable à un cactus appartenant à la famille des Liliaceae. C'est une vivace connue depuis l'Antiquité pour toutes ses vertus. Le gel d'aloë vera est utilisé depuis l'époque romaine ou même avant pour de nombreuses indications. Ses applications ont été rapportées dans les cultures anciennes d'Égypte, d'Inde, de Grèce, de Rome et de Chine. La plupart des produits cosmétiques et médicinaux sont fabriqués à partir de gel d'aloë vera obtenu à partir du tissu mucilagineux au centre des feuilles de la plante. (Martyna Zagórska-Dziok, 2017).

1.1. Origine et historique

L'utilisation de l'Aloe vera en phytothérapie remonte à plus de 5000 ans. On en retrouve des traces dans toutes les grandes civilisations. Pour preuve, des écrits des civilisations sumérienne et chinoise datant du 3ème millénaire avant JC, ainsi que des tablettes d'argile découvertes en Mésopotamie attestant de son usage médicinal au cours du 2ème millénaire avant JC.

L'Aloe vera s'est ensuite développé dans l'Égypte du temps des pharaons (description dans le papyrus d'Elbers), dans la Grèce antique, chez les Arabes et les Indiens, puis chez les Romains et en Asie. Pour la petite histoire, l'île de Socotra, dans l'océan indien, a été conquise par Alexandre Le Grand plus de 300 ans avant notre ère, dans le but de fournir de l'aloë à son armée.

L'Aloe vera n'a été introduit en Europe qu'au cours de la Renaissance. Ce sont ses propriétés laxatives qui seront utilisées jusqu'au 19ème siècle, époque à laquelle on commence à s'intéresser à ses autres qualités.

La plante a ensuite été importée aux Amériques, lors de la conquête espagnole. Ainsi, dès 1820, l'aloë fait partie de la pharmacopée Américaine pour ses propriétés laxatives. En 1850, deux américains isolent la substance responsable de cette propriété et la nomme : aloïne. En 1935, des médecins utilisent de l'aloë afin de traiter des brûlures dues aux rayons X. Un peu plus tard, les survivants des bombardements d'Hiroshima et de Nagasaki l'emploieront pour soigner les brûlures de leur peau. A partir de cette date, il devient un produit dermatologique et

cosmétique à la mode. Dès lors, non seulement cette plante est toujours incluse dans de nombreuses préparations mais l'étude de ses vertus va se développer. C'est ainsi qu'en 1938, les principaux éléments actifs sont identifiés et qu'en 1959, la plante réussit à être stabilisée de manière naturelle. Après 1968 et des recherches poussées effectuées par divers chercheurs, l'Aloe vera va connaître un réel essor dans le monde entier. Depuis, des travaux scientifiques approfondis ont confirmé les connaissances empiriques que l'on avait. (Michayewicz, 2013)

1.2. Biologie de l'Aloe vera

L'aloë vera, un membre de la famille des Liliaceae, est une plante vivace aux feuilles vert turgide jointes à la tige en forme de rosette. (Rafael Minjares-Fuentes, 2019)

Au bout de 4 à 5 ans, la plante peut atteindre jusqu'à un mètre : on peut alors commencer à prélever ses feuilles pour la fabrication de remèdes ou de cosmétiques.



Figure 1 : Aloe vera à l'état spontané à Ain El Hadid (W de Tiaret).

1.3. Systématique

En botanique, il existe plusieurs systèmes de classification, la classification traditionnelle étant à distinguer de la classification APG (Angiosperm Phylogeny group).

L’Aloe vera n'appartient pas à la même famille selon le système de classification utilisé. En parcourant la littérature botanique et scientifique, on remarque que l’Aloe vera est une plante classée dans des familles différentes : Asphodélacées, Aloécées, Xanthorrhoeacées et Liliacées. Cette dernière est celle que l’on rencontre le plus souvent.

Tableau 1 : Synthèse des deux principales classifications botaniques utilisées aujourd’hui.

Classification Conquist (1981)		Classification APG III (2009)
Règne :	Plantae	Clade : Angiospermes Clade : Monocotylédones Ordre : Asparagales Famille : Xanthorrhoeaceae Sous famille : Asphodeloideae Espèce : <i>Aloe vera</i>
Division :	Magnoliophyta	
Classe :	Liliopsida	
Sous- classe :	Liliidae	
Ordre :	Liliales	
Famille :	Aloeaceae	
Genre :	<i>Aloe</i>	
Espèce :	<i>Aloe vera</i>	

1.4. Description morphologique

Il s'agit d'une plante à tige plus ou moins courte qui pousse jusqu'à 80-100 cm de hauteur, se propageant par des décalages et des pousses racinaires. Les feuilles sont épaisses et charnues en raison du tissu de stockage de l'eau dans les feuilles pour survivre dans les zones sèches de faibles précipitations. Les feuilles sont vertes à gris-vert, avec une marge dentelée. Les fleurs sont produites sur un pic jusqu'à 90 cm de haut, chaque fleur pendulaire, avec une corolle tubulaire jaune de 2-3 cm de long.(Priyanka Sharma, 2014)

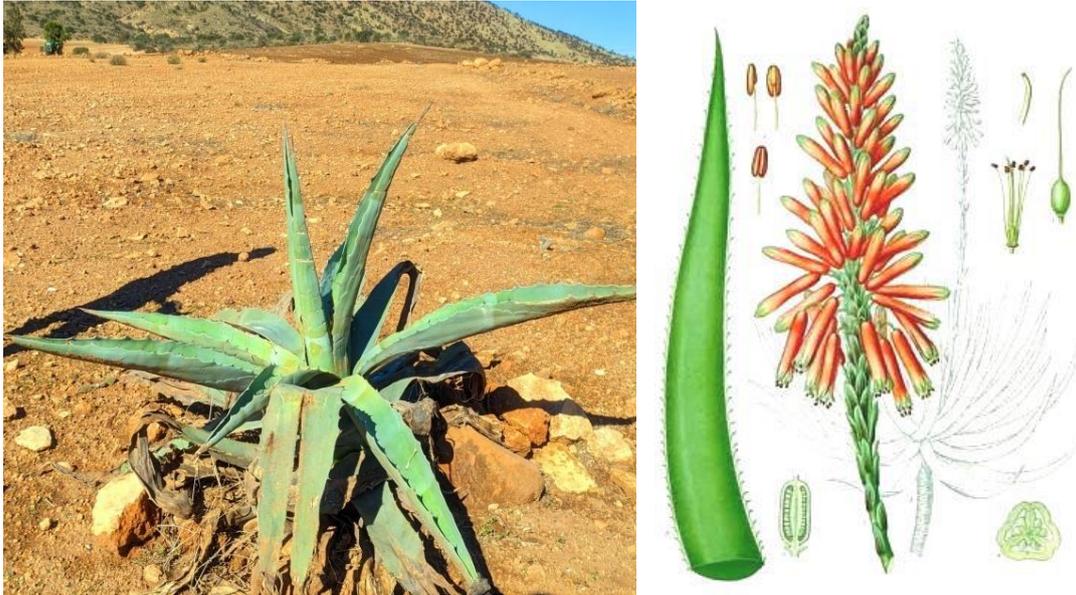


Figure 2 : Photographie et planche illustrée de l'Aloe vera.

1.4.1. Feuilles

L'Aloe vera possède des feuilles charnues, fragiles et pourvues d'épines, qui poussent en forme de rose, disposées en spirale. D'une très belle couleur verte lorsqu'elles sont indirectement au soleil (par exemple derrière une fenêtre), elles atteignent 80 cm de long et 10 cm dans leur plus grande largeur, avec des bords munis d'épines jaune clair. Les feuilles les plus jeunes poussent au centre de la plante, les plus âgées se retrouvent donc à l'extérieur. (Perrot, et al., 1971)

La description de l'intérieur de la feuille peut porter à confusion car on trouve de nombreux termes pour le désigner : pulpe interne, parenchyme ou tissu mucilagineux, gel ou gelée mucilagineuse, gel interne. En réalité, le terme « pulpe » ou « parenchyme » désigne la partie intacte charnue de la feuille d'Aloe vera, contenant entre autres la paroi des cellules et les organites, alors que le terme « gel » ou « mucilage » se réfère au seul liquide visqueux contenu dans les cellules (Ni, 2004)



Figure 3 : Morphologie générale et la coupe transversale d'une feuille.

1.5. Physiologie et adaptation d'Aloe vera

L'aloès est une plante xérophile. Les Aloe vera naturalisées croissent en région sèche sur des sols arides. Sur le plan physiologie, l'Aloe vera se présente comme une plante de type CAM (Crassulacean Acid Metabolism). Elle a la particularité de fixer le CO₂ 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 feuilles. Le mucilage en retenant l'eau, permet selon (Evêque, 1995) aux organes de résister aux hautes températures.

1.6. La récolte

Les plantes d'Aloe vera mettent environ 3 ans à atteindre une taille récoltable, et restent productifs entre 3 à 4 ans après maturité. Ils peuvent produire une cinquantaine de feuilles durant toute leur vie. Après la récolte des feuilles, il faut distinguer l'extraction du suc de celle du gel, qui donne lieu à la réalisation de produits aux usages complètement différents (Schmelzer, 2008).

2. Composition chimique de l'Aloe vera

La composition chimique du gel d'Aloe vera est complexe. L'aloé vera contient 75 composants potentiellement actifs : vitamines, enzymes, minéraux, sucres, lignine, saponines, acides salicyliques et acides aminés . Le détail est le suivant :

Vitamines : la plante contient de nombreuses vitamines, dont les vitamines A, C et E, qui sont des antioxydants. Il contient également de la thiamine, de la niacine, de la riboflavine, de la vitamine B12, de la choline et de l'acide folique. L'antioxydant neutralise les radicaux libres.

Enzymes : amylases, lipases, phosphatases alcalines, les cellulases, catalases et peroxydases sont biochimiques catalyseurs qui aident à la digestion en décomposant les graisses et les sucres. Les carboxypeptidases et les bradykinases produisent un effet anti-inflammatoire en inactivant les bradykinines. Les lectines produisent des effets antitumoraux.

Minéraux : sodium, potassium, calcium, magnésium, sélénium, manganèse, cuivre, zinc, chrome et fer, on les trouve tous dans la plante d'aloès. Ces minéraux jouent un rôle important dans le fonctionnement des enzymes, impliquées dans diverses voies métaboliques.

Sucres : les sucres sont situés dans la couche mucilagineuse de la plante sous la croûte de la feuille. Il comprend les monosaccharides (glucose et fructose) et les polysaccharides (glucomannose et polymannose). Les polysaccharides agissent comme des immunomodulateurs. Le Glumannan est un bon hydratant et est utilisé dans les produits cosmétiques.

Acides aminés : le gel d'aloé vera fournit les acides aminés nécessaires à la réparation et à la croissance. Il comprend 20 des 22 acides aminés non essentiels et 7 des 8 acides aminés essentiels.

Anthraquinones : les exsudats jaune rougeâtre amer, situé sous la croûte verte extérieure, contient anthraquinones et leurs dérivés, Barbaloin, aloémodine-9-anthrone, isobarbaloin, Anthrone-C-glycosides et chromones. Il s'agit de composés phénoliques.

Stérols : ceux-ci comprennent le cholestérol, le Campestérol, le β - Sitostérol et le Lupeol. Toutes ces substances ont une action anti-inflammatoire et le lupéol possède également des propriétés antiseptiques et analgésiques.

Acide salicylique : il s'agit d'un composé de type aspirine possédant des propriétés anti-inflammatoires et antibactériennes.

Saponines : Ce sont les substances savonneuses qui ont propriétés nettoyantes et antiseptiques.(Michayewicz, 2013)

Les composants contenus dans la feuille sont décrits dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Résumé de la composition chimique des feuilles d’Aloe vera.

Acides aminés essentiels	Isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, valine.
Acides aminéssecondaires	Acide aspartique, acide glutamique, alanine, arginine, cystine, glycine, histidine, proline, hydroxyproline, sérine, tyrosine
Minéraux etoligoéléments	Calcium, chlore, cuivre, chrome, fer, lithium, magnésium, manganèse, phosphore, potassium, sodium, zinc
Mono-etpolysaccharides	Glucose, mannose, cellulose, aldo-pentose, L-rhamnose, acemannan, aloéride
Vitamines	A, B1, B2, B3, B6, B9, B12, C, E
Enzymes	Phosphatase alcaline, amylase, bradykinase, carboxypeptidase, catalase, cellulase, lipase, peroxydase
Composants organiques et lipides contenus dans le gel	Stérols (béta-sitostérol, lupéol, campestérol, cholestérol), acide salicylique, gibbérelline, lupéol, lignines, acide urique, acide arachidoniques.

Source : (Michayewicz, 2013)

3. Multiplication

Pour la culture, la multiplication végétative est préférée aux graines, en raison de la levée médiocre des semis et de la croissance plus rapide des rejets. Un déficit hydrique peut entraîner une diminution de la formation des rejets. Ceux-ci peuvent être coupés sur la plante mère quand ils atteignent 15-20 cm de long, et peuvent être cultivés en pépinière la première année.

La micropopagation par culture in vitro de méristèmes végétatifs ainsi que la régénération in vitro d'explants de base des feuilles sont aussi possibles.(Schmelzer, 2008)

4. Principales vertus de l'Aloe vera

La feuille d'aloë contient plus de 200 composés dont 75 actifs, 20 minéraux, 20 acides aminés et 12 vitamines. Cette plante aux mille vertus permet notamment de lutter contre les soucis digestifs et les brûlures d'estomac. Elle a une action dépurative sur l'organisme, c'est un excellent stimulant pour le transit. La présence de choline contribue aussi au contrôle du cholestérol et permet un bon fonctionnement du foie(Giret, 2021).L'aloë vera regorge d'excellents bienfaits santé :

4.1. Améliore la digestion

Le jus d'Aloe vera est réputé pour rétablir le bon fonctionnement du système digestif. Il est très efficace pour atténuer les douleurs gastriques et les remontées acides en cas de reflux gastro-œsophagien. Grâce à son action antibactérienne, l'aloë vera améliore le bon fonctionnement des intestins tout en agissant comme un bouclier contre les bactéries responsables des intoxications alimentaires.(Giret, 2021)

4.2. Renforce le système immunitaire

Le suc d'Aloe vera contient un polysaccharide renforçant les défenses naturelles. En lien avec la remise en état du système digestif, l'Aloe vera a un effet booster sur l'organisme en donnant un "coup de fouet" aux défenses immunitaires.(Giret, 2021)

4.3. Apporte une dose de vitamines

L'Aloe vera est un concentré de vitamines. On y retrouve dans sa pulpe de l'acide folique et des vitamines A, B1, B2, B6, B12, C, D et E. Ce shot d'énergie permet de renforcer la vitalité de l'organisme, et lui permet de mieux se défendre lors des changements de saison.(Giret, 2021)

5. Intérêt industriel de l'Aloe vera

C'est l'une des espèces d'aloès les plus commercialisées et la transformation de la pulpe de feuilles est devenue une industrie majeure. Dans l'industrie alimentaire, il a été utilisé comme source d'aliments fonctionnels et comme ingrédient pour la

production de boissons. Dans les produits cosmétiques et de toilette, il est utilisé comme matériau de base pour la production de crèmes, lotions, savons, shampoings, nettoyants pour le visage et d'autres produits. Dans l'industrie pharmaceutique, il est utilisé pour la fabrication de produits topiques tels que les pommades et les préparations de gel, ainsi que dans la production de comprimés et de capsules.

Le gel d'Aloe vera peut être utilisé pour administrer efficacement des médicaments peu absorbables par la voie orale d'administration de médicaments, en raison de ses effets d'amélioration de l'absorption. Par conséquent, le gel d'aloès séché a été utilisé avec succès pour fabriquer des comprimés de type matrice directement compressible. (Priyanka Sharma, 2014)

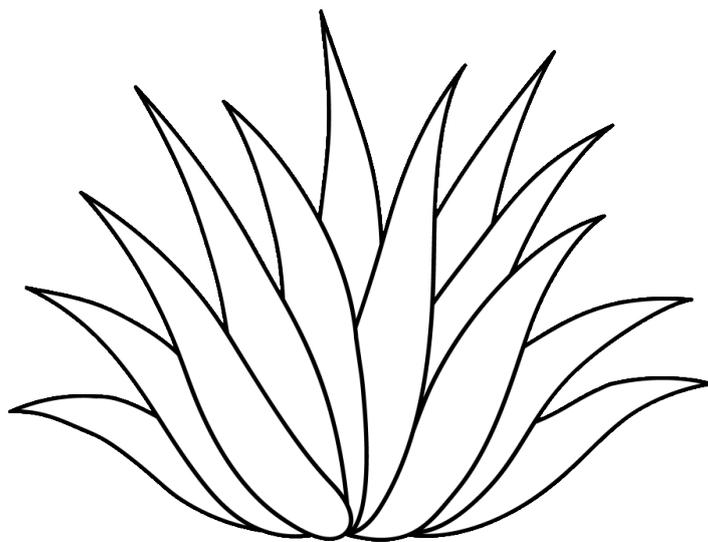


Figure 4 : Illustration représentant divers produits fabriqués à partir de gel d'Aloe.

Chapitre 02 :

Généralité sur les milieux de

culture



Chapitre 02 : Généralité sur les milieux de culture

1. Généralité sur les milieux de culture

Un milieu de culture est un support qui permet la culture de cellules, de bactéries, de levures, de moisissures afin de permettre leur étude. En principe, les cellules trouvent dans ce milieu les composants indispensables pour leur multiplication en grand nombre, rapidement, mais aussi parfois des éléments qui permettront de privilégier un genre bactérien ou une famille. Ainsi, selon le but de la culture, il est possible de placer les micro-organismes dans des conditions optimales, ou tout à fait défavorables (NIAT, et al.)

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.

Il existe aussi des bouillons de culture qui possèdent la même fonction, mais ces milieux ne contiennent pas d'agar-agar, ils sont donc totalement liquides. (Kaboka, 2017)

1.1. Définition des milieux de culture

Les milieux de culture utilisés en bactériologie sont des milieux contenant les éléments nécessaires et en quantité suffisante à la survie et à la multiplication des bactéries, ils doivent par ailleurs posséder les propriétés physico-chimiques convenant à une culture optimale (pH, Isotonie, Potentiel d'oxydoréduction) (Bensakhria, 2018).

La composition d'un milieu de culture varie, elle est choisie en fonction du but à atteindre et des besoins requis par la bactérie, un milieu minimum doit comporter obligatoirement : Une source d'eau (eau distillée), une source de carbone ou l'énergie (Glucose), une source d'azote et soufre, potassium (K) et phosphore (P), calcium (Ca) et magnésium (Mg), (sels de cuivres de zinc, de cobalt...etc.). Les facteurs de croissance et des Vitamines peuvent être rajoutés aux bactéries autotrophes (Bensakhria, 2018).

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 »

Ces milieux permettent la culture d'une variété de bactéries aussi grande que possible, mais il n'existe pas de milieu universel.

Le choix d'un milieu usuel est en général fonction de l'habitat naturel des bactéries à isoler ou conditionné par l'examen microscopique direct du produit étudié.

En bactériologie médicale on utilise souvent des milieux à base d'extrait de viande pour la culture de la plupart des microbes commensaux ou pathogènes de l'homme et des animaux(Dubois, 2019).

1.2.1.b) Milieux d'isolement

Ces milieux, qui permettent d'obtenir les bactéries contenues dans un produit naturel à l'état de culture pure, peuvent être : Les milieux de base usuels précédemment cités.

Les milieux de base enrichis de produits biologiques : sang, suppléments polyvitaminiques, sérum. Ces milieux enrichis facilitent l'isolement des bactéries fragiles et exigeantes à partir des produits pathologiques.

Les milieux électifs et sélectifs qui favorisent la culture d'une espèce ou d'un groupe d'espèces bactériennes alors que la croissance des autres bactéries est difficile, entravée, ou nulle(Marchal, et al., 1987).

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

Selon leur composition, on peut conserver aussi bien les bactéries non exigeantes que les bactéries exigeantes. On distingue 3 types de milieux :

Milieu complexe empirique (naturel) : la composition de ce milieu n'est pas bien définie, c'est le milieu naturel de la bactérie.

On retrouve des extraits de viande, des extraits de levure, les peptones. Exemple : Milieu coeur cervelle BHIB (Brain Heart Infusion Broth). (Bensakhria, 2018)

Milieu semi-synthétique : au milieu complexe sont rajoutées des substances chimiques bien définies, ceci concerne les produits ayant un intérêt pour la bactérie, comme les facteurs de croissance. Exemple : Gélose enrichie au sang de mouton. (Bensakhria, 2018)

Milieu synthétique : la composition est parfaitement définie tant en quantité qu'en qualité, ce sont des milieux utilisés dans la mise en évidence d'une réaction enzymatique précise. Exemple : Milieu de Ferguson. (Bensakhria, 2018)

1.2.2. Classification d'après le mode de stérilisation

Il existe 02 types de milieux :

1.2.2.a) Milieux autoclavables

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

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons

1.2.2.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

Les milieux solides et liquides sont deux types de milieux de culture couramment utilisés. Le milieu solide est préparé en ajoutant une substance solidifiante. Les

agents solidifiants couramment utilisés sont la gélatine ou la gélose. Les fluides liquides ne sont pas fournis avec un agent solidifiant. Les milieux solides et liquides contiennent des nutriments et d'autres substances nécessaires à la croissance des micro-organismes. La principale différence entre les milieux solides et liquides est la présence ou l'absence d'agar-agar ou d'un agent de solidification (Acharya, 2017).

Tableau 3 : 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 hydrosolubles. (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 ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , PO ₄ ⁻² , SO ₄ ⁻² , HCO ₃ ⁻ ...). 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 , 2021)

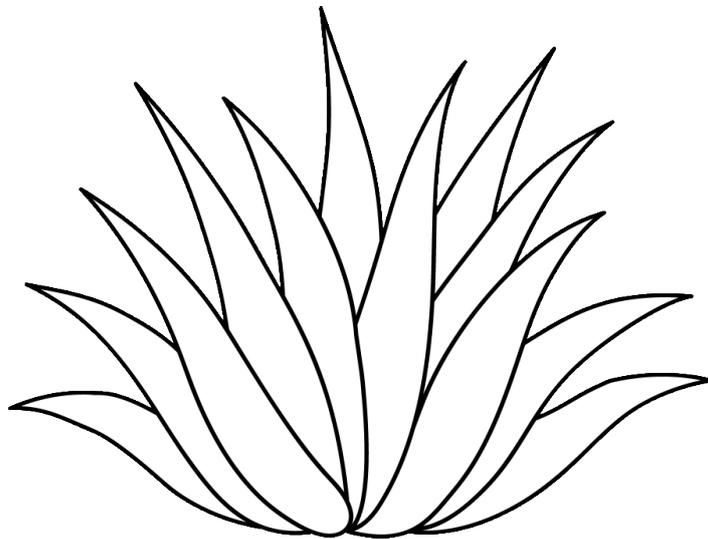
Tableau 4 : La différence entre les supports solides et liquides.

Milieu solide vs liquide	
Les milieux solides sont un type de milieu de culture utilisé pour cultiver des microorganismes.	Les milieux liquides sont un type de milieu de culture utilisé pour cultiver des microorganismes.
Présence de gélose	
Les milieux solides contiennent de la gélose.	Les milieux liquides ne contiennent pas de gélose.
Des boîtes de Pétri	
Des médias solides sont versés dans des boîtes de Pétri.	Les médias liquides ne sont pas versés dans des boîtes de Pétri.
Les usages	
Les milieux solides sont utilisés pour isoler les bactéries ou pour déterminer les caractéristiques des colonies des microorganismes.	Les milieux liquides sont utilisés à diverses fins, telles que la propagation d'un grand nombre d'organismes, les études de fermentation et divers autres tests. Par exemple. Tests de fermentation du sucre, bouillon MR-VR

Source : (Acharya, 2017).

Partie expérimentale

***Matériel* et Méthodes**



Partie expérimentale

Chapitre 01 : Matériel et méthodes

L'objectif principal de ce travail est de développer un milieu à base d'extrait d'*Aloe vera* pour optimiser la croissance des microorganismes (champignons et bactéries) et des tissus végétaux (microboutures de tomate) *in vitro*. Pour cela, nous avons testé des poudres de deux plantes de différentes provenance (Tiaret et Tlemcen).

Cette section est dédiée à la présentation de tous les équipements et protocoles expérimentaux que nous avons utilisés dans notre travail :

Dans une première partie, la source et la nature des matières premières utilisées comme support de recherche sont détaillées. Nous décrivons ensuite les techniques d'extraction utilisées et les analyses physico-chimiques réalisées. La troisième partie est consacrée au détail de tous les tests *in vitro* d'évaluation des différents milieux. Enfin, la dernière section 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 poudre d'*Aloe vera*, (2) matériel biologique constitué de deux souches bactériennes et deux souches fongique, (3) matériel de laboratoire.

1.1. Matériel végétal

Le projet porte sur l'*Aloe vera*, l'une des plantes polyvalentes les plus répandues dans les régions sèches d'Algérie, et peut ainsi être un levier de développement local et régional dans ces zones (Valoriser la flore locale). Le produit que nous avons recherché tout au long du processus de recherche est un extrait sec d'aloë vera.

Dans ce travail, des échantillons de raquette (brindille) d'*Aloe vera* ont été collectés le (14 Novembre 2021) au niveau de deux (2) régions différentes en Algérie comme suit : Tiaret, Tlemcen.

1.2. Matériel biologique

Les micro-organismes utilisés dans les expériences consistaient en deux souches bactériennes et deux souches fongiques comme suit :

Souches bactériennes utilisées :**➤Escherichia coli**

Escherichia coli (ou *E. coli* ou colibacille) est un organisme modèle étudié dans les laboratoires de biologie, est une bactérie, organisme procaryote appartenant à la famille des Entérobactéries, en forme de bâtonnet, Gram négatif.

Escherichia coli possède un génome à ADN double brin circulaire de 4,6 millions de paires de bases, qui est entièrement séquencé. Elle se réplique très rapidement à 37°C, toutes les 20 minutes, ce qui permet de multiplier facilement de l'ADN ou des protéines d'intérêt(futura-sciences).

➤Staphylococcus

Staphylococcus aureus est une coccobactérie Gram positif, catalase positive appartenant à la famille des Staphylococcaceae, elle a un diamètre d'environ 0,5 à 1,5 µm, est immobile, asporulé et facultativement anaérobique (sauf *S. aureus anaerobius*) ; elle est habituellement disposée en grappes. De nombreuses souches produisent des entérotoxines staphylococciques, la toxine superantigénique du syndrome de choc toxique (TSST- 1) et des toxines exfoliatives. *Staphylococcus aureus* fait partie de la flore humaine et est surtout présent dans le nez et sur la peau

Souches fongiques utilisé (ESB, 2011).

Souches fongiques utilisées :**➤Fusarium oxysporum**

Fusarium oxysporum est un type d'ascomycète de la famille des Nectriacées. Comme tous les *Fusariums*, c'est une forme asexuée d'ascomycètes, mais son téléomorphe est inconnu. C'est un complexe d'espèces terrestres, omniprésentes et parasites des plantes, y compris un certain nombre d'espèces spéciales (f. Sp.) qui infectent collectivement plus de 100 hôtes différents (Sherb, 2020).

➤Aspergillus niger

Aspergillus niger, 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(Chevalier, 2019).

L'aspergillus niger est un mycète mésophile : sa température de croissance optimale est de 20-40 °C, avec une bonne croissance à 37 °C. Il peut survivre à 60 °C, mais, dans les jus de fruits par exemple, il ne survit pas lorsqu'il est exposé à une température de 63 °C pendant 25 minutes.

1.3. 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, boites de Petri, 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 5) :

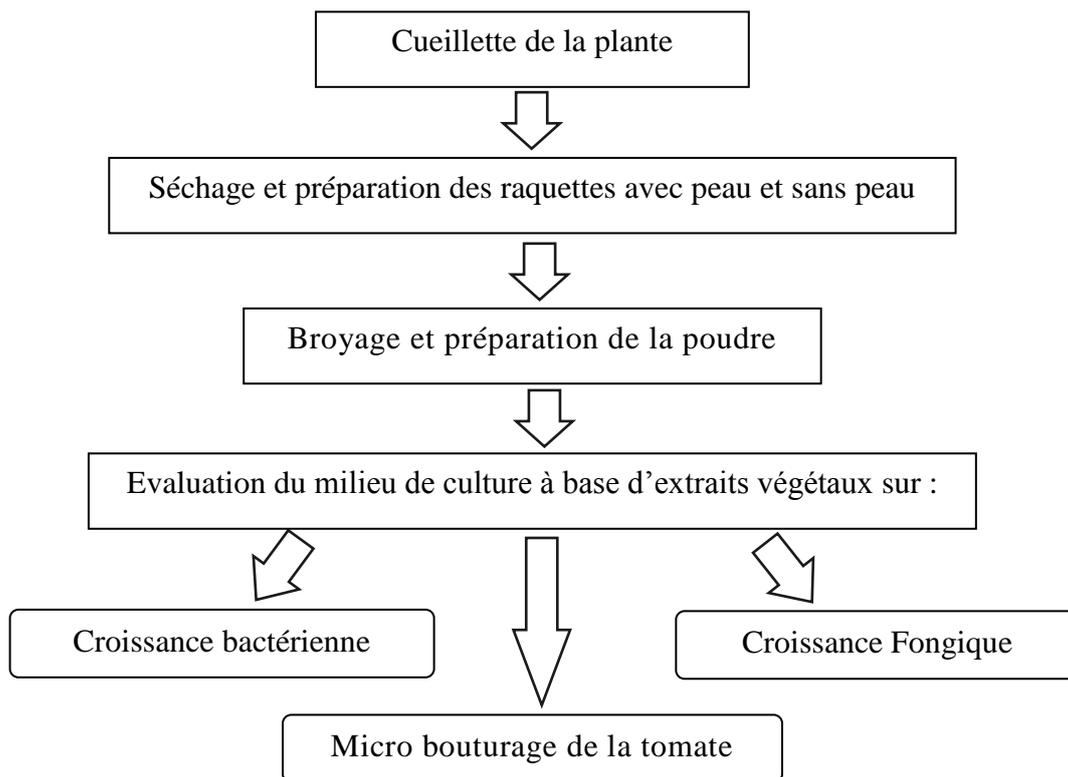


Figure 5 : Protocole expérimental.



Figure 6 : Différentes étapes de la préparation du substratum.

1. Nettoyage : les bords des feuilles de la plante d'Aloe vera sont pleins d'épines difficiles à enlever, cette étape nous permet de nous débarrasser des épines.

2. Epluchage : cette étape se caractérise par l'élimination de la couche superficielle de la plante d'Aloe vera à l'aide d'un outil pointu.

3. Découpage : à ce stade, nous divisons le cladode en morceaux sans enlever la croûte, après cela, nous effectuons le processus de séchage.

4. Séchage : les morceaux de la plante sont séchés à l'air libre, à l'abri de la lumière, de la chaleur et de l'humidité.

5. Broyage : on broie la plante d'Aloe vera en deux parties, avec la peau et sans peau, à l'aide d'un broyeur électrique afin d'obtenir une poudre homogène.

6. Blutage (tamisage) : À travers un tamis avec une goutte de 0,05 en laboratoire, les granulés de poudre d'Aloe vera ont été séparés en fonction de leur taille et les fibres inutiles ont été retirées puis stockées dans des boîtes pour utilisation.

2.1. Préparation du milieu de culture d'Aloe vera

Avant de commencer la préparation, il faut stériliser le matériel et les mains puis procéder comme suit :

Dissoudre une quantité suffisante de poudre d'Aloe vera dans l'eau distillée stérile (15 g de poudre pour 1 L d'eau distillée) (Figure 7 A) dans une fiole jaugée, ajouter

15 g d'agar agar à la solution, et agiter avec un agitateur magnétique (500tours/80⁰ C). (Figure 7 B)

Ajouter graduellement. Pour obtenir une solution homogène lorsque la solution commence à bouillonner, retirer la solution de la plaque chauffante et refroidir à environ 60 °C. Placer le milieu encore chaud dans un flacon en verre stérile (Figure 7 C), puis fermer pour l'autoclavage à 121 °C pendant 15 min (Figure 7 D). Après stérilisation, la solution est refroidie pendant 30 minutes, puis coulée dans une boîte de Pétri de diamètre 90 mm à une hauteur 4 mm, et solidifiée sur la paille. Les boîtes sont conservées au réfrigérateur à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 7 E).

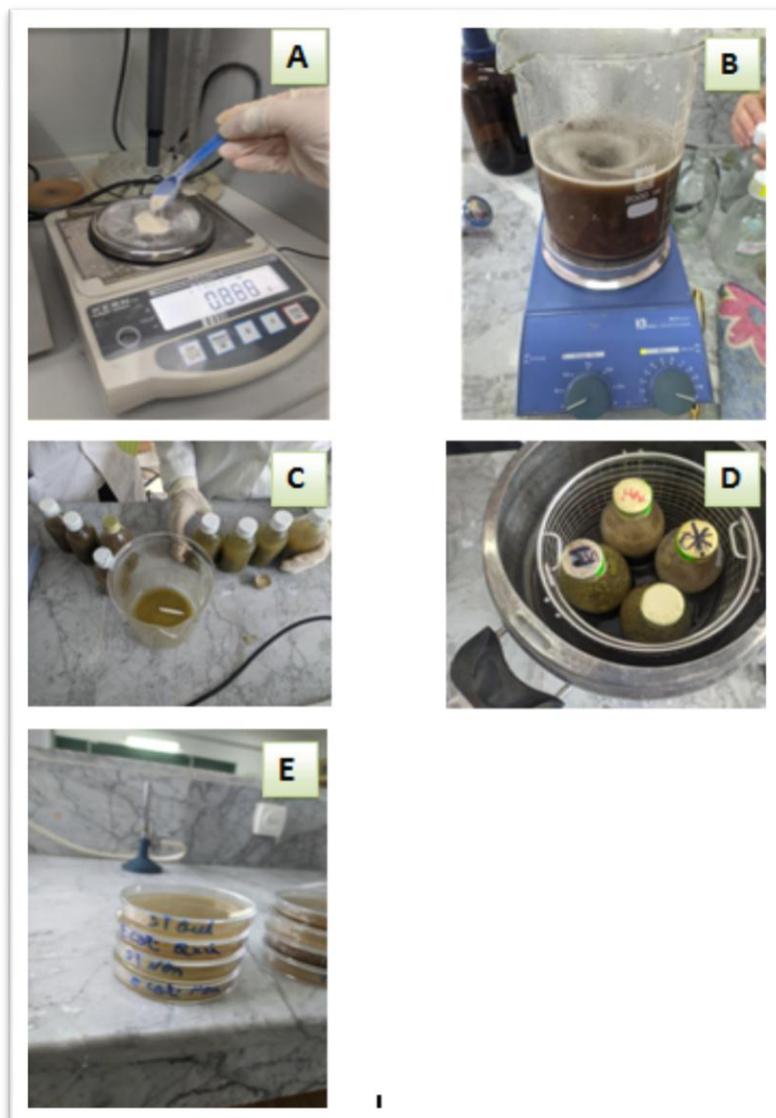


Figure 7 : Les étapes de la préparation du milieu de culture.

2.2. Analyses physico-chimiques et organoleptique

Les analyses sont réalisées sur la poudre d'Aloe vera. Un procédé de broyage et de tamisage de matériel végétal en de fines particules est utilisé afin de concentrer les composés bioactifs dans les poudres résultantes.

En fonction des analyses, la poudre est analysée fraîche, ou séchée à l'étuve

Les cendres : la cendre totale est un résidu de composés minéraux qui reste après l'incinération d'un échantillon contenant de la matière organique. La quantité moyenne de cendres est déterminée par la différence de poids.

Une quantité de poudre d'Aloe vera, est incinérée dans un four à moufle à 550°C pendant 5 heures jusqu'à l'obtention d'un résidu grisâtre, clair ou blanchâtre. Le taux de cendres est calculé par la formule suivante à partir de la différence de poids avant et après combustion.

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

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.

Teneur en lipides : la teneur en matière grasse a été déterminé suivant la norme FIL (1987) Gottlieb. Son principe repose sur une extraction des lipides au moyen d'éther d'éthylique et d'éther de pétrole puis, le mélange de solvants est évaporé et les lipides extraits sont pesés.

La matière azotée totale : elle est déterminée par la méthode de KJELDAHL, en minéralisant la poudre par l'acide sulfurique concentré en présence d'un catalyseur. L'azote organique est transformé en azote ammoniacal par la soude et on le dose après l'avoir reçu dans l'acide borique (indicateur). Le taux de matière azote totale est obtenu par convention en multipliant le taux d'azote total par le coefficient 6.25 (ISO, 1982 in CIRAD, 2003).

Le pH : le pH (potentiel hydrogène) représente la mesure de l'acidité ou de l'alcalinité en chimie d'une solution ou d'un milieu. Les valeurs du pH varient de 1 à

14 unités sur une échelle logarithmique en solution aqueuse (Actu-Environnement, 2022).

Le papier pH, se présente sous la forme de bandes étroites de papier imbibées d'un indicateur universel. Il se compose d'un mélange d'indicateurs de différentes couleurs qui varient en fonction du pH de la solution testée. Une goutte du liquide à évaluer est déposée sur le papier pH et un changement de coloration s'observe immédiatement.

La lecture et l'interprétation des résultats se font par comparaison entre la teinte obtenue et le code couleur fourni avec la boîte de papier pH. (Actu-Environnement, 2022).

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).

Les sucres solubles totaux

Sont dosés par la méthode au phénol de DUBOIS et al. (1956). Elle consiste à prendre 100 mg de matière fraîche, placées dans des tubes à essais, on ajoute 3 ml d'éthanol à 80% pour faire l'extraction des sucres. On laisse à température ambiante pendant 48h à l'obscurité. Au moment du dosage les tubes sont placés dans l'étuve à 80°C pour faire évaporer l'alcool. Dans chaque tube on ajoute 20ml d'eau distillée à l'extrait. C'est la solution à analyser.

Dans des tubes à essais propres, on met 2ml de la solution à analyser, on ajoute 1ml de phénol à 5% (le phénol est dilué dans de l'eau distillée); on ajoute rapidement 5ml d'acide sulfurique concentré 96% tout en évitant de verser de l'acide contre les parois du tube. On obtient, une solution jaune orange à la surface, on passe au vortex pour homogénéiser la couleur de la solution. On laisse les tubes pendant 10mn et on les place au bain-marie pour 10 à 20mn à une température de 30 °C (La couleur de la réaction est stable pendant plusieurs heures). Les mesures d'absorbances sont effectuées à une longueur d'ondes de 485nm. La courbe d'étalonnage est réalisée selon l'équation suivante : $Y=3,868$.

3. Evaluation de l'efficacité des poudres d'Aloe vera comme nouveau milieu de culture pour différents organismes

Afin d'évaluer l'efficacité des poudres de cladodes d'*Aloe vera* comme nouveau milieu de culture pour différents microorganismes, on a opté pour deux souches bactériennes (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) ainsi que deux souches fongiques (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*).

Les différents microorganismes utilisés sont issus d'une collection conservée au sein du laboratoire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université Ibn Khaldoun de Tiaret. Le protocole de la culture des différents microorganismes est le suivant (manipulation sous hotte pour être en condition stérile) :

3.1. Ensemencement et mise en culture des bactéries

3.1.1. Préparation de la suspension bactérienne

Dans des conditions stériles, prélever une colonie isolée représentant la souche à l'étude avec une pipette Pasteur ; répartir en bandes sur une nouvelle boîte de milieu de démarrage (c'est-à-dire un milieu contenant les nutriments nécessaires pour initier le développement), L'ensemble du milieu est ensuite incubé pendant 18 à 24 heures à la température optimale pour le développement de la souche.

Après plusieurs heures (24 heures), certaines des cellules bactériennes inoculées se sont transformées en colonies d'aspect pelucheux coloré ou incolore. C'est l'étape de l'illumination ou du réveil. Les colonies continueront à proliférer tant qu'elles resteront dans ce milieu de départ.

À la fin de cette étape, des suspensions troubles dessouches revivifiées seront réalisées en prélevant 3 à 5 colonies bien isolées et identiques. On les dépose dans 5 ml d'eau physiologique stérile puis on agite au vortex. Les concentrations bactériennes de l'inoculum sont évaluées par turbidité et sont exprimées par la mesure de la densité optique (DO à 600 nm) sur un spectrophotomètre. Une DO de 0.08 à 0.1 correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml.

3.1.2. Ensemencement

La suspension bactérienne préparée à partir d'une culture jeune (18h), en milieu bouillon nutritif (BN), diluée dans de l'eau physiologique de manière à renfermer 10^8

germes/ml, est d'abordensemencée en surface sur milieu gélosé en boîte de Pétri de 9 cm de diamètre. Ensuite, les boîtes de Pétri sont placées dans une étuve pour incubation à 35 ± 2 °C pendant 72 heures.

Sur les deux milieux de culture coulés en boites de Pétri, l'ensemencement a été fait en stries transversales de sorte que chaque cellule se développe en une colonie isolée. Les milieux ainsi ensemencés sont transférés à l'incubateur (étuve). La durée d'incubation été de 72 heures, à une température de 37°C. Chaque test est réalisé trois fois au cours de trois expériences successives.



Figure 8 : Mise en culture des souches bactériennes.

3.1.3. Lecture et interprétation

La croissance se traduira par l'apparition de colonies isolées ou un amas de micro-organismes chacun originant d'une même cellule. Le nombre de colonie à la surface seront comparés entre les différents milieux afin de classer ces milieux et interpréter la sensibilité des souches pour chaque milieu.

Le calcul d'UFC après dénombrement sur milieu solide sans répétition :

$$\mathbf{UFC} = \frac{\mathbf{N} \times \mathbf{F}}{\mathbf{V}}$$

N = nombres de colonies ; **V** = volume de dilution ; **F** = facteur de dilution

Nombre de colonies (UFC/ml) = (germes/ml) = (bactérie/ml).

3.2. Ensemencement et mise en culture des champignons

Sur les deux milieux de culture coulés en boîtes de Pétri, l'ensemencement fongique a été fait par un dépôt de fragment de 5 mm de diamètre de chaque souche (*Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*) au centre de la boîte de Petri, ces disques fongiques ont été prélevés à partir d'un tapis mycélien issu de culture de 7 jours.

Les milieux ainsi ensemencés sont incubés à l'obscurité à 25 ± 2 °C.

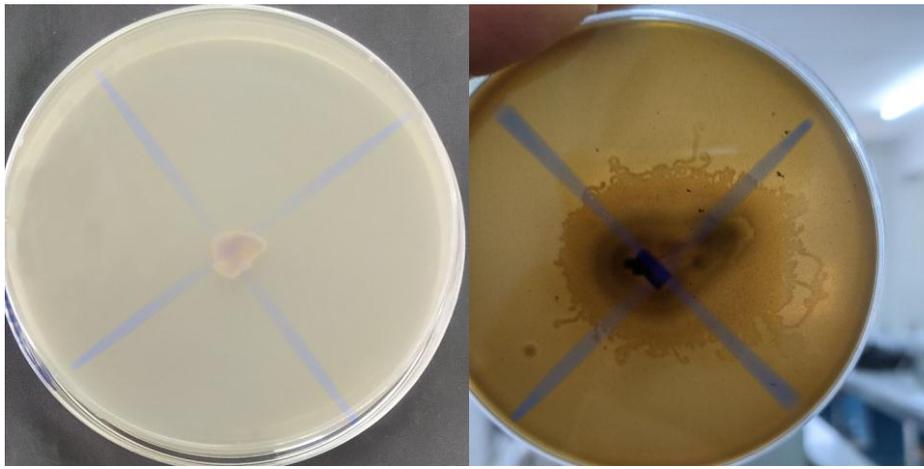


Figure 9 : Mise en culture des souches fongiques.

3.2.1. Lecture et interprétation

La croissance du mycélium a été mesurée avec une règle graduée à la même heure chaque jour, passant par le centre de la boîte dans deux 2 directions perpendiculaires, et la moyenne des deux 2 diamètres perpendiculaires a été soustraite du diamètre de disque (5mm) et comparée l'une à l'autre afin de classer ces différents milieux et expliquer la sensibilité de chaque souche fongique à chaque milieu de culture. La croissance diamétrale finale est estimée après 7 jours d'incubation.

3.3. Ensemencement in vitro des explants de tomate

La culture in vitro de tissus végétaux est généralement réalisée dans un milieu nutritif solide ou semi-solide, en utilisant des agents gélifiants. Le type d'agent gélifiant ainsi que la composition chimique du milieu de culture utilisé peut influencer la croissance des tissus végétaux en culture.

Pour évaluer les différents milieux pour la culture in vitro de la tomate, des explants de la plante ont été préparés à partir de fragments d'hypocotyles et de racines (sans apex) de 3 à 4 mm de long sont prélevés à partir des plantes âgées d'une semaine et sont repiqués sur différents milieux préparés à base d'extraits d'Aloe vera.

Avant de commencer la manipulation, on prépare la hotte par stérilisation et la mise en marche de la ventilation, puis on prépare tout le nécessaire et on laisse la hotte fonctionner pendant 30 minutes avant de commencer l'ensemencement des explants de tomate.

Le repiquage des explants sur les différents milieux de culture autoclavés est effectué à l'aide de pince stérilisée et près de la flamme du bec bunsen, tout en flambant l'ouverture de la boîte avant et après l'opération sous la hotte.

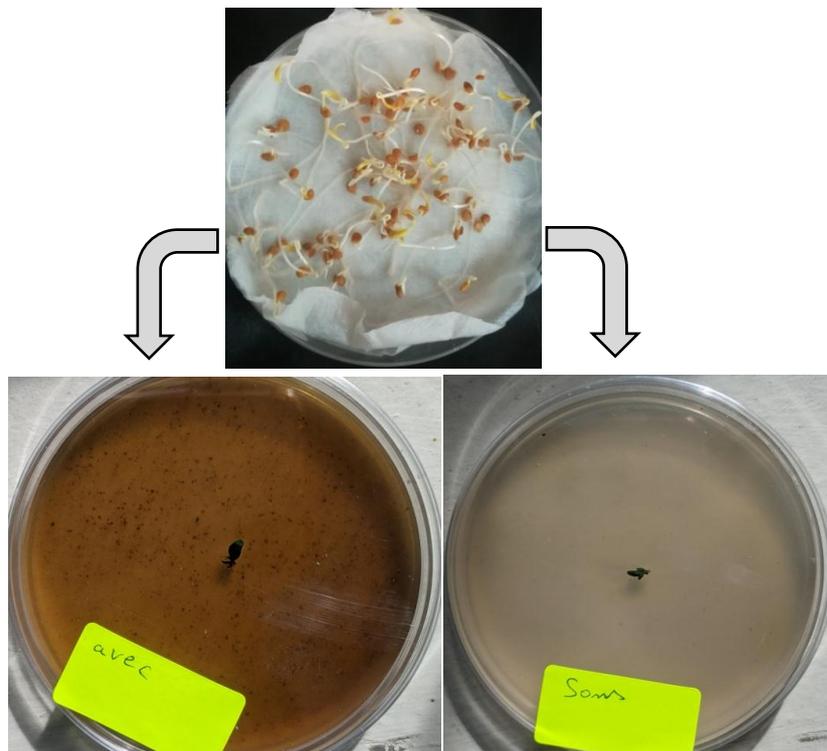
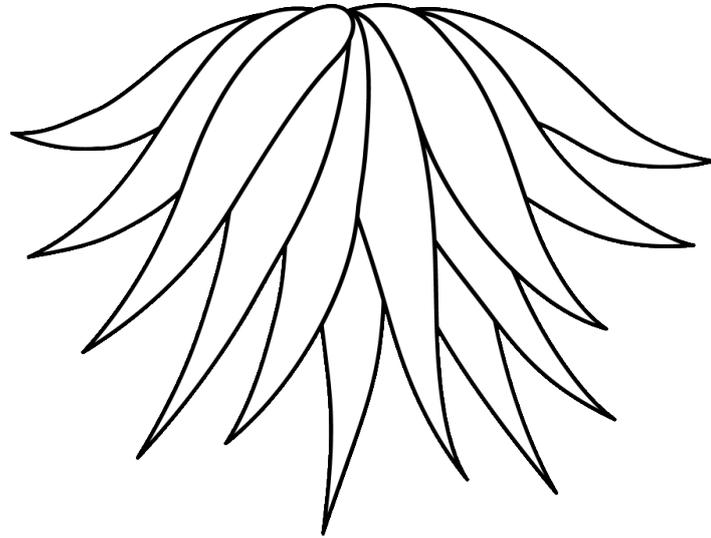
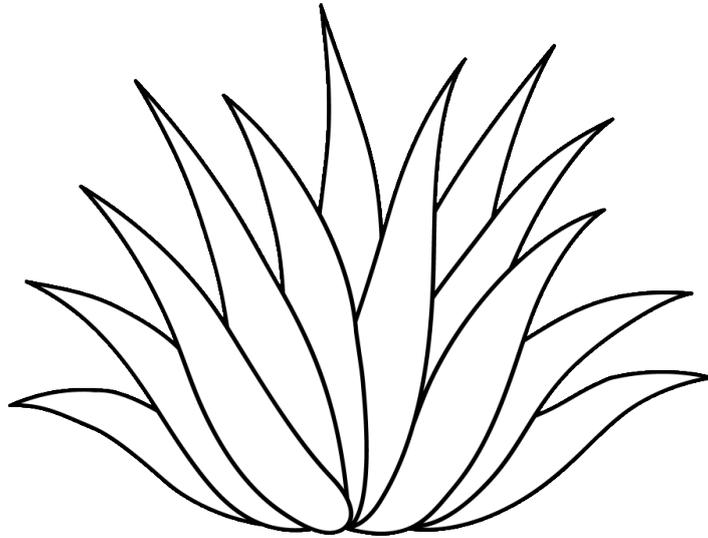


Figure 10 : Micro-bouturage in vitro d'explant de tomate sur les deux milieux.

L'incubation des explants a été réalisée dans l'étuve à l'obscurité à une température de 22 ± 1 °C pendant une 30 jours. L'évaluation de croissance des micro-bouture de tomate est basée sur des observations à l'œil nu et macroscopiques (loupe binoculaire) permettant d'apprécier l'organogenèse et différents niveaux de croissance.



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

1.1. Composition chimique

Dans cette partie de travail, nous visons la caractérisation des propriétés physico-organoleptiques. De ce fait, après préparation des deux milieux, ils ont subi une batterie de tests. Le tableau 5 montre les rapprochements et les différences dans les valeurs physico-chimiques et les caractéristiques organoleptiques entre les différents milieux.

Tableau 5 : Principales caractéristiques organoleptiques.

Milieu	<i>Aloe avec peau</i> (MCP)	<i>Aloe sans peau</i> (MCSP)
Caractéristiques physiques		
Densité	1,007	0,99
pH	6,00	5
CE	5,85	5,41
Lipide	1,60	1,47
Taux de protéine %	1,13	0,89
Sucre totaux %	4.38	1.75
Cendre %	2,3	1,95
Caractéristiques organoleptiques		
Couleur	Marron	Jaune claire
Odeur	Absence d'odeurs étrangère ou anormales	
Consistance de viscosité	Plus ou moins solide	Solide
Texture	Sensiblement homogène, pas de séparation en deux phase liquide et solide	

D'après les résultats consignés dans le tableau 5, nous pouvons souligner que les milieux obtenus des poudres des deux poudres MCP et MCSP, sont d'une couleur (marron) pour le premier et jaune clair pour le deuxième, la teinte marron foncé est généralement due à la présence du pigment de chlorophylle dans la peau de cladode.

Les deux milieux n'ont pas une odeur particulière, leur consistance varie suivant leur composition, le milieu MCSP à base de poudre de cladode sans peau forme un milieu plus ou moins solide (dû à leur richesse en polysaccharide), et ceux à base de poudre ont un aspect très visqueux à température ambiante. Les caractères organoleptiques restent très sensibles à l'oxydation que subissent les poudres en vieillissant, provoquant ainsi des changements de leur aspect et couleur.

L'analyse de la composition chimique montre que le pH est légèrement neutre pour les deux milieux avec des valeurs proches (MCP = 6 et MCSP = 5) ce qui est parfait pour la survie de large gamme de microorganismes.

La valeur de conductivité électrique CE est assez élevée (MCP = 5,85 et MCSP = 5,41), il faut savoir que le milieu qui contient des sels minéraux possède une CE, cependant, CE n'indique pas nécessairement la présence de sels ayant une valeur nutritive pour les organismes en culture.

Par ailleurs ce même tableau montre que le milieu MCP (poudre d'Aloe vera avec peau) est plus riche en différents constituants : lipide, protéine, sucre et cendre que le milieu MCSP (poudre d'Aloe vera sans peau)

1.2. 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 graphique suivant :

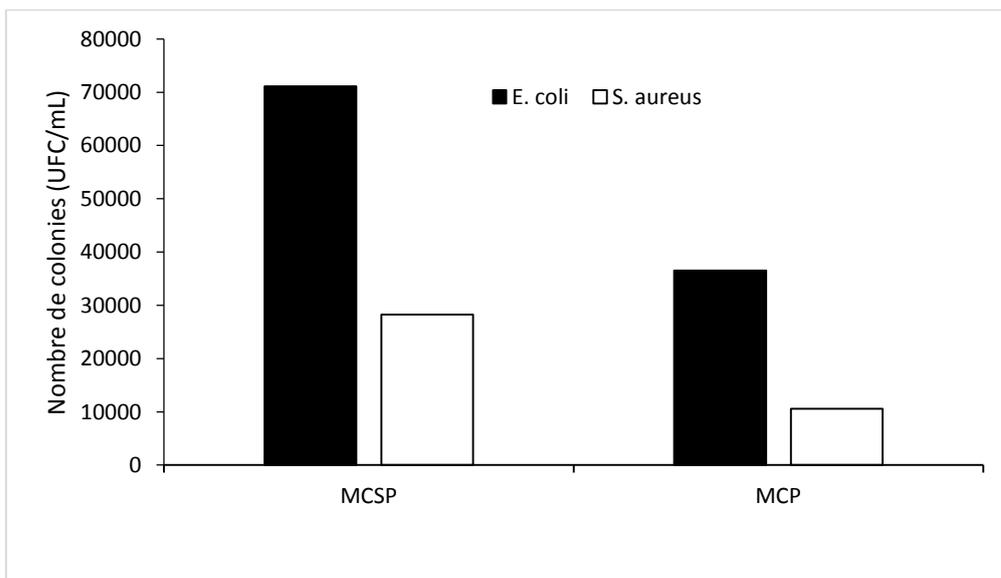


Figure 11 : Représentation graphique de la croissance bactérienne.

La figure 11 nous indique que la croissance bactérienne n'est pas similaire à chaque milieu de culture, la souche E-coli a donné une croissance importante (71111 UFC/ml) sur milieu MCSP par rapport au milieu de culture MCP, ce milieu à base de poudre de cladode sans peau (mucilage) a aussi permis une croissance modérée de la souche *Staphylococcus aureus* 28243UFC/ml.

Il a été observé que la souche *Staphylococcus aureus* n'a pas pu se développer dans ce milieu MCP alors que E-coli se développe d'une manière très faible.

Ces résultats montrent donc que les deux souches sont sensibles à la composition du milieu MCP, 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 MCP, cela signifie qu'elle contient des substances qui inhibe le développement des souches cultivées sur ce milieu puisque l'autre milieu sans peau a permis une croissance même modérée dans les pires des cas.

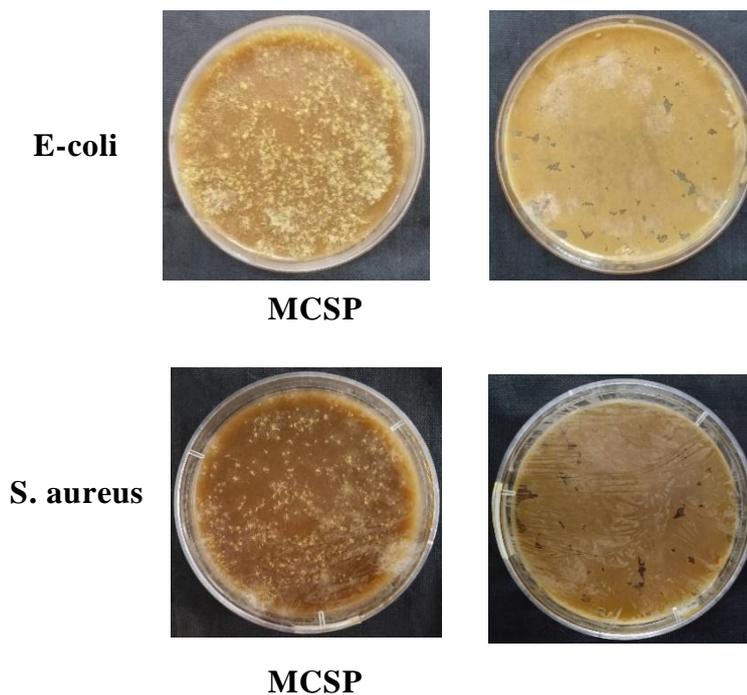


Figure 12 : Croissance bactérienne dans les deux milieux.

1.3. 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* sont représentés à la figure 13.

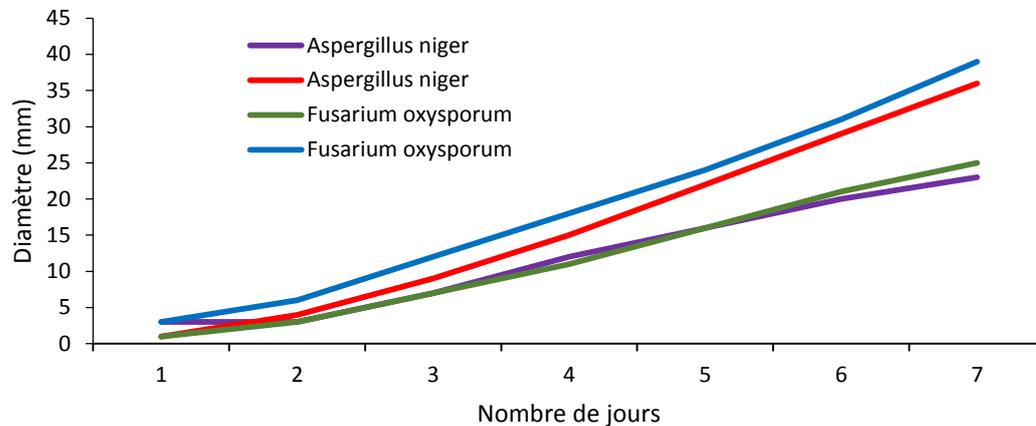


Figure 13 : Evolution de la croissance radiale des mycéliums durant les 7 jrs.

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 mycélienne dans chaque milieu. A l'issue de ces résultats il est clair qu'après premier jour de l'ensemencement, les diamètres croissance radiale ont varié en fonction du milieu de culture, et en fonction de la souche en culture.

L'évolution du diamètre fongique les plus élevés ont été observé dans le milieu MCSP et ce quel que soit la souche fongique avec des diamètres de 39 et 36 mm après 7 jours de culture respectivement pour *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*.

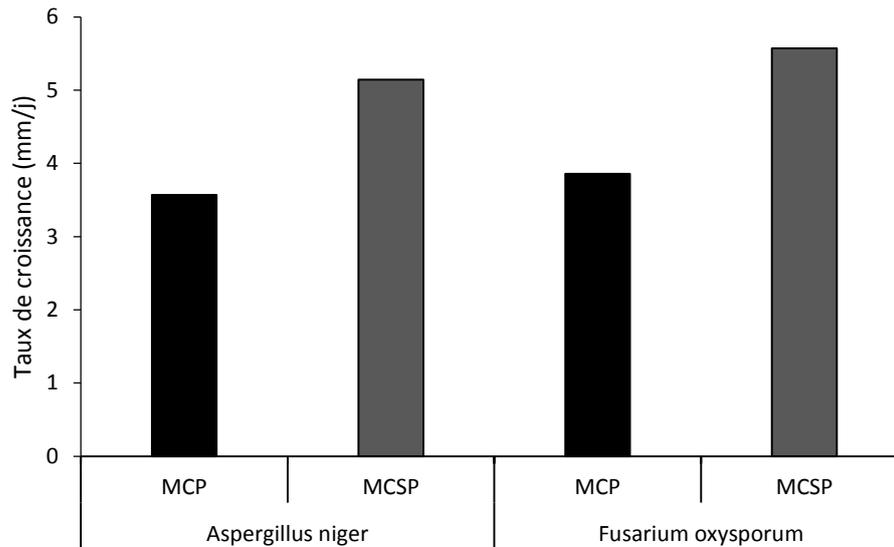


Figure 14 Représentation graphique de Taux de croissance fongique

Taux de croissance journalier montre que le milieu MCSP a enregistré les plus grande valeurs 5,14 et 5,57mm respectivement pour *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus niger*

On a constaté que l'inoculum *Aspergillus niger* a enregistré le plus court diamètre de mycélium sur les deux milieux.

Ces résultats indiquent aussi que le milieu MCP préparés 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 enregistré sur ce milieu

Il est a noté aussi que les meilleures croissances radiales ont été toujours enregistrée dans le milieu MCSP.



Figure 15 : Croissance fongique sur les deux milieux de culture.

1.4. L'effet des différents milieux sur microboutures de tomate

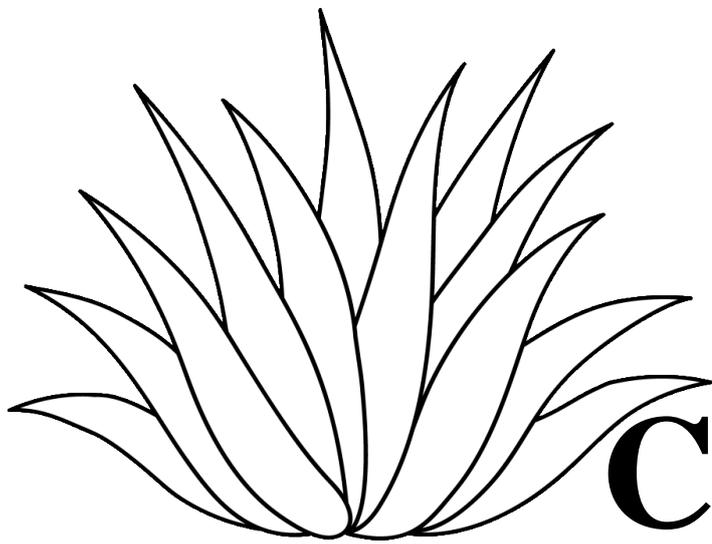
Après un mois de culture, on a constaté de petites cals blanchâtres apparaissent au niveau des sections des explants, mais la taille des micro-boutures de tomate est sensiblement resté la même pour tous les milieux testés, on a aussi constaté une faible induction racinaire quel que soit le milieu.

D'après (Taji, et al., 1992) l'enracinement c'est l'étape la plus importante dans la culture in vitro, car c'est l'étape qui assure la réussite de la reprise de croissance

Les travaux qui ont été effectués par (Taji, et al., 1992) ont souligné que les facteurs influant sur la régénération in-vitro peuvent être répartis en deux groupes :

- Les facteurs internes, liés à l'organisme animal ou végétal, en culture : concerne d'une part le génotype, la nature et l'âge ontogénique de l'explant et d'autre part l'état physiologique de l'organisme mère sur lequel, l'échantillon a été prélevé ;
- Les facteurs externes qui englobent, les milieux de cultures (notamment leur composition en régulateurs de croissance et les sucres) et les conditions de la mise en culture.

Or dans notre expérimentation, l'absence d'induction racinaire est probablement dû à l'absence de phytohormone dans le milieu.



C*onclusion*

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.

L'Aloe vera est une des plantes médicinales les plus utilisée actuellement, en raison de ses propriétés thérapeutiques, nutritionnelles et cosmétiques, elle contient un certain nombre de substances bioactives très intéressante dans divers domaines.

L'objectif essentiel visé par cette étude consiste à l'élaboration d'un milieu de culture à base de la poudre l'Aloe vera ; deux milieux de culture ont été préparés, puis une analyse de leur composition organo-chimique a été faite, enfin l'efficacité de ces milieux a été évalué.

À travers les résultats obtenus, concernant les paramètres physico-chimiques de poudre d'Aloe vera, montrent qu'elle est plus riche en éléments nutritif indispensable aux organismes en culture notamment, sucres, et protéine et éléments minéraux

Les principaux résultats des tests *in vitro*, 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 MCSP (à base de poudre sans peau) est plus productif et affiche le meilleur rendement en termes de croissance des deux microorganismes, par rapport aux milieu MCP.

Cette différence en termes de rendement en croissance microbienne, dans les deux milieux de cultures est due notamment la différence dans leur composition chimique.

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

Comme complément à la présente étude et comme perspectives, nous suggérons que d'autres études de sur ce nouveau milieu puissent continuer avec/sur d'autre organismes.

Références bibliographiques

BOUSSENA SABRINA Manuel des travaux pratiques de bactériologie [Livre]. - 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 [Livre]. - 2004. - HAL Id: tel-00006273 <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00006273>.

Khadir Abdelmounaim eleam.univ-oran1.dz [En ligne] // <https://eleam.univ-oran1.dz>. - 20 JUIN 2021.

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

Acharya Tankeshwa [En ligne] // fr.sawakinome.com. - 21 6 2017. - <https://fr.sawakinome.com/articles/microbiology/difference-between-solid-and-liquid-media.html>.

Actu-Environnement [En ligne] // actu-environnement.com. - Reproduction interdite sauf accord de l'Éditeur, 28 01 2022. - https://www.actu-environnement.com/ae/dictionnaire_environnement/definition/ph.php4.

anonyme [En ligne] // legarrec.com. - © Copyright 2022 - Le Garrec SAS. - 13 04 2022. - <https://www.legarrec.com/entreprise/pourquoi-et-comment-mesurer-la-viscosite-dun-fluide/>.

anonyme **micro** [En ligne] // [biologie marine.com](http://biologie-marine.com). - 4 4 2022. - <http://www.biologiemarine.com/micro/milcult.htm>.

aquaportai [En ligne] // aquaportai.com. - 26 09 2009. - <https://www.aquaportail.com/definition-5583-matiere-seche.html>.

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

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

Bensakhria Ayoub **biologie** [En ligne] // [magazine science.com](http://magazine-science.com). - 3 4 2018. - <https://www.magazinescience.com/biologie/milieux-de-culture-techniques-densemencement/>.

Bensakhria Ayoub 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. [Livre]. - 2002. - *Animal Feed Sciences and Technology*, : p. 15-30.

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

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

Chevalier Pierre *Aspergillus niger* [En ligne] // www.inspq.qc.ca. - 4 2019. - 12 4 2022. - <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger>.

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

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

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

Dubois Monique [En ligne] // [slideplayer](http://slideplayer.fr/slide/11837309/). - 2019. - <https://slideplayer.fr/slide/11837309/>.

ESB Fiche Technique Santé [En ligne] // www.canada.ca. - 12 2011. - 15 4 2022. - <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agents-pathogenes-evaluation-risques/staphylococcus-aureus.html>.

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

futura-sciences sante [En ligne] // [futura-sciences](http://futura-sciences.com). - 4 4 2022. - <https://www.futura-sciences.com/sante/definitions/medecine-colibacille-5138/>.

Giret Jessica Bien choisir ses aliments [En ligne] // marmiton.org. - 04 06 2021. - <https://www.marmiton.org/bien-choisir-ses-aliments/jus-d-aloe-vera-ses-bienfaits-et-comment-le-consommer-s4025093.html>.

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

Kaboka A. Kitambala, E. Biey Makaly, and Z. Kasuku Wanduma ESSAI DE TRAITEMENT DES EAUX USEES HOSPITALIERES DES CLINIQUES UNIVERSITAIRES DE KINSHASA PAR LE PROCEDE DE STABILISATION COUPLE A LA BIOFILTRATION/TEST PROCESSING WASTEWATER HOSPITAL UNIVERSITY CLINICS OF KINSHASA BY THE PROCESS OF STABILIZATION COUPLED [Revue]. - [s.l.] : International Journal of Innovation and Applied Studies, 2017. - 65 : Vol. 19.1.

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

Marie-Alix d'Halewyn M. Sc. microbiologie-immunologie et Pierre Chevalier, Ph. D. microbiologie [En ligne] // INSPQ. - 4 2019. - <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches/aspergillus-niger>.

Martyna Zagórska-Dziok Dominika Furman-Toczek, Monika Dudra-Jastrzębska, Karol Zygo, Andrzej Stanisławek, Lucyna Kapka-Skrzypczak Evaluation of clinical effectiveness of Aloe vera – [Revue]. - Lublin, Poland : Journal of Pre-Clinical and Clinical Research, 2017. - 1, 86-93 : Vol. Vol 11.

Michayewicz Natacha L'Aloe vera, plante médicinale traditionnellement et largement utilisée depuis des millénaires, aux nombreuses propriétés thérapeutiques. Plante miracle?. - Université de Lorraine : [s.n.], 2013.

Michel M Encyclopédie of medicinal plants [Livre]. - 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. [Livre]. - 2016. - Thèse doctorat Maroc.

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

Natacha Michayewicz L'Aloe vera, plante médicinale traditionnellement et largement utilisée depuis des millénaires, aux nombreuses propriétés thérapeutiques.. - [s.l.] : Sciences pharmaceutiques, 2013. - p. 152.

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 [Livre]. - 2012. - Université de badji mokhtar. Annaba.

Ni Y., Turner, D., Yates, K.M., Tizard, I Analytical methodology: the gel-analysis of aloe pulp and its derivatives [Livre]. - [s.l.] : CRC Press, 2004.

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

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

Perrot Em et Paris R R Les plantes médicinales, par Emile Perrot et René Paris. [Revue]. - Paris-France : French : [Nouv. ed. refondue et augm, 1971.

Priyanka Sharma Amit C Kharkwal, Harsha Kharkwal, M Z Abdin2, Ajit Varma1 A Review on Pharmacological Properties of Aloe vera [Revue]. - Noida, Uttar Pradesh, India. : Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res, 2014. - Vol. 07.

Rafael Minjares-Fuentes Antoni Femenia Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements [Section du livre]. - [s.l.] : Academic Press, 2019.

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

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

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

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

Schmelzer G.H. and Gurib-Fakim, A., Eds Plant Resource of Tropical Africa 11 (1) Medicinal Plants 1 [Revue]. - Wageningen, Netherlands : Backhuys Publishers, 2008.

Sherb Nelson & [En ligne] // Catalogue of Life. - 16 décembre 2020. - <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/6JT68>.

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.

Taji Acram (author), Dodd William A (author) et Williams Richard R Plant Tissue Culture Practice [Section du livre]. - Armidale, Australia : University of New England, 1992.

Walali LOUDYI Quelques espèces fruitières d'intérêt secondaire cultivées au Maroc [Livre]. - 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. - 2 MAI 2021.

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