

N°Réf :.....

Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila

Institut des Sciences et de la Technologie

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire préparé En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Thème :

Etude de l'activité antibactérienne d'une collection des moisissures thermophiles

❖ Présenté par :

Le : 28/09/2021

➤ METROUB Amel

➤ BENCHIHEUB Rihab

❖ Devant le jury composé de :

- **Président** : Mr.KALLEB Rabeh MAA/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila
- **Examineur** : Mme. AMARI Salima MAA/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila
- **Promoteur** : Mme. BENSERRADJ Ouafa MCB/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila

Remerciements



Tous d'abord nous tenons à remercier le bon Dieu tout puissant et miséricordieux de nous avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.



*Nous tenons avant tout à exprimer nos remerciements les plus sincères à **M^{me} Benserradj Ouafa** pour la confiance qu'il a placée en nous, pour effectuer ce travail. Sa disponibilité, ses précieux conseils, son aide, ses suggestions sur la rédaction de ce mémoire ainsi que la confiance qu'il nous a témoigné tout au long de cette étude.*



*Nos remerciements vont aux membres du jury **M^{me} Amari salima** et **M^r KALLEB Rabeh** qui nous ont fait l'honneur d'accepter de jurer notre travail.*



Nous adressons aussi nos reconnaissances à tous les professeurs qui depuis quelques années par leur conseils et connaissances nous ont bien servis.



Enfin nous exprimons nos plus profonds remerciements à toutes les personnes qui nous ont apporté leur soutien et qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

« « Merci » »

Dédicace



En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers:



A mes très chers parents Boudjemaa et Zahiya.

Pour leurs soutiens constants, leurs amours et leurs mots d'encouragement qui m'ont permis de me rendre ici aujourd'hui En ce jour votre fille espérée réaliser l'un de vos plus grands rêves et couronner vos années de sacrifice et d'espoir.

Que ce travail puisse être le résultat de vos efforts et de vos sacrifices. Que Dieu tout vos puissants garde et vos procures santé, bonheur et longue vie.



A mes chers frères : Sif eddine, Salah eddine, Ahmed et mes belles sœurs Assya et Dounia et Loubna puisse Dieu vous donne santé, bonheur et réussite, et bien sur ma nièce, la petite princesse Tayma.



Et aux maris de mes sœurs, Tawfik et Ilyes



A mon chère et belle binôme : Rihab



A toute mes chères ami(e)s: Mohammed, Yousra, Amina, Manal, Racha, abla, Chirine, Djihane, Rayane, Imane, dounia.

Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.



A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.



A toute ma famille.



Amel

Je remercie, tout d'abord, Dieu tout puissant, pour avoir guidé mes pas vers un avenir inchaallah prometteur, ou le travail, la persévérance et la quête du savoir seront ma devise.



Je dédie ce modeste travail



*A ma très cher mère Fouzia ,honorable, aimable: tu représentes pour moi
Le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du
dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*



*Amon très cher père Abdelhakim, Aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, l'estime, le dévouement et de le respect que j'ai toujours eu pour toi,
rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et
mon bien être.*



*A mes chers frères : Haythem, Thamer .Je te dédie ce travail avec tous mes
vœux de bonheur, de santé et de réussite.*



A ma belle binôme : Amel



*A mes chers Ami (e)set particulièrement à : Mohamed, Mayssoune , Selma,
Rayene, je suis très heureuse de ces années passées avec vous des liens créés et
de nouvelles amitiés, ainsi que pour tous les moments passés ensemble et
ceux encore à venir.*

Merci de votre présence, soutien et de m'avoir encouragée à aller plus loin.



A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.



A toute ma famille.



Rihab

Table des matières

Introduction.....	1
-------------------	---

Partie 1 : Synthèse bibliographique

Chapitre I: Le sol

1. Généralités	5
2. Définition du sol	5
3. Les propriétés du sol.....	6
4. La biologie du sol	7
a. Les microorganismes du sol.....	7
b. Fonctionnement microbiologique du sol	11

Chapitre II: Les moisissures

1. Définition des moisissures	13
2. Écologie des moisissures.....	13
3. Mode de reproduction	14
3.1. La reproduction sexuée.....	14
3.2. Reproduction asexuée (végétative)	15
4. Conditions de croissance des moisissures.....	16
4.1. Facteurs nutritifs	16
4.2. Facteurs physiquo-chimique.....	17
4.3. Facteurs biologiques	19
5. Cycle de vie des moisissures.....	20
6. Mode de vie.....	21
7. Classification des moisissures	21

8. Les champignons thermophiles	22
9. Les Métabolites secondaires fongiques	23
9.1. Les mycotoxines	24
9.2. Les antibiotiques	26

Partie 2 : Etude expérimentale

Chapitre III: Matériel et méthodes

1. Isolement des champignons du sol	30
1.1. Le site d'étude	30
1.2. Échantillonnage	32
1.3. Milieu d'isolement	33
1.4. Préparation des dilutions	33
1.5. Préparation du milieu de culture	34
1.6. Méthode d'isolement	34
1.7. Ensemencement et incubation	35
2. Repiquage et Purification des isolats obtenus	35
2.1. Conservation	36
3. Méthodes d'identification des souches	36
3.1. Identification macroscopique	37
3.2. Identification microscopique	38
4. Activités antimicrobiennes	40
4.1. Préparation des Bactéries test	41
4.2. Préparation des suspensions bactériennes	42
4.3. Ensemencement	42
4.4. Technique des cylindres d'agar	43
4.5. Techniques des disques et des puits	43
4.5.1. Technique des disques	46

4.5.2. Technique des puits	47
----------------------------------	----

Chapitre IV: Résultats et discussions

1. Isolement des moisissures du sol	50
2. Identification des isolats	50
2.1. Identification macroscopique	50
2.2. Identification microscopique	55
3. Etude de l'activité antibactérienne	60
3.1. La technique des cylindres d'agar	61
3.2. La technique des disques	66
3.3. La technique des puits	71
Conclusion et perspectives	79
Références bibliographiques	81
Annexes	
Abstract	
الملخص	
Résumé	

Liste des Abréviations

ATB : Antibiotiques

Aw : Activité en eau

B. subtilis: Bacillus subtilis

BN: Bouillon nutritif

Ca⁺: Calcium

CEC : La capacité d'échange cationique

CMI : Concentrations minimales inhibitrices

E.coli: Escherichia coli

FAO: Food and Agriculture Organisation

FMS : Fermentation en Milieu Solide

EW : Est-ouest

HCO⁻³: Bicarbonate

MH: Mueller-Hinton

MO : Matière organique

MSFB : Métabolites secondaires fongiques bruts

NNE : Nord-nord-est

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

PDA: Potato dextrose agar

PDB: Potatoes dextrose broth

PH : Potentiel hydrogène

S. aureus: Staphylococcus aureus

Sp : Espèce

SSW : Sud-sud-ouest

Liste des figures

Figure N°	Titre	Pages
01	Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.	15
02	Différents modes de sporulation et les différents types de spores associées.	16
03	Cycle de vie des moisissures.	21
04	Classification des champignons.	22
05	Situation géographique de Hammam Abdallah (Bouhama).	30
06	Carte géologique de la région de Bouhama.	31
07	Présentation des régions d'étude.	32
08	Echantillon de sol prélevé.	33
09	Préparation des dilutions.	34
10	Méthode d'Ensemencement.	35
11	Purification des isolats fongiques obtenus.	36
12	Méthode d'identification microscopique des moisissures.	39
13	Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch.	40
14	Coulage du milieu Mueller-Hinton en boîtes de Pétri.	41
15	Méthode d'ensemencement des bactéries testspar stries sur Mueller-Hinton.	42
16	Technique des cylindres d'agar.	43
17	Fermentation des champignons.	44
18	Filtration de surnageant.	45
19	L'extraction de mycotoxine par dichlorométhane et le chloroforme.	Error! Bookmark not defined.
20	Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts MSFB.	46

21	Technique des disques.	47
22	Technique des puits.	48
23	Genres fongiques isolés du sol de Hammam Abdallah (Bouhama).	59
24	Résultats attendus après réalisation des tests par la méthode des disques.	60
25	Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la technique des cylindres d'agar <i>Escherichia coli</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> .	62
26	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche <i>Aspergillus niger</i> par la technique de cylindre agar.	63
27	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichodarma sp₂</i> par la technique de cylindre agar.	64
28	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Alternaria sp</i> par la technique de cylindre agar.	64
29	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichoderma sp₃</i> par la technique de cylindre agar.	65
30	Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la technique des Disques <i>Escherichia coli</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> .	67
31	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Aspergillus niger</i> par la technique des disques.	68
32	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichodarma sp₂</i> par la technique des disques.	69
33	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Alternaria</i> par la technique des disques.	69
34	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichodarma sp₃</i> par la technique des disques.	70
35	Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la	72

	techniques des puits <i>Escherichia coli</i> ; <i>Bacillus cereus</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Staphylococcus aureus</i> .	
36	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Aspergillus niger</i> par la technique des puits.	73
37	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichodarma sp₂</i> par la technique des puits.	74
38	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche par la technique des puits.	74
39	Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre <i>Trichodarma sp₃</i> par la technique des puits.	75

Liste des tableaux

Tableaux N°	Titres	Pages
01	Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines.	25
02	Moisissures productrices d'antibiotiques.	27
03	Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.	41
04	Aspects macroscopiques des isolats fongiques obtenus.	51
05	Aspects microscopiques des isolats fongiques obtenus.	55
06	Résultats de L'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des cylindres d'agar.	61
07	Aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.	65
08	Résultats de l'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des Disques.	66
09	aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.	70
10	Résultats de l'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique despuits.	71
11	Aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.	75

Introduction



Depuis que l'utilisation répandue de la chimiothérapie antimicrobienne a commencé dans les années 1950, il est apparu, grâce à la surveillance des résistances, que presque tous les microorganismes pathogènes avaient développé une résistance à des agents chimiothérapeutiques. Devant cette situation alarmante, l'utilisation appropriée des antibiotiques restent absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules.

Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules (**Saisivam et al., 2008**).

Les scientifiques sont continuellement à la recherche de nouveaux microbes produisant des antibiotiques parce que les souches pathogènes résistantes aux médicaments émergent plus rapidement que le taux de découverte de nouveaux médicaments et d'antibiotiques (**Kumar et al., 2010**). Par conséquent, un certain nombre d'antibiotiques capables de lutter contre les bactéries pathogènes ont été découverts. Il existe de nombreuses sources où les antibiotiques peuvent être découverts, cependant, le sol est la source la plus importante pour la découverte de nouveaux antibiotiques. Selon **Dulmage et Rivas (1978)**, les micro-organismes du sol ont été continuellement criblés pour leurs métabolites actifs biologiques utiles, tels que les antibiotiques depuis longtemps.

Parmi ces microorganismes, les champignons représentent un groupe d'organismes majeurs à la fois dans le fonctionnement des écosystèmes mais également dans des applications biotechnologiques qu'ils peuvent potentiellement diriger (**Schmit et Mueller, 2007 ; Bérdy, 2005**) On peut par exemple citer la découverte en 1928 de la pénicilline produite par une souche fongique *Penicillium notatum*, qui ouvrira la voie à la biosynthèse d'antibiotiques utilisés dans la pharmacopée depuis 1940 (**Carson et Hartwell, 1985 ; Gertz et al., 2009**).

Dans les milieux chauds serait fort probable d'au temps plus, qu'il a été prouvé que les moisissures isolées à partir des sources thermales, peuvent synthétiser plus de métabolites secondaires caractérisés par une stabilité biologique et chimique (**Benghrieb et Gerboua, 2018**).

Dans ce contexte, l'objectif principal du présent travail consiste à l'étude de l'activité antimicrobienne d'isolats fongiques sélectionnés à partir d'une source thermale Hammam Abdallah (Bouhama-Mila).

Pour ce faire, ce travail comporte les parties suivantes :

- La première partie est consacrée à une revue bibliographique qui rassemble des données générales, partagée en deux chapitres ayant trait aux généralités sur le sol ; les moisissures et l'activité antibactérienne de la flore fongique.

- La deuxième partie illustre une description des protocoles expérimentaux utilisés, d'une part, lors des prélèvement, isolement, purification, identification des souches fongiques (macroscopique et microscopique) et d'autre part, lors de la mise en évidence, in vitro, de l'activité antibactérienne et ceci par l'utilisation de différentes techniques ; la technique des cylindres d'agar, la technique des disques et la technique des puits.
- Ainsi qu'une troisième partie démontrant les résultats obtenus en ce qui concerne les différentes expériences effectuées et leur interprétation.
- Enfin, terminer ce travail par une conclusion générale qui résume l'ensemble des résultats obtenus et ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Partie 1 :

Synthèse bibliographique



CHAPITRE I:

Le sol



1. Généralités

Le sol est un environnement où cohabitent les racines des végétaux, les animaux et les microorganismes, c'est un assemblage complexe de substances minérales et organiques, gaz et d'eau, à l'intérieur du quel se déroulent des phénomènes de catabolisme et de anabolisme. A cause de son hétérogénéité, il abrite des populations de microorganismes à des particularités biologiques et biochimiques très diverses. L'activité de ces populations est influencée par divers facteurs : température, potentiel Hydrogène, profondeur du sol, humidité et présence des substances organiques et inorganiques. Les microorganismes présents dans le sol sont impliqués dans le recyclage de nombreux éléments chimiques (carbone, azote, et d'autres), surtout ceux impliqués dans la formation et la dégradation de l'humus et ceux ayant un rôle important dans la solubilisation des composants organiques et inorganiques inaccessibles aux plantes (**Kebir ,2012**).

2. Définition du sol

Plusieurs définitions ont été adoptées par des scientifiques parmi lesquelles on a :

- Le sol est un des compartiments essentiels de l'écosystème agissant comme régulateur et révélateur de nombreuse réaction écologique par ses caractères physiques, chimiques et biologiques à court et à long terme: «soil should be the best over all réflexion of ecosystem process » (**Davet, 1996**).
- Selon (**Pedro, 1996**), le sol est un véritable laboratoire biologique où se déroulent des réactions qu'on ne trouve nulle part ailleurs.
- (**Gobat ,1998**), définit le sol comme la couche la plus externe, marquée par les être vivants de la croute terrestre. Il est le siège d'un échange intense de matière et d'énergie entre l'air, l'eau et les roches. Le sol, en tant que partie de l'écosystème, occupe une position clé dans les cycles globaux des matières.
- Il figure parmi les habitats les plus diversifiés et renferme certains des assemblages les plus variés d'organismes vivants. Il constitue l'un des écosystèmes les plus complexes de la nature. Aucun autre habitat n'abrite une densité d'espèces aussi élevée que le sol (**FAO, 2001**).
- D'après (**Calvet ,2003**), le sol est considéré comme la partie superficielle des roches altéré par les agents climatiques, biologiques et anthropiques.

- Le sol ne constitue pas un environnement homogène, mais une mosaïque d'habitats avec pour chacun des populations microbiennes propres, le nombre et le type d'organismes varient d'un système et d'un milieu à l'autre. Le nombre, la composition et la diversité des espèces dans un sol donné dépendent de nombreux facteurs, notamment l'aération, la température, l'acidité, l'humidité, la teneur en éléments nutritifs et en substrat organique. La rhizosphère représente un compartiment d'intérêt majeur **(Marilley et al., 2007)**.
- C'est un environnement complexe par sa structure physique, sa composition chimique et sa diversité en organismes vivants (notamment en microorganismes) **(Cherif et al., 2009)**.
- Le sol est formé de plusieurs couches (horizons), l'ensemble de ces horizons que l'on distingue sur une coupe se nomme "SOLUM" **(Kebir, 2012)**.
- Le sol est l'une des propriétés les plus précieuses de l'Homme. Il permet la vie des plantes, des animaux et des humains sur Terre **(Osman, 2013)**.
- Le sol est un écosystème complexe, un filtre et un bioréacteur indispensable à la vie sur terre **(Locatelli, 2015)**.

3. Les propriétés du sol

Les paramètres physico-chimiques d'un sol, sont considérés comme des indicateurs de la qualité physique et chimique des sols **(Tessier, 1999 ; Debeyser, 2003 ; Rahoui et al. 2001)**.

- **Le pH**

Le pH, abréviation de « potentiel Hydrogène », est un coefficient qui caractérise l'acidité ou la basicité d'un sol. Il définit la concentration d'ions H^+ dans la phase liquide du sol. Par ses interactions avec de nombreux processus chimiques et biologiques, le pH conditionne et reflète la disponibilité des éléments dans le sol. Il constitue donc un indicateur utile, en combinaison avec d'autres, pour appréhender la fertilité chimique des sols **(Boruta et al. 2016)**.

- **La capacité d'échange cationique (CEC)**

C'est la quantité de cations que celui-ci peut retenir sur son complexe adsorbant à un pH donné. La CEC est utilisée comme mesure de la fertilité d'un sol en indiquant sa capacité de rétention des éléments nutritifs. Les sols ayant une CEC élevée peuvent retenir davantage de cations et possèdent une plus grande capacité à les échanger que les sols ayant une faible CEC **(Kučerík et al. 2018)**.

Les cations les plus souvent mentionnés dans les rapports d'analyses de sol sont les suivants : le potassium (K^+), le magnésium (Mg^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}).

Certains rapports indiquent aussi l'hydrogène (H^+) et le sodium (Na^+) car ceux-ci sont les plus intéressants d'un point de vue nutritif pour la plante... Plus le sol n'est riche en argile et matière organique, plus sa CEC est importante (**Zupančiča et al, 2018**).

- **Matière organique (MO)**

La matière organique est le principal indicateur de la qualité des sols, que ce soit pour les fonctions agricoles ou environnementales parmi les quelles la séquestration du carbone et la qualité de l'air (**Calvet, 2003**). Comme c'est le principal déterminant de l'activité biologique, la quantité, la diversité et l'activité de la faune et des microorganismes sont en relation directe avec sa présence (**Davet, 1996 ; FAO, 2002**).

La matière organique et l'activité biologique qui en découle ont une influence majeure sur les propriétés physiques et chimiques des sols (**Robert, 1996**). Le carbone des sols affecte aussi la dynamique et la biodisponibilité des principaux éléments nutritifs (**FAO, 2002 ; Calvet, 2003**).

4. La biologie du sol

Le sol est un environnement complexe et hétérogène que ce soit par sa structure, ses paramètres physico-chimiques (**Jayanthi et al., 2016**). Constitué d'un réservoir exceptionnel de microorganismes (**Davet, 1996**) ;(faune et flore) tels que : les bactéries, les champignons, les algues, ainsi qu'une faune très variée allant des protozoaires aux mammifères.

Tous ces organismes font partie intégrante du système sol et participent par leurs activités à la formation et à l'évolution des sols (**Jayanthi et al, 2016**).

a. Les microorganismes du sol

Trop souvent considéré comme un environnement minéral, le sol est aussi un lieu de vie. Il héberge une très forte diversité d'organismes vivants, notamment les microorganismes (**Imtiaz et al., 2016**).

Les organismes vivants du sol sont des bactéries, des champignons, des algues, les parties souterraines des plantes ainsi que des animaux très variés, des protozoaires aux mammifères. Il est intéressant de noter que plus de 90% de la biomasse des sols sont constitués par les organes souterrains végétaux (50%), les racines principalement, et la microflore (41,7%) (**Calvet, 2003**). Leur biodiversité est considérable ainsi que leur distribution qui est en fonction non seulement de

la présence de substrats énergétiques (essentiellement des résidus végétaux) et d'éléments minéraux, mais aussi de nombreux facteurs physiques et chimiques caractérisant chaque sol, notamment la structure, l'aération, le pH, la température et la teneur en eau (**Ghoreishi et al., 2017**).

Les microorganismes du sol assurent des fonctions clés dans la circulation du flux d'énergie et de la matière dans l'environnement comme : la biodégradation de la matière organique, la production de nutriments pour les plantes, la fixation de l'azote, la biodégradation des polluants, etc... (**Hien et al., 2010**).

En outre, il a été démontré que la structure du sol est non seulement influencée par les constituants minéraux du sol mais aussi par la présence de micro-organismes qui favorisent la formation d'agrégats et de pores (**Chesnokova et al., 2016**).

➤ **Bactéries**

Ce sont les microorganismes les plus abondants et les plus actifs (**Bousseboua, 2005**). (Environ 500 kg par hectare) (**Bertrand et De Halleux, 2005**), puisque leur densité peut s'élever de l'ordre de 10 000 à 100 000 espèces bactériennes par gramme de sol (**Akbar et Sultan, 2016**). Les bactéries forment une population très diversifiée avec une estimation de 30000 espèces dans le sol (**Hawksworth et Mound, 1991**).

Ce sont des procaryotes unicellulaires de formes très diverses. Leur taille peut varier entre 0,3 et 3 µm. Leur classification était habituellement basée sur des caractères phénotypiques incluant par exemple la morphologie des cellules (bâtonnets, cocci, bacilles...), la structure de la paroi cellulaire (Gram positif, Gram négatif), la présence d'endospores, la mobilité des cellules et la position des flagelles (**Lavelle et Spain, 2001**), et aussi sur des groupes nutritionnels (hétérotrophes et autotrophes).

Les bactéries du sol sont à dominante Gram positif, avec comme groupes principaux : les Coryné bactéries, les Actinomycètes, les Mycobactéries et les Nocardiformes. Les genres les plus communément isolés sont. *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* et *Bacillus*, dans les couches aérobies alors que les bactéries du genre *Clostridium* sont dominantes dans les conditions anaérobies (**Bousseboua, 2005**).

Les bactéries du sol ont plusieurs rôles environnementaux majeurs :

- La fixation du carbone et de l'azote atmosphérique et l'accumulation de nutriments dans les sols.

- La décomposition de la matière organique, formant l'humus et libérant des nutriments disponibles pour les plantes.
- La formation des associations symbiotiques avec les plantes comme les *Rhizobiums* qui forment des nodules fixateurs d'azote au niveau des racines des légumineuses favorisant ainsi la croissance des plantes dans les sols pauvres en azote (**Ritchie et Raina , 2016**).

➤ **Actinobactéries**

Ce sont des microorganismes filamenteux hétérotrophes présentant des similitudes avec les Champignons et les Eubactéries. De ces premiers, ils ont l'aspect filamenteux et la capacité de sécréter d'antibiotiques (**Stolp, 1988**) ; des secondes, ils ont la possibilité d'effectuer de très nombreuses réactions biochimiques. Leur nombre est d'un à cent millions par gramme de terre, et leur poids total est d'environ une tonne par hectare.

Les actinobactéries sont des décomposeurs primaires des matières végétales résistantes comme l'écorce, les feuilles et les tiges. Ils sont particulièrement efficaces dans la dégradation de la cellulose, de la chitine, et de la lignine. Les espèces du genre *Frankia* forment des symbioses fixatrices d'azote en Associations avec les casuarinacées et d'autres plantes supérieures (**Lavelle et Spain, 2001 ; Stolp, 1988**).

➤ **Champignons**

Tous les sols contiennent une mycoflores abondante. La biomasse fongique est sans doute , très variable suivant les cas mais on peut l'évaluer entre 120 Kg/ha et plus d'une tonne, dans les sols normaux (**Dommergues et Manganot, 1970**).

Les champignons environ 1500 kg par hectare (**Bertrand et De Halleux, 2005**), Ils jouent des rôles très importants dans les cycles des nutriments du sol (**Thorn, 1997, Bloem et al., 1994**) notamment dans la décomposition de la matière organique. Ils interviennent dans un grand nombre D'interactions mutualistes (mycorhizes, champignon termites) ; et ont une part importante dans plusieurs relations commensales et compétitives avec les autres organismes du sol. Les champignons jouent un rôle dans le recyclage des déchets, des sécrétions chimiques et excréments des racines des plantes, des animaux et des microorganismes (**De Ruiter et al., 1993**).

➤ **Les levures**

Les levures sont peut nombreuses dans le sol et l'on doit recourir, pour les mettre en évidence. Il faut donc admettre que le sol renferme une population propre composée de levures variables suivant son type et ses caractéristiques, variable aussi suivant la végétation qu'il porte.

Cependant les lois de leur Répartition ou de leurs éventuelles fluctuations saisonnières sont encore imparfaitement connues.

Les Levures sont nombreuses dans les sols riches en matière organique fraîche ou peu Décomposée et peut-être plus encore dans les litières forestières (**Dommergues et Mangenot, 1970**).

➤ **Protozoaires**

Les protozoaires sont des microorganismes unicellulaire Eucaryotes, ils font partie m a 3mm. On les trouve dans les eaux de la microfaune, mesurent 3 interstitielles du sol et les eaux pelliculaires à la surface des agrégats. Ils sont abondants dans les dix premiers centimètres du sol (**Bachelier, 1978 ; Davet, 1996**).

Ce sont des bactériophages, saprophages, prédateurs d'autres protozoaires, ils sont très important pour les équilibres biologiques au niveau des microorganismes, principaux prédateurs de bactéries (**Raphael, 2007**).

➤ **Algues**

Elles sont définies comme étant des organismes photosynthétiques simples, typiquement autotrophes, pluri ou unicellulaires et sont considérées comme source de vie dans l'océan puisqu'elles y produisent l'oxygène. Elles sont considérées parmi les organismes végétaux les plus anciens sur ce monde (**Cabioc'H, 1992**).

Elles peuvent se développer dans l'eau ou dans des milieux très humides. En effet, elles habitent tous les écosystèmes aquatiques, tels que des océans, des lacs, des rivières et même des glaciers, ainsi que des systèmes terrestres y compris les roches et autres surfaces dures. (**Floc'h, 2010**).

Une cellule algale est composée par une paroi partiellement cellulosique, un petit noyau et des plastes pigmentés qui confèrent au thalle de l'algue sa couleur rouge, brune, verte ou bleue (**Garon-Lardiere, 2004**).

➤ **virus**

A côté des bactéries, actinomycètes, champignon, et algues, qui sont visible au microscope optique, le sol renferme des microorganismes sub-microscopiques dont l'existence ne peut être démontrée que par la microscopie électronique, Il s'agit essentiellement de virus (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Les virus libres, placés hors d'une cellule vivante et à la lumière sont

rapidement inactivés. Mais, dans le sol, ils peuvent, une fois adsorbés, conserver, Longtemps leur pouvoir infectieux (**Davet, 2003**).

b. Fonctionnement microbiologique du sol

Pendant longtemps la fonction du sol est réduite à un support de vie végétal (**Drénou, 2006**). Il constitue un environnement où interagissent directement ou indirectement de nombreux microorganismes entre eux mais aussi avec ses composantes abiotiques et avec les plantes (**Albino et Andrade, 2006**).

Il se trouve qu'il y a une intime relation entre le sol et la plante, car cette dernière intervient à la fois en profondeur par ses racines, par leur croissance, leurs activités et leurs productions. Elles changent considérablement les propriétés physiques et chimiques du sol. Cependant, les organes aériens de la végétation ont des effets passifs liés à la nécromasse et la litière (**Gobat *et al.*, 2010**).

CHAPITRE II:

Les moisissures



1. Définition des moisissures

Les moisissures sont des champignons microscopiques, ubiquistes à croissance filamenteuse qui regroupent des milliers d'espèces **(Bush ; 2004)**. Elles sont omniprésentes dans notre environnement. La plupart sont phytopathogènes et se développent en saprophyte dans la terre et sur les plantes ou les débris végétaux en voie de putréfaction, elles se retrouvent aussi bien dans l'air que sur le sol et les surfaces, dans l'alimentation et parfois dans l'eau **(Anonyme, 2011)**. Elles se rencontrent également sur les viandes et les produits d'origine animale, les cadavres d'animaux et les déjections des animaux herbivores **(Delarras, 2007)**. Elles sont également considérées comme des formes imparfaites d'agents pathogènes entraînant mycoses et allergies **(Pfohl-Leszkowicz, 1999)**.

Sont constituées par des filaments ramifiés, les hyphes, dont l'ensemble est connu sous le nom de mycélium. Elles sont classées dans le règne des champignons **(Pinton, 2012)**.

L'appareil végétatif des moisissures est constitué de filaments ou d'hyphes qui s'accroissent par leur sommet et dont l'ensemble constitue de façon harmonieuse et centrifuge un réseau appelé mycélium. Cet appareil se développe après qu'une spore se soit fixée sur un substrat nutritif ; se gonfle, se modifie et émet un filament appelé tube germinatif qui devient par la suite filamenteux. Les taches ou colonies que l'on voit à la surface des matériaux moisissés sont essentiellement constituées d'un réseau mycélien très développé **(Boudih, 2011)**.

Ces microorganismes microscopiques produisent une grande variété des métabolites secondaires, certaines d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines. À côté de ces intérêts bénéfiques, les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Leur développement indésirable sur les aliments peut entraîner de nombreux problèmes tel que la modification de l'aspect des produits alimentaires, altération des qualités organoleptiques, réduction qualitative et quantitative de la valeur alimentaire, une baisse de rendement des récoltes et des pertes économiques dues au rejet des produits contaminés. Cependant l'impact le plus négatif de l'altération des denrées alimentaires est lié à la synthèse de substances toxiques : les mycotoxines **(Pitt et al., 2000)**.

2. Écologie des moisissures

Dans la nature, les champignons se développent le plus souvent comme des microorganismes saprophytes. Ils participent à la dégradation et au recyclage de la matière organique et minérale. Ces caractéristiques confèrent aux champignons, la possibilité de coloniser et d'explorer de nouveaux habitats et ainsi, d'occuper tous les environnements

possibles. Terrestres et aquatiques, régions tropicales et polaires (**Dix et Webster, 1995**). Quelques espèces sont adaptées à la sécheresse, d'autres vivent au contraire dans l'eau (eaux douces, océans, ou eaux usées).

Certaines supportent bien des pressions osmotiques élevées (dans les milieux très salés, ou très sucrés, par exemple) et arrivent à contaminer les salaisons, le miel, ou les confitures. Des champignons aimant la chaleur se trouvent dans les composts (à 70-75°C). Mais on trouve aussi des champignons dans les toundras arctiques ; en haute montagne, l'hygrophore printanier se récolte à la fonte des neiges (2°C) ; et certains champignons peuvent encore pousser dans les chambres réfrigérées (*Sporotrichum carnis*) peut altérer des viandes pourtant conservées à -5°C (**Locquin, 1984**).

3. Mode de reproduction

L'appareil végétatif des champignons est un thalle composé de filaments (hyphes) ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium. Ils se reproduisent grâce à des spores (**Nguyen Minh Tri, 2007**).

Après un certain temps de développement, les moisissures comme tous les champignons et autres êtres vivants doivent se reproduire, puis se propager pour aller coloniser d'autres substrats (**Roquebert, 1997**).

Les champignons se reproduisent de deux manières :

- Par voie sexuée : suite à la fusion de deux cellules gamétiques.
- Par voie asexuée ou végétative, la plupart d'entre eux étant rencontrés dans le groupe des imparfaits (**Champion, 1997**).

3.1. La reproduction sexuée

La reproduction sexuée se base sur la fusion de deux gamètes haploïdes (n) donnant un zygote diploïde ($2n$). Une structure (+) à n chromosomes rencontre une autre structure (-) et la fusion des cytoplasmes donne naissance à un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes (**Lecellier, 2013**), (**Figure1**).

La reproduction sexuée se déroule en trois étapes : plasmogamie, caryogamie et méiose (**Jennings et al, 1996**). La plasmogamie correspond à la fusion cellulaire entre deux cellules haploïdes. La cellule résultante est appelée dicaryon car elle possède deux types de noyaux

haploïdes. Les deux noyaux vont fusionner lors de la caryogamie puis la méiose va convertir une cellule diploïde en quatre cellules haploïdes (Carlile *et al.*, 1994).

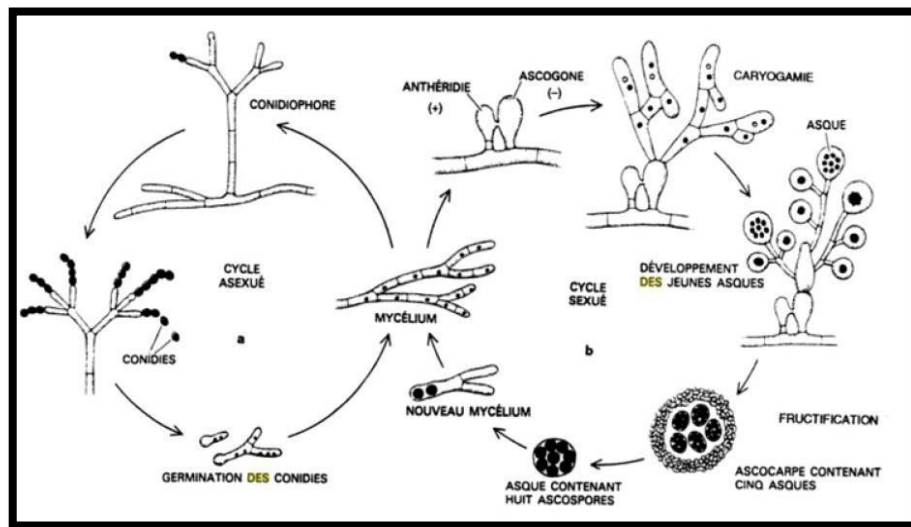


Figure 1: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Lecellier, 2013).

3.2. Reproduction asexuée (végétative)

Elle est beaucoup plus répandue que la précédente, et si elle ne fait pas intervenir de transformation génétique, elle joue un grand rôle dans la dissémination des espèces. Elle se fait soit par une fragmentation du thalle, soit par la production de spores asexuées (Brangeret *al.*, 2007).

Les spores asexuées sont produites chez un mycète par une mitose suivie d'une division cellulaire (Prescott *et al.*, 2003). Il y a trois mécanismes principaux (Leyral et Vierling, 2007 .Brangeret *al.*, 2007).

- Des spores produites par transformation des cellules du thalle : thallospores (arthrospores). Un nouvel organisme se développe à partir d'un fragment parent de mycélium.
- Des cellules fongique se multiplient et se différencient pour former le conidiophore, sur lequel se forment les conidies.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellés ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.

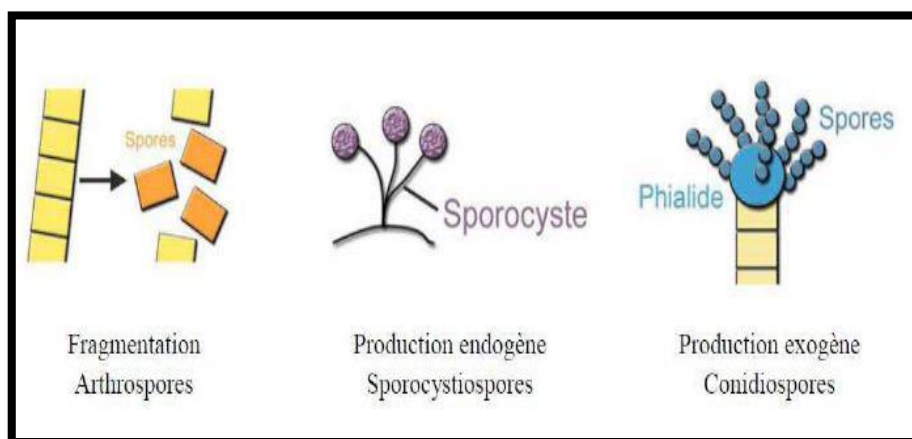


Figure 2: Différents modes de sporulation et les différents types de spores associées
(Barnett *et al.*, 1998).

4. Conditions de croissance des moisissures

Dans leur milieu naturel, la plupart des moisissures sont saprophytes, tirant leur nourriture de matières organiques mortes ou plus ou moins décomposées. Même si toute matière organique peut constituer un substrat de croissance pour les moisissures, les conditions optimales de croissance peuvent varier d'une espèce à l'autre, chacune d'entre elles ayant un degré différent d'adaptation à son environnement. Leurs développements sont dépendants de la nature des substrats disponibles (cellulose, lignine, etc...) et les conditions physiques : températures, activité de l'eau ou disponibilité en eau, pH et oxygène (Gibson *et al.*, 1994 ; Reboux *et al.*, 2010).

4.1. Facteurs nutritifs

Le Carbone et l'azote sont les éléments nutritifs les plus importants pour les moisissures, avec la présence de quelques ions minéraux (Potassium, Phosphore, Magnésium...) en très faibles quantités (Gherras S, 2017).

- **Source de carbone**

Les moisissures utilisent des matières organiques comme source de carbone et énergie. Elles tirent ce carbone par saprophytisme, symbiose ou parasitisme. Les moisissures utilisent la Glycolyse comme métabolisme aérobie pour dégrader les hydrates de carbone. Certains peuvent utiliser des fermentations à des taux bas d'oxygène (Nicklin *et al.*, 2000).

- **Source d'azote**

Les moisissures incorporent l'azote par hétérotrophisme. Elles ne peuvent assimiler l'azote gazeux mais peuvent utiliser le nitrate, l'ammonium et certains acides aminés par absorption directe à travers la membrane. Des sources complexes d'azote, comme les peptides et les protéines, ne sont utilisables par les hyphes qu'après leur dégradation par des protéases en acides aminés (Nicklin *et al.*, 2000).

- **Source d'éléments minéraux et vitamines**

Le phosphore, le potassium, le magnésium, le calcium et le soufre constituent des sels minéraux requis par les mycètes. Les moisissures ont la possibilité d'accéder à des réserves de phosphore en sécrétant dans le milieu extracellulaire des enzymes phosphatases. Le fer est relativement insoluble et donc pas facilement assimilable ; mais les moisissures sont capables de synthétiser des sidérophores ou des acides organiques qui peuvent chélater le fer ou modifier sa solubilité. Certaines espèces peuvent avoir besoins de vitamines préformées, comme par exemple de la thiamine et de la biotine, ainsi que des stérols, de la riboflavine, de l'acide nicotinique et folique (Nicklin *et al.*, 2000).

4.2. Facteurs physico-chimique

- **Température**

Les moisissures sont généralement mésophiles : la croissance des hyphes est optimale à 20- 25°C. En dehors de cet intervalle de température les hyphes se développent plus lentement. Les spores de moisissures mésophiles ne peuvent pas germer à une température inférieure à 5°C, mais elles peuvent résister longtemps aux basses températures allant jusqu'à -20°C (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Il existe aussi des espèces psychrophiles. Elles peuvent se développer, lentement, à des températures Basses, inférieures à 4°C. Ces espèces sont responsables des altérations d'aliments conservés Au froid (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

Les espèces thermophiles sont plus rares. La température optimale pour sa croissance est comprise entre 25 et 35°C, mais cette moisissure peut se développer bien dans un intervalle plus large (15-45°C) et parfois jusqu'à 50°C (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

On peut donc distinguer (Chapeland-Leclerc *et al.*,2005):

- ✓ Des espèces **thermophiles**, se développant bien à 50°C, avec une température minimale de croissance supérieure à 20°C : exemples : *Byssoschlamys nivea*, *Absidia ramosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor pusillus*.
- ✓ Des espèces **thermotolérantes**, avec une température maximale de croissance proche de 50°C, mais une température minimale très inférieure à 20°C: *exemple* : *Aspergillus niger*.
- ✓ Des espèces **mésophiles**, se développant entre 10°C et 40°C: exemples : *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus versicolor*.
- ✓ Des espèces **cryophiles**, dont la germination optimale s'effectue à des températures inférieures à 10°C.

- **Humidité**

Les différences de comportement des moisissures selon leurs exigences en eau conduisent à distinguer plusieurs types de moisissures (**Chapeland-Leclerc et al., 2005**):

- ✓ Espèces **xérophiles**, chez lesquelles la germination des spores est possible avec une teneur en eau inférieure à 80% : ce sont principalement des espèces du genre *Aspergillus*.
- ✓ Espèces **mésophiles**, avec une exigence en eau comprise entre 80% et 90%: *Penicillium Cyclopium*, *Penicillium expansum*, *Alternaria tenuissima*, *Cladosporium cladosporioides*.
- ✓ Espèces **hygrophiles** (supérieur à 90 %) : *Epicoccurn nigrum*, *Fusarium spp*, *Stachybotrys Atra*, *Mucorales*. Ces espèces se développent généralement au champ, sur les plantes vivantes.

- **Composition gazeuse**

La plupart des champignons sont des microorganismes aérobies ; ils ont besoin d'oxygène Pour une croissance normale. Certaines espèces peuvent se développer en anaérobiose : c'est le cas du *Byssoschlamys* qui contamine les jus de fruits conservés par pasteurisation (**Pfohl-Leszkowicz, 2001**).

- **Lumière**

La lumière favorise la maturation des conidies et la germination des spores. Les moisissures sont, généralement, indifférentes à l'action de lumière. Toutefois, certaines espèces (les *Tuberales*) ne supportent pas la lumière et se développent dans des endroits obscurs (grottes); Inversement, d'autres se développent sur les versants de montagne ensoleillés en permanence ou dans les régions désertiques (les *Discomycetes*) (Pfohl-Leszkowicz, 2001).

- **Activité en eau (Aw)**

Les moisissures sont de façon schématique plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures.

Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des Aw voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

- **pH**

Les moisissures peuvent se développer dans une large gamme de pH ; elles se développent normalement pour des pH compris entre 3 et 8, leur croissance étant normalement optimale entre 5 et 6. En raison de leur acidité ($\text{pH} < 6$) de nombreux aliments comme les légumes et les fruits sont beaucoup plus exposés à une altération fongique que bactérienne (Keller *et al.*, 1997).

- **Composition du substrat**

La composition chimique des différentes denrées alimentaires joue un rôle très important dans la croissance fongique (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

4.3. Facteurs biologiques

- **Facteurs physiologiques**

La vitesse de croissance mycélienne d'une espèce, l'intensité de sa sporulation et la longévité des conidies sont évidemment des conditions optimales à une intense prolifération : *Rhizopus nigricans* en est un exemple connu (Chapeland-Leclerc *et al.*, 2005).

- **Présence d'insectes**

Les insectes représentent les principaux vecteurs de spores de moisissures au champ et dans les Lieux de stockage **(Pfohl-Leszkowicz, 2001)**. Les insectes, en dégradant la paroi des grains, Favorisent la contamination par les moisissures et la production des mycotoxines. Les acariens sont des vecteurs importants de spores, ils vivent sur les grains moisis, récupèrent Et transportent ensuite les spores sur la surface de leur corps et dans leur tube digestif **(Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002)**.

- **Interactions microbiennes**

La compétition pour les nutriments et l'espace est un phénomène rencontré fréquemment dans Le monde vivant. La présence simultanée de plusieurs espèces de microorganismes dans le même milieu détermine des interactions entre les différentes espèces.

Les conditions environnementales peuvent favoriser certaines espèces et défavoriser les autres. La synthèse des substances toxiques (mycotoxines) et leur accumulation dans le milieu peut aussi Avoir un effet inhibiteur sur le développement d'autres espèces **(Pfohl-Leszkowicz, 2001)**.

5. Cycle de vie des moisissures

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes **(Figure 3) : germination, développement, reproduction et dormance/latence**.

Le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenchera par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité de la lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées. Chaque moisissure produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, se présentent très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, en microscopie, toutes les spores d'une

même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constante ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (Touati R, Amor-Chelihi L.2016).

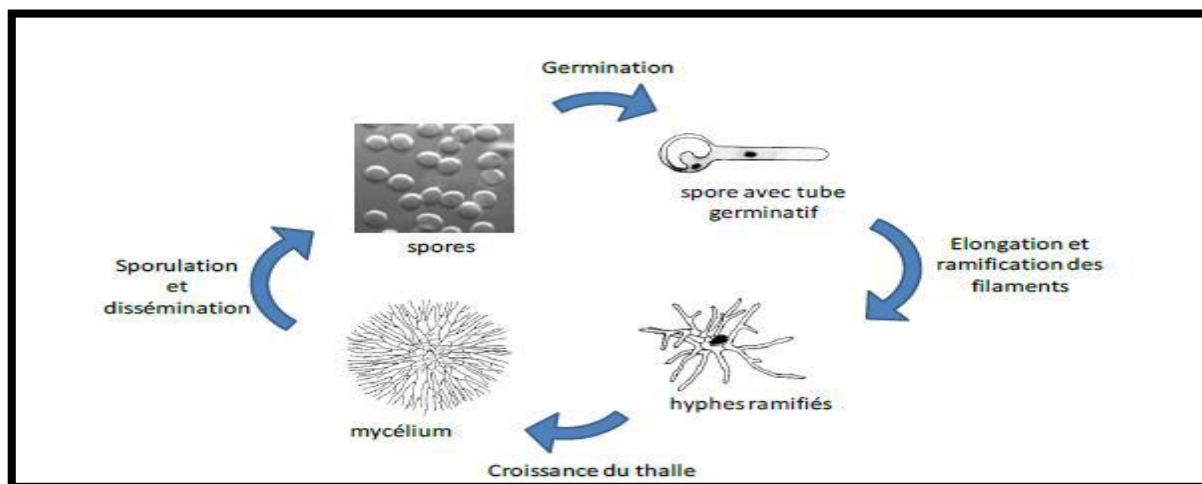


Figure 3: Cycle de vie des moisissures (Atherton G, Bartholomew J 2015).

6. Mode de vie

En raison de leur caractère hétérotrophe, les champignons se développent sur des milieux organiques et sont donc parasites, symbiotes ou saprophytes.

- a) **Les parasites** : vivent sur ou dans le corps d'un hôte et sont responsables des mycoses chez l'homme (champignons infectieux) ou de certaines maladies des végétaux, notamment des récoltes.
- b) **Les symbiotiques** : vivent, par contre en symbiose avec un autre microorganisme, ce dernier les supporte sans en souffrir, ou même bénéficie de leur présence (Bouزيد, 2006).
- c) **Les saprophytes** : dans ce cas, les champignons dégradent la matière organique morte ou en décomposition afin de prélever les éléments minéraux essentiels. Ils jouent un rôle très important dans le recyclage des matières mortes comme les débris végétaux et animaux (Poisson *et al.*, 2007).

7. Classification des moisissures

La classification des champignons est essentiellement basée sur des caractères purement morphologiques (Meyer *et al.*, 2004). On estime à plus de 100 000 le nombre d'espèces fongiques, plus de 1000 d'entre Elles pouvant contaminer les aliments (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002).

Quatre divisions sont différenciées selon les modes de reproduction sexuée et les Caractéristiques des spores : les Mastigomycotina se répartissent en deux classes : les Chytridiomycètes et les Oomycètes, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou *Fungi imperfecti* (Chabasse *et al.*, 2002).

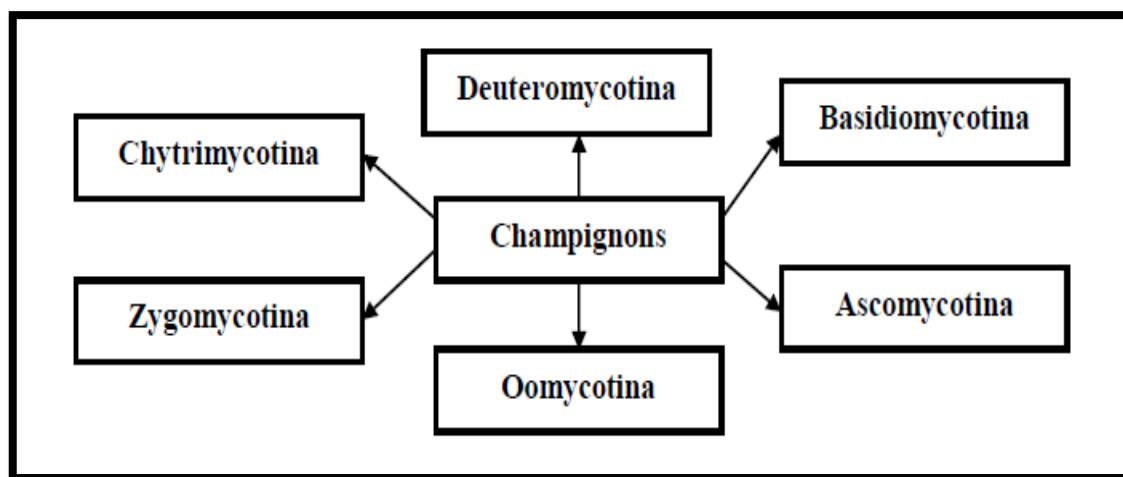


Figure 4: Classification des champignons (Kwon Chung et Bennett, 1992).

8. Les champignons thermophiles

Un champignon est considéré thermophile lorsque les températures limites de sa croissance sont situées entre 20°C et plus de 50°C. (Cooney Et Emerson, 1964).

Le premier champignon thermophile (*Mucor pusillus*) a été décrit en 1886 par LINDT (en COONEY Et EMERSON, 1964). En 1899, *Humicola lanuginosa* a été par TSIKLINSKAYA (En Emerson, 1968). Jusqu'aux années 1950, uniquement cinq souches avaient été décrites. En 1964, grâce aux études réalisées par Cooney Et Emerson, une quinzaine de souches thermophiles ont été parfaitement bien identifiées. Plus tard, CRISAN (1973) a décrit une trentaine de souches thermophiles et thermotolérantes.

A nos jours, la découverte de nouveaux champignons thermophiles n'a pas avancé et il existe seulement trente Champignons thermophiles décrits (INGOLD Et HUDSON, 1993).

Les champignons thermophiles et thermotolérants sont plus fréquents dans les sols tropicaux chauds et ils sont distribués sur toutes les latitudes (Ellis, 1980). De même, Tansey et Jack en 1976 ont étudié le comportement des champignons sur différents types de sol. Ils ont aussi conclu que les champignons sont isolés plus fréquemment dans les habitats chauds. La grande fréquence est observée dans les sols ensoleillés puis à une fréquence moindre dans

l'herbe à l'ombre, la fréquence la plus basse est observée dans les sols sous l'ombre des arbres. Aussi, **Thakur (1977)** a isolé des champignons filamenteux thermophiles à partir de l'air dans les mois chauds de l'année (mai, juin, juillet et août) avec une grande fréquence.

Durant le compostage des végétaux qui constituent une des plus riches sources des champignons thermophiles, la participation de ces derniers dans le processus de compostage montre qu'ils sont très liés à la décomposition de la matière organique (protéine, lipide, fibre...) (**Kane et Mullins, 1973**). En effet plusieurs micro-organismes sont capables de se développer sur des substrats solides, mais seuls les champignons filamenteux peuvent croître à des niveaux satisfaisants sur des milieux ayant des humidités initiales faibles. Par conséquent, ils trouvent une large utilisation dans le domaine de la Fermentation en Milieu Solide (FMS) (**Roussos, 1985**).

9. Les Métabolites secondaires fongiques

Au cours de ces dernières années, de nombreux métabolites secondaires ont été découverts.

Ce sont des molécules ayant des activités nouvelles dans divers champs d'applications : pharmacie, cosmétique, alimentation et agriculture. Ils sont utilisés en tant qu'anti inflammatoires, hypotenseurs, anti tumoraux, anticholestérolémique, insecticides, régulateurs

De la croissance végétale ainsi qu'en tant qu'herbicides et pesticides écologiques. Ils comprennent les acides, les alcaloïdes, les antibiotiques, les immunodépresseurs, les immunostimulants, les arômes et les enzymes (**Boiron P, 1996**).

Les métabolites secondaires (aussi appelés produits naturels) sont des molécules organiques. Ils ne sont pas indispensables à la croissance du microorganisme lui-même, leur absence peut limiter la survie, la fécondité ou l'apparence d'un microorganisme mais peut aussi n'avoir aucun effet. Ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Les microorganismes produisent leurs métabolites secondaires après avoir terminé leur phase de croissance et avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase (**Tortora et al., 2003**).

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du micro-organisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leur sont propres à partir de produits du métabolisme primaire et qu'ils sont généralement produits en faible quantité (**Tortora et al., 2003**). Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres (**Gaitatzis et al., 2002**).

De ce fait, les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

1. Métabolites qui activent la sporulation (acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans*) (**Champ et al., 1987 ; Champ, El-Zayat, 1989 ; Mazur et al., 1991 ; Calvo et al., 2001**).
2. Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelle (**Kawamura et al., 1999**).
3. Métabolites toxiques sécrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) (**Trail et al., 1995 ; Hapwood, 1988 ; Alspaugh et al., 1997**).

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

1. Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables.
2. Protègent les spores en dormance contre des amibes.
3. Eliminer dans l'environnement immédiat des microorganismes concurrents pendant la germination (**Demain et Fang, 2000**).

Parmi les métabolites secondaires nous pouvons citer :

- Les mycotoxines (**Halewyn et al, 2001**).
- Les antibiotiques (**Botton et al, 1990**).

9.1. Les mycotoxines

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin *toxicum* signifiant « poison ». Ils se distinguent des métabolites primaires comme par exemple les produits de la glycolyse, qui sont primordiaux pour tout être vivant. Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude de métabolites secondaires (**Reboux et al. 2006**). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires toxiques produits par certaines souches de moisissures dans les milieux où elles se développent, principalement dans les matières premières d'origine végétales (céréales, légumes, fruits). Plusieurs centaines de mycotoxines ont pu être identifiées et environ une trentaine de ces molécules a une véritable importance en termes de santé animale et humaine (**Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002**).

Tous les métabolites secondaires ne sont pas néfastes pour l'homme. Il en est ainsi pour les Antibiotiques (Sidhu 2002). Il existe environ 300 à 400 mycotoxines (Elidemir *et al.* 1999). D'après leur structure chimique, les mycotoxines sont considérées comme stables et en particulier thermostables (Bullerman *et al.* 2007; Frémy *et al.* 2005).

Les mycotoxines se retrouvent dans le mycélium et les spores et peuvent diffuser dans le substratum. Plusieurs de ces toxines sont relativement stables et leur toxicité peut persister longtemps et ce même lorsque les cellules fongiques ne sont pas viables. Il faut toutefois noter qu'il n'existe actuellement pas de données sur la durée précise de cette toxicité. Il y aurait, selon les auteurs, jusqu'à 400 mycotoxines répertoriés (Etzel, 2002).

Les principales mycotoxines connues sont :

- Les aflatoxines produites principalement par *Aspergillus flavus* (WHO ,1990).
- Les tricothécènes qui regroupent plusieurs dizaines de mycotoxines différentes produites par de nombreuses espèces dont *Fusarium sp.* et *Stachybotrys chartarum* (WHO ,1990).
- Les ochratoxines produites principalement par *Aspergillus ochraceus* et 12 espèces de *Penicillium* (WHO ,1990).
- Stérigmatocystine produite essentiellement par *Aspergillus versicolor* (Engelhart *et al.* 2002).

Tableau 1: Quelques espèces fongiques productrices de mycotoxines (Reboux, 2006).

Moisissure	Mycotoxine
<i>Aspergillus parasiticus</i> , <i>A. flavus</i>	Aflatoxines B1, B2, G1 et G2
<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i>	Ochratoxines A, B, C
<i>Fusarium roseum</i> , <i>Fusarium sp.</i>	Zéaralénone
<i>F. tricinctum</i> , <i>Fusarium sp.</i>	Déoxynivalénol (DON), Nivalenol, Fusarenone Toxine T2, Diacetoxyscirpenol

<i>F. moniliforme, F. proliferatum, Fusarium</i> sp.	Fumonisines
<i>P. citrinum, Monascus ruber</i>	Citrinine
<i>P. patulum, Byssoschlamys nivea</i>	Patuline
<i>A. ochraceus, P. cyclopium, P. puberulum</i>	Acide pénicillique
<i>F. proliferatum, F. subglutinans</i>	Moniliformine
<i>A. flavus</i>	Acide cyclopiazonique

❖ Importance des mycotoxines

- ✓ Les mycotoxines représentent un risque potentiel pour la santé humaine et animale. Le contact avec les mycotoxines peut être à l'origine de toxicité aiguë et chronique allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire, l'appareil pulmonaire, ainsi que sur le système digestif et rénal (**Pitt, 2000**).
- ✓ Elles peuvent avoir également des propriétés cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (**Yiannikouris et Jouany, 2002**).
- ✓ Certaines mycotoxines ont le pouvoir d'affaiblir les réactions immunitaires, et ainsi de réduire la résistance aux infections, ce qui est aujourd'hui considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement (**Yiannikouris et Jouany, 2002**).

9.2. Les antibiotiques

Un antibiotique est l'un des métabolites secondaires, c'est une substance thérapeutique qui a pour but de lutter contre des bactéries responsables d'infection, exerçant une action toxique. Cette dernière peut être seulement inhibitrice de la croissance, elle est alors bactériostatique et réversible, mais elle peut aussi être létale et dans ce cas elle est bactéricide et irréversible (**Abdelaziz, 2006**).

Ils sont des substances naturelles produites par des bactéries du sol ou certains champignons ; extraits de substances d'organismes vivants, leur origine est dite naturelle mais ils peuvent aussi être synthétisés de façon totale ou partielle (origine semi-synthétique) (**Ait Mouhoub, 2015**). Le mode d'action des ATB permet de tuer les bactéries sensibles (bactéricides) ou d'inhiber leurs développements (bactériostatiques). Il existe des ATB à spectre

étroite ou à large spectre, c'est-à-dire qui ciblent certaines bactéries précisément ou une large gamme d'espèces (**Walsh 2003; Plesiat 2012**).

Les antibiotiques sont, soit d'origine bactérienne (*Bacillus brevis* ou *Pseudomonas pyocyanae*), soit d'origine fongique (*Actinomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*). Pour la plupart, ils sont produits par des moisissures ou des microorganismes vivant dans le sol (**Vachel et Février, 1952**).

Tableau 2: Moisissures productrices d'antibiotiques (**Larpant Larpant-Gourguand, 1996**).

Organismes producteurs	Antibiotiques
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Chéphalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Céruline
<i>Fusidium coccineum</i>	Acide fusidique
<i>Helminthosporium siccans</i>	Siccanine
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griséofluline

Partie 2 :

Etude expérimentale



CHAPITRE III:

Matériel et méthodes



Ce présent travail est réalisé au niveau de Laboratoire de Microbiologie centre universitaire Abdelhafid Boussouf Mila. Il porte sur Etude de l'activité antibactérienne d'une collection de moisissures isolées du sol proche de source thermique. En effet, les échantillons du sol utilisés ont été prélevés du site Hammam Abdallah (Bouhama- Mila).

1. Isolement des champignons du sol

1.1. Le site d'étude

Le site d'étude Hammam Abdallah –Bouhama- (**Mila**).

a) Situation géographique

La source thermique de Bouhama désignée sous le nom Hammam Abdallah depuis 1999, est l'une des sources les plus importantes dans le secteur d'étude. Elle est située à 7,5 km à l'Est du chef lieu d'Ahmed Rachdi wilaya de Mila (**Figure 5**). Les eaux chaudes sortent dans le lit d'un ravin profond d'Oued El Hammam (**Mammeri, 2017**).

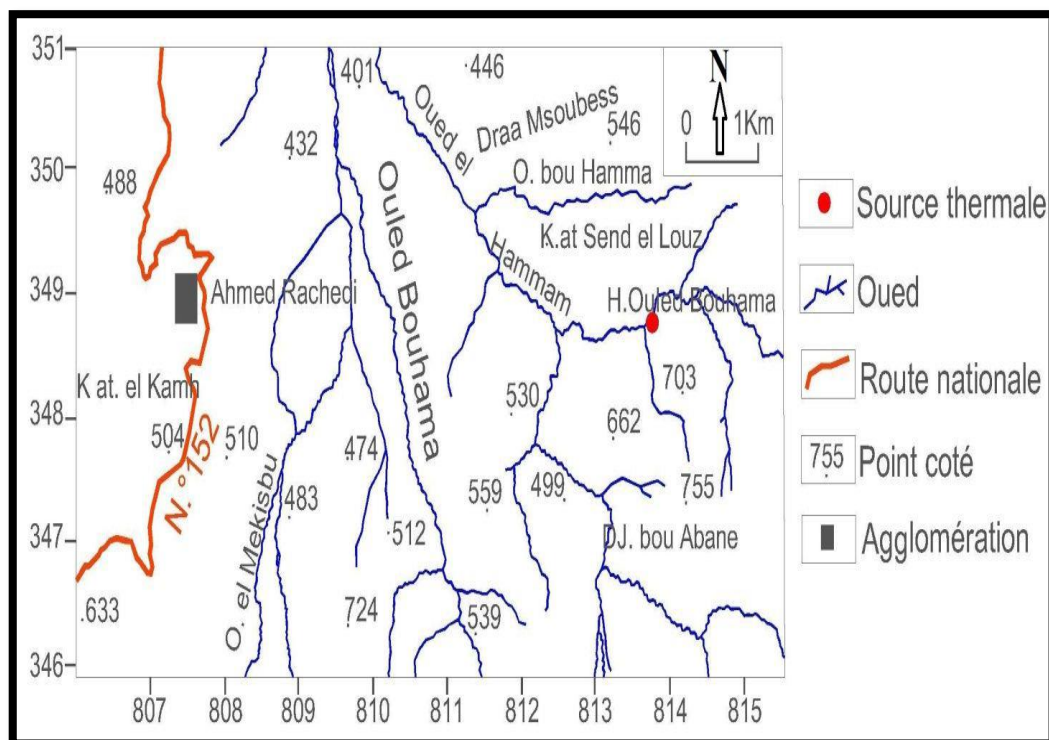


Figure 5: Situation géographique de Hammam Abdallah (Bouhama-Mila) (**Mammeri ,2017**).

b) Conditions géologiques

La source thermique émerge à l'intersection d'une faille de direction NNE –SSW qui met en contact les calcaires albiens et les marnes sénoniennes avec une faille probable de direction EW), (Figure 6), (Mammeri ,2017).

c) Propriétés physico-chimiques des eaux

- Les températures des eaux thermales varient entre 42 et 43,5°C
- Les valeurs du pH sont proches de la neutralité (6,7 et 6,8)
- La conductivité est plus importante, les valeurs sont comprises entre 3595,25 et 3706,29 $\mu\text{mhos/cm}$
- La minéralisation est relativement élevée 2750,93 et 2836,66 mg/l
- Le strontium 9,6mg/l et le fluor 2,7mg/l représentent les éléments mineurs les plus importants dans ces eaux selon Issaadi, les autres oligo-éléments sont faibles parmi lesquels : l'ammonium (1,22mg/l), le brome (0,95mg/l), le lithium (0,62 mg/l), le bore (0,5 mg/l) et l'iode (0,17mg/l)
- La composition chimique en éléments majeurs est dominée par les sulfates de calcium, le faciès de l'eau est sulfatée calcique (Mammeri ,2017):

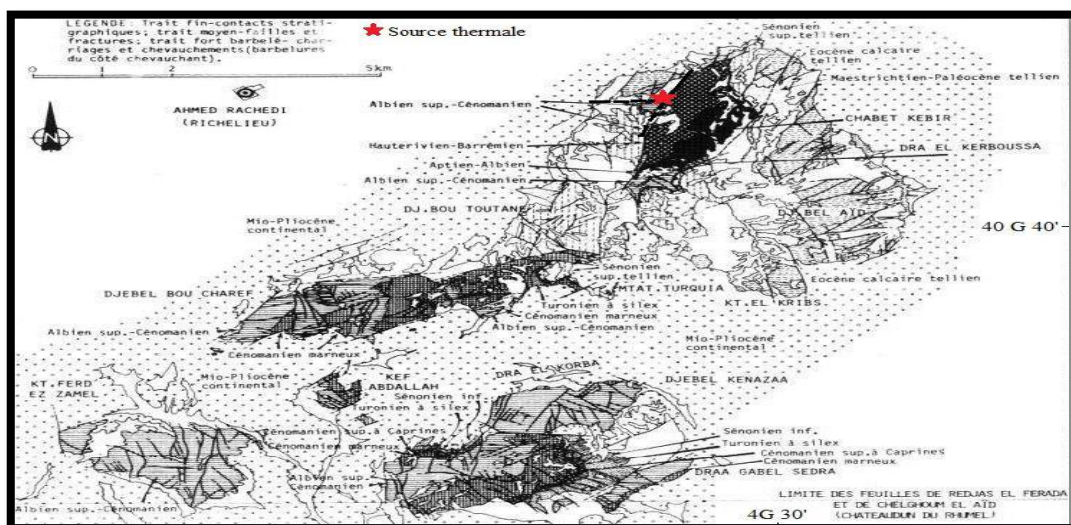
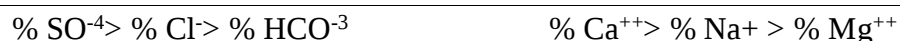


Figure 6: Carte géologique de la région de Bouhama (Mammeri, 2017).

1.2. Échantillonnage

Les échantillons du sol, utilisés pour cet objectif, sont prélevés à partir des sols environnants de stations de la Source thermale Hammam Abdallah (Bouhama). (**Figure 7**). le 24 d'avril 2021.



Figure 7: Présentation des régions d'étude (**Original**).

Les gros débris sont d'abord écartés (plante, racines, pierres, etc....), puis à 10 cm de profondeur, 40g de sol sont prélevés à l'aide d'une spatule et placés dans un flacon stérile

L'échantillon est déposé sur un papier d'aluminium stérile soigneusement enveloppé dans un sac en papier stérile. Il a été ensuite gardé au frais (4°C) puis transféré au laboratoire pour une analyse immédiate. Et transportés au laboratoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse.



Figure 8: Echantillon de sol prélevé (Original).

1.3. Milieu d'isolement

Le milieu utilisé pour l'isolement des moisissures du sol est la gélose PDA (potato dextrose agar) (**Annexe 01**). La croissance bactérienne est inhibée par l'addition d'Amoclan aux milieux de culture, avant stérilisation (**Botton *et al.*, 1999**).

1.4. Préparation des dilutions

❖ But

La diminution de la charge microbienne par dilution de l'échantillon de sol à analyser est réalisée dans le but d'une purification ultérieure plus aisée et l'obtention de colonies bien séparées à partir des cultures mixtes.

❖ Principe

La dilution décimale consiste à diminuer la densité de sol en micro-organismes, d'abord à 1/10 puis à 1/100 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de la suspension mère au facteur de 10^{-4} . Ainsi, le sol est prêt à l'analyse microbiologique, bien que la probabilité d'éliminer un nombre considérable d'espèces microbiennes soit non nulle.

❖ Préparation de la solution mère

Une quantité de 1g de sol a été dilué dans 9ml d'eau physiologique stérile, puis le mélange a été agité au Vortex pendant 10 min.

❖ Préparation des dilutions

Une série de dilutions a été préparée dans des tubes de 9 ml de l'eau physiologique stérile.

Les dilutions ont été réalisées à partir de la solution mère jusqu'à 10^{-4} (**Figure 9**).

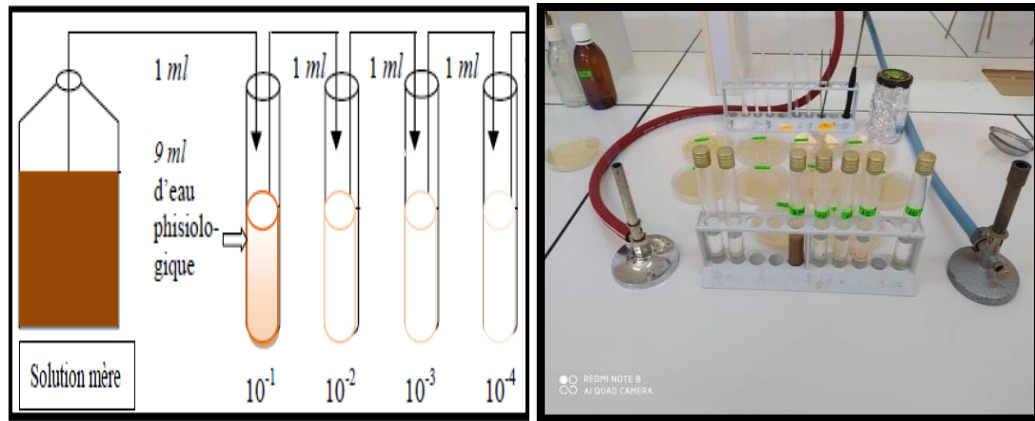


Figure 9 : Préparation des dilutions.

1.5. Préparation du milieu de culture

C'est un milieu usuel pour la culture de la plupart des Champignons. Il est préparé à partir de pomme de terre et de glucose (**Annexe 1**).

1.6. Méthode d'isolement

Avant d'entamer le travail, il est important de créer une zone stérile, par la flamme du bec Bunsen, sur une paillasse soigneusement nettoyée. Ensuite, la suspension mère est préparée en mélangeant 1g de chaque échantillon avec 9 ml d'eau distillée stérile. Les étapes suivantes sont :

- Homogénéiser la suspension mère par agitation du flacon de prélèvement
- Procéder tout d'abord à la numérotation des tubes en les étiquetant respectivement de 10^{-1} à 10^{-4} celles/ml pour les différentes dilutions
- Prélever à l'aide d'une pipette graduée, 1ml d'échantillon mère, puis l'ajouter à 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} par rapport à la suspension mère

Prélever 1 ml de la suspension 10^{-1} agitée, à l'avance à l'aide d'un vortex, avec une pipette pasteur neuve et diluer dans un second tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, pour arriver à une dilution de 10^{-2} , et ainsi de suite à chaque dilution, pour arriver à diminuer la charge microbienne de l'échantillon mère à l'exponentiel de 10^{-4} . Changer les pipettes entre chaque prélèvement.

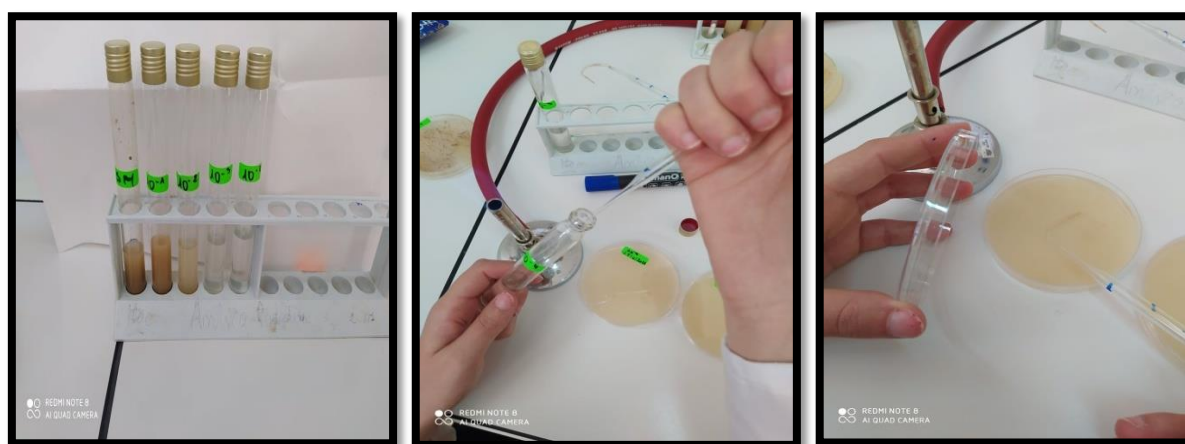
1.7. Ensemencement et incubation

Tout en respectant les conditions d'asepsie et en manipulant toujours dans la zone stérile:

- Bien homogénéiser le contenu du tube à essai contenant la suspension diluée à 10^{-4}
- Prélever à l'aide d'une pipette Pasteur, une goutte de cette suspension ;
- L'étaler à l'aide d'un râteau, sur toute la surface de la boîte de Pétri coulée (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Sur les boîtes ensemencées on indique le numéro de l'échantillon, la dilution ainsi que la date d'ensemencement.

Il est à noter que deux répétitions sont réalisées pour chaque dilution.

Les boîtes sont incubées à 28°C et sont observées quotidiennement pendant trois jours. Sont repiquées individuellement, les boîtes des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et la solution mère.



(A) (B) (C)

Figure 10: (A) : Préparation des dilutions ; (B) : Prélèvement de suspension ; (C) : L'étalement (Original).

2. Repiquage et Purification des isolats obtenus

Après un bon développement des colonies, nous avons effectué des repiquages de chaque colonie pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné (**Guiraud, 1998**).

Le repiquage a été fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur le milieu PDA (**Annexe 1**). Ce fragment a été déposé au centre d'une nouvelle boîte sur la quelle nous avons indiqué la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement. Le repiquage a été fait aseptiquement près du bec Bunsen et les boîtes ont été incubées à 28°C pendant sept jours jusqu'à obtention des souches pures.

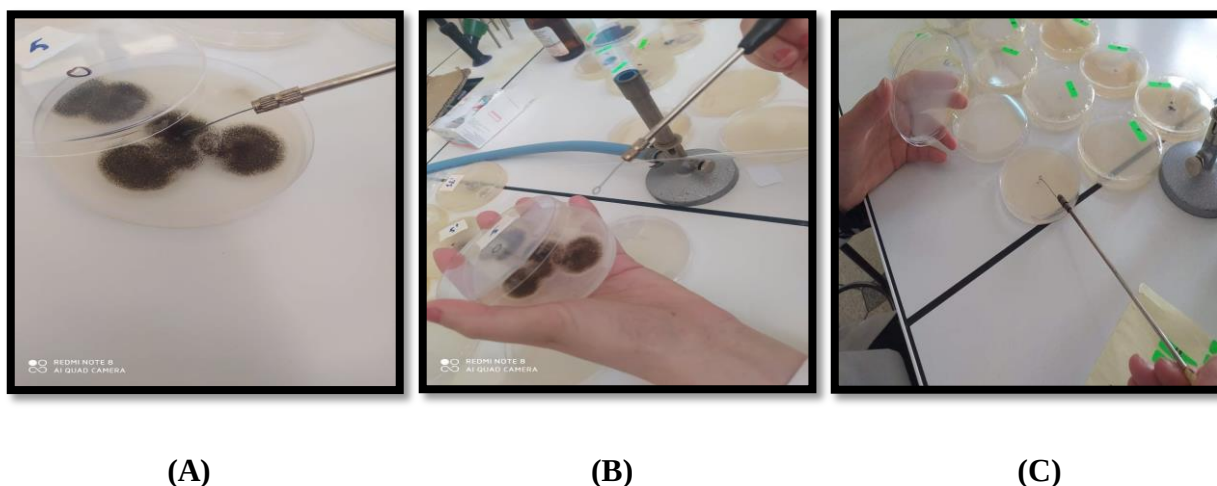


Figure 11: (A), (B) : Le prélèvement d'un fragment de colonie ;(C): Le fragment a été déposé au centre d'une nouvelle boîte (**Original**).

2.1. Conservation

Les moisissures purifiées ont été conservées après être ensemencées sur milieu gélose PDA inclinées et incubées à 28°C pendant 7 jours.

3. Méthodes d'identification des souches

L'identification des moisissures est basée essentiellement sur l'étude des caractères cultureux et des caractères morphologiques révélant des structures (**Giraud, 1998**).

L'identification reste l'opération la plus difficile dans le domaine de la mycologie, elle a pour but de classer les souches fongiques par genres et espèces selon les critères d'identification (**Botton et al., 1990**). Elle est effectuée par deux techniques classiques, une observation macroscopique (aspect général des colonies) et une étude microscopique du mycélium et des conidies ou spores (étude des filaments végétatifs, des organes de fructification et des spores). Le milieu utilisé est PDA (**Annexe 1**).

3.1. Identification macroscopique

Les caractères morphologiques et culturaux ont été déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques cités ci-dessus. Les milieux sont coulés sur des boîtes de Pétri, ils ont été ensuite ensemencés par quelques spores ou une petite bouture mycélienne prélevée auparavant à l'aide d'une anse de platine stérile et déposée au centre de la boîte. L'évaluation de l'ampleur de la croissance et du développement a été observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. Ce suivi réalisable à l'œil nu mais aussi grâce à un binoculaire permettant ainsi de rassembler des indices révélateurs sur l'identité de nos souches (**Leghlimi, 2013**). Elle se base essentiellement sur les caractères suivants :

- **L'aspect des colonies** est également un bon critère d'orientation. Les champignons levuriformes donnent des colonies lisses, glabres, humides, d'aspect brillant ou mat, parfois rugueuses. A l'opposé des champignons filamenteux qui ont une texture différente : Duveteuse, laineuse, cotonneuse, veloutée, poudreuse ou granuleuse. Le relief des colonies (Plates, plissées, cérébriformes, ...) tout comme leur consistance (molles, friables, élastiques, cartonnées ou dures) sont aussi à observer.
- **Le relief des colonies** il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).
- **La taille des colonies** : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).
- **La couleur des colonies** est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*), (**Botton et al., 1990**).
- **Le thalle** : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé.
- **Les structures de fructification** : La présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (**Botton et al., 1990**).

- **La vitesse de pousse** est déjà une bonne orientation. Elle peut être rapide comme chez les *Aspergillus* et les *Mucorales*, plus lente chez les Dermatophytes et certains Dématiés, ou même très lente comme chez *Onychocola canadensis*, agent d'onyxis.
- **Odeur.**
- **Exsudat** (gouttelettes transpirées par le mycélium aérien).

Enfin l'observation macroscopique des cultures devra rechercher en surface, et surtout au centre de la culture, les structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) ainsi que des amas mycéliens ou mèches (corémies) (**Chabasse et al., 2002**).

3.2. Identification microscopique

- L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques ; On notant les types de spores, aspect du thalle, couleur et disposition des spores, conidies (**Mouria et al., 2012**).
- ❖ **Le thalle** : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé (**Badill et al., 1987**).
- ❖ **Les spores** : Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes (**Campbell et al., 1996**).
- ❖ **Aspect des spores** : D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores.

L'identification microscopique des champignons repose sur plusieurs méthodes, les deux les plus utilisées sont celles la méthode de bleu de méthylène et la méthode de scotch. Ces deux méthodes sont décrites ci- dessous.

A. Par Bleu de méthylène

Un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle (**Chabasse et al., 2002** **Guezlane et al., 2011**).

L'observation microscopique a été effectuée en microscope optique aux différents grossissements (GX10, GX40) ainsi qu'à l'immersion (GX100).

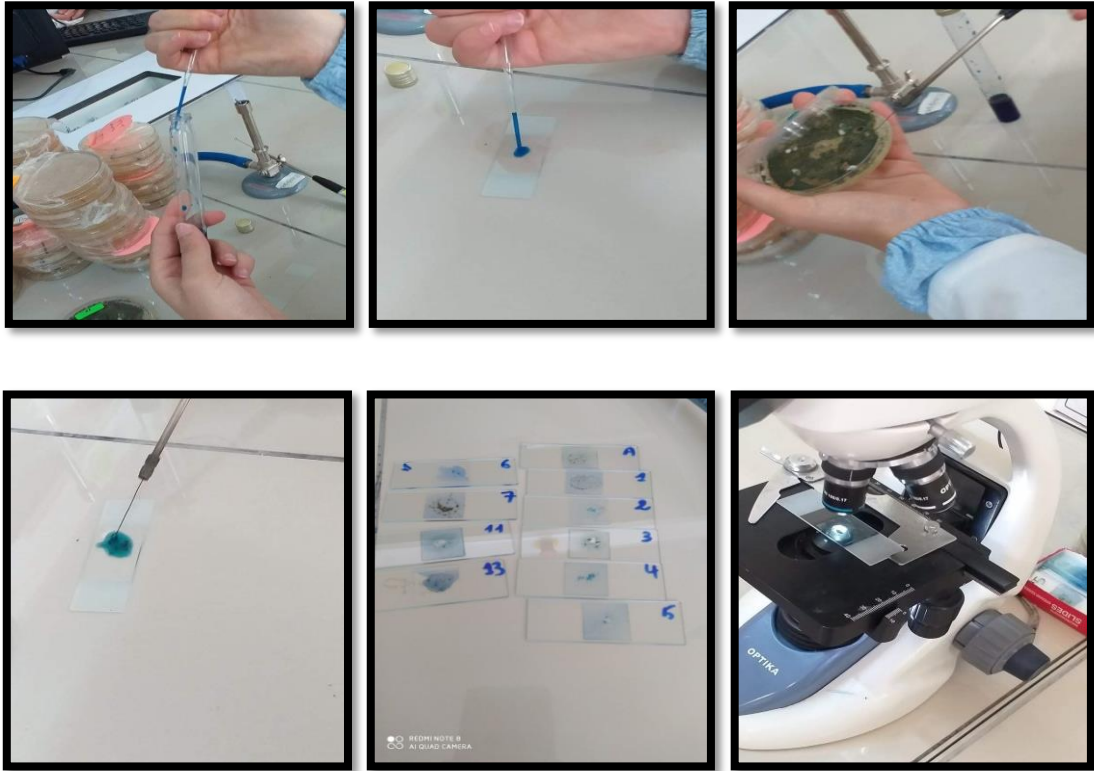


Figure 12: Méthode d'identification microscopique des moisissures (Original).

B. par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch (technique du drapeau) une fraction mycélienne on le recolle sur une lame préalablement étalée par une goutte de bleu de méthylène diluée avec deux goutte de l'eau physiologique. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements $\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$ à l'aide d'un microscope (Guezlane *et al.*, 2011).



Figure 13: Méthode d'identification microscopique des moisissures par la technique de Scotch.

4. Activités antibactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques a été réalisée à partir de l'apparition des zones claires après 18 à 24 heures d'incubation à 37 °C appelés la zone d'inhibition ; son diamètre est déterminé et mesuré.

Pour évaluer cette activité trois techniques ont été utilisées :

- Technique des cylindres d'agar.
- Technique des disques.
- Technique des puits.

Pour la réalisation des tests de l'activité antibactérienne nous avons utilisé les souches de références illustrées dans le **tableau 03**.

Tableau 3 : Origines des souches utilisées dans les différents tests d'activité antibactérienne.

Bactéries	Gram	Code	Origine
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853	Laboratoire Ghaouat d'Ain mlila, Oum El Bouaghi
<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC 11303	Laboratoire Ghaouat d'Ain mlila, Oum El Bouaghi
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 25923	Laboratoire Ghaouat d'Ain mlila, Oum El Bouaghi
<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC 10987	Laboratoire Ghaouat d'Ain mlila, Oum El Bouaghi

4.1. Préparation des Bactéries test

Les souches sélectionnées ont été revivifiées dans des tubes contenant 9 ml de bouillon nutritif « Nutrient broth » à l'aide d'une pipette Pasteur flambée et incubées à 37°C avant d'être utilisées dans les tests de l'activité.

A partir de chaque tube de BN mentionnant un trouble, nous avonsensemencé par stries une boîte de Pétri contenant la gélose nutritive puis incubées à 37°C pendant 18 heures (**Figure 14**).

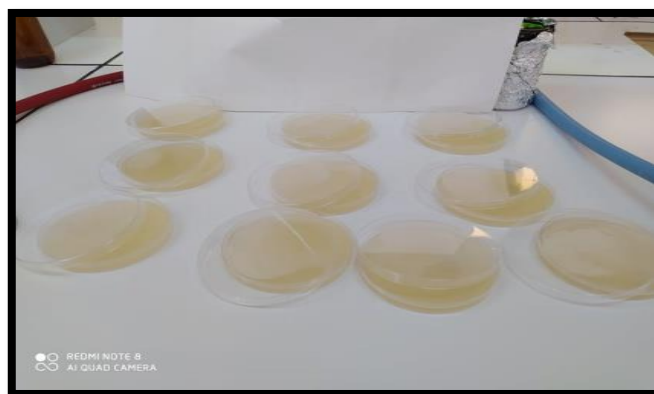


Figure 14: Coulage du milieu Mueller-Hinton en boîtes de Pétri (**Original**).

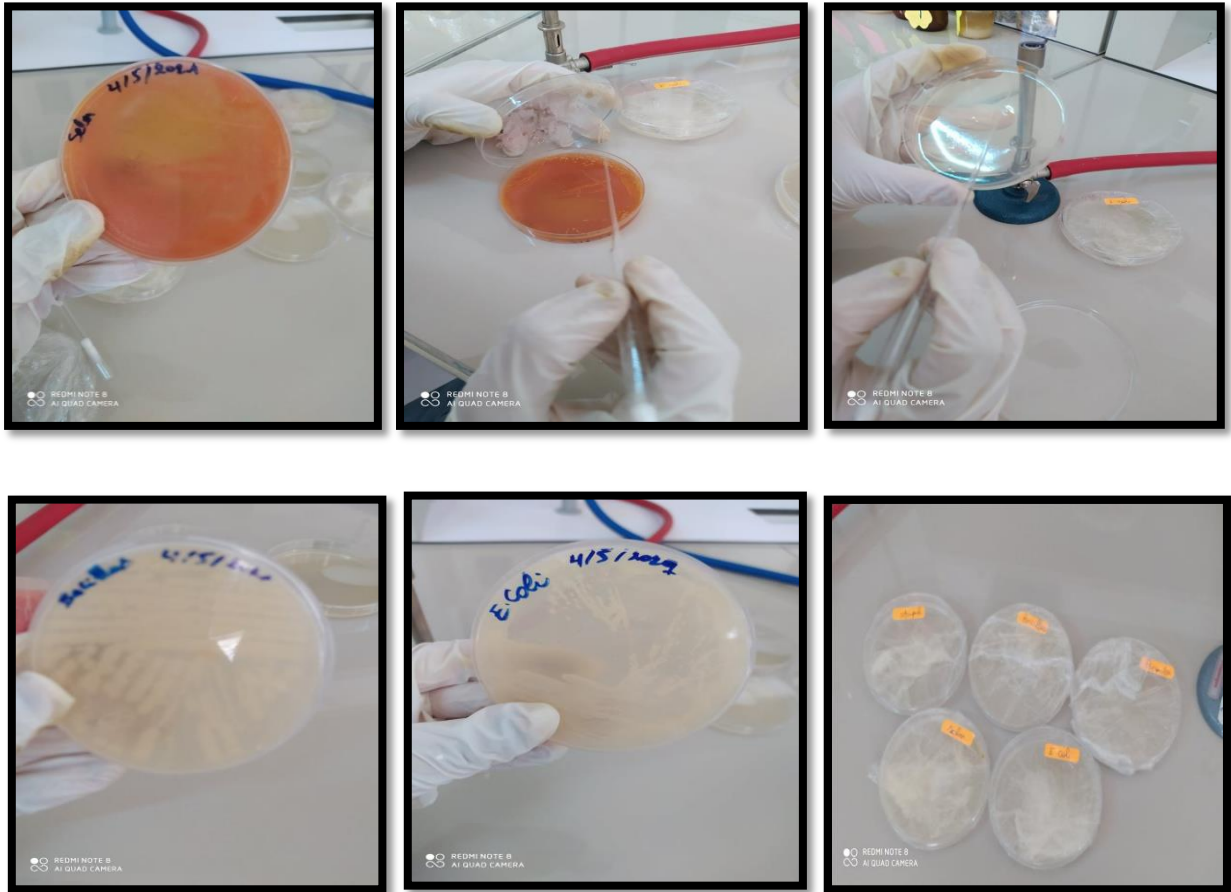


Figure 15: Méthode d'ensemencement des bactéries tests par stries sur Mueller-Hinton (Original).

4.2. Préparation des suspensions bactériennes

Après incubation nous avons raclé à l'aide d'une pipette pasteur quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques, puis nous avons déchargé la pipette dans des tubes à essai contenant 10ml d'eau physiologique stérile (0.9 % NaCl). La turbidité est ajustée à 0.5 Mac Ferland.

4.3. Ensemencement

La suspension bactérienne a été ensemencée à l'aide d'un écouvillon stérile sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller Hinton (MH). L'écouvillon a été trempé dans la suspension bactérienne, puis il est essoré on le faire tournant sur la paroi interne de tube afin de le décharger au maximum. Le milieu MH a été frotté sur la totalité de leur surface gélosée de haut en bas, en stries serrés (Boughachiche *et al.*, 2005).

4.4. Technique des cylindres d'agar

Cette technique sert à mettre en évidence l'activité antibactérienne par la présence ou non d'une zone d'inhibition, et à quantifier cette activité par la mesure de diamètre de cette zone (en mm). Elle consiste à ensemencer des souches bactériennes après standardisation des suspensions sur le milieu Mueller- Hinton (MH) par étalement. Des cylindres de 8mm environ de diamètre sont coupés on utilisant une pointe de pipette puis placé sur des boites préalablement ensemencées par des bactéries tests (**Figure 16**). Les boites sont laissées à 4°C pendant 4 heures, pour permettre aux métabolites de diffuser sur le milieu puis incubées à 37°C pendant 24h (*Gungi et al., 1983 ,Madiganet al., 1997*).

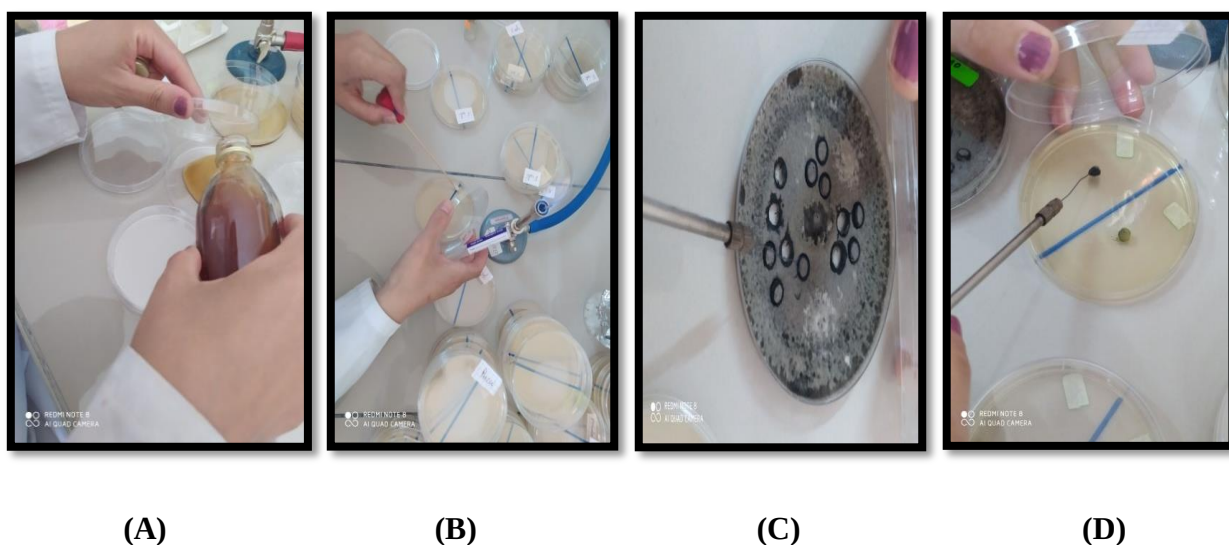


Figure 16:(A) : Coulage du milieu Mueller-Hinton en boites de Pétri ;(B) : Le ensemencer des souches bactériennes ;(C) : coupés des cylindres de 8mm ;(D) : Le cylindre placé sur des boites préalablement ensemencées par des bactéries tests (**Original**).

4.5. Techniques des disques et des puits

Ces deux techniques consistent à étudier l'effet des métabolites secondaires des souches fongiques diffusés dans un milieu de fermentation liquide.

a- Fermentation

La production des métabolites secondaires, par les souches antagonistes, et la mise en évidence de leur activité antibactérienne, a été effectuée selon le protocole de Dennis et Webster, (1971). Le milieu de fermentation utilisé pour cet objectif est le PDB (Potatoes dextrose broth)

(Annexe 1). Des flacons de 250 ml, contenant 100ml du milieu de culture, ont été inoculés par quatre disques de culture âgée de sept jours pour chaque souche, et incubées à 28°C pendant 14 jours **(Figure 17)**.

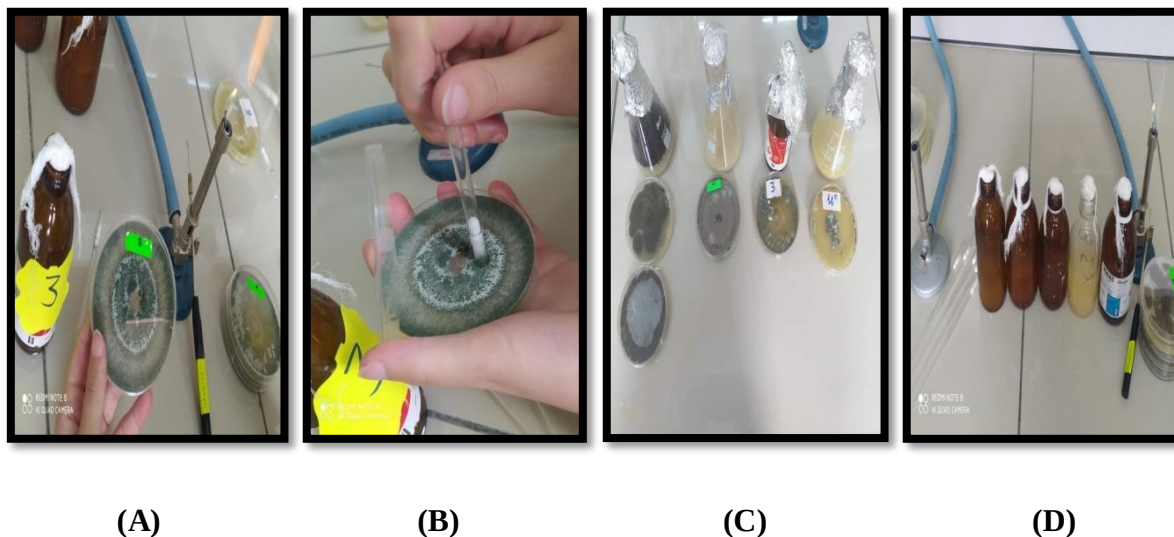


Figure 17 :(A) : La souche fongique utilisée ;(B), (C), (D): Des flacons ont été inoculés par quatre disques de culture âgée de sept jours pour chaque souche **(Original)**.

b- Extraction

Le principe de l'extraction par les solvants organiques se résume en une séparation du milieu de fermentation en deux phases ; une phase organique et une phase aqueuse et de faire passer les molécules bioactives dans la phase organique.

Après fermentation, et afin de tester l'activité antibactérienne des surnageant des cultures, les contenus des flacons de fermentation ont été filtrés à travers du papier Whattman N°1, afin de séparer le mycélium du milieu de culture supposant contenir les molécules bioactives (Figure 18) .Le surnageant supposé contenir les substances actives est mesuré et additionné d'un même volume de solvant (dichlorométhane) **(Figure 19)**. Après avoir bien mélangé, le mélange (surnageant+solvant) est versé dans des ampoules à décanter, donc la phase aqueuse va se séparer de la phase organique cette dernière est ensuite récupéré dans un b cher où elle est soit évaporé à température ambiante ou dans l'appareil rotatif évaporateur sous vide. Enfin et une fois sec, l'extract a été remis en suspension avec 1,5 ml du chloroforme et placé dans un flacon en verre (pour tester l'activité antibactérienne des souches fongiques).et conservées dans des tubes   4 C.



Figure 18: Filtration de surnageant (Original).

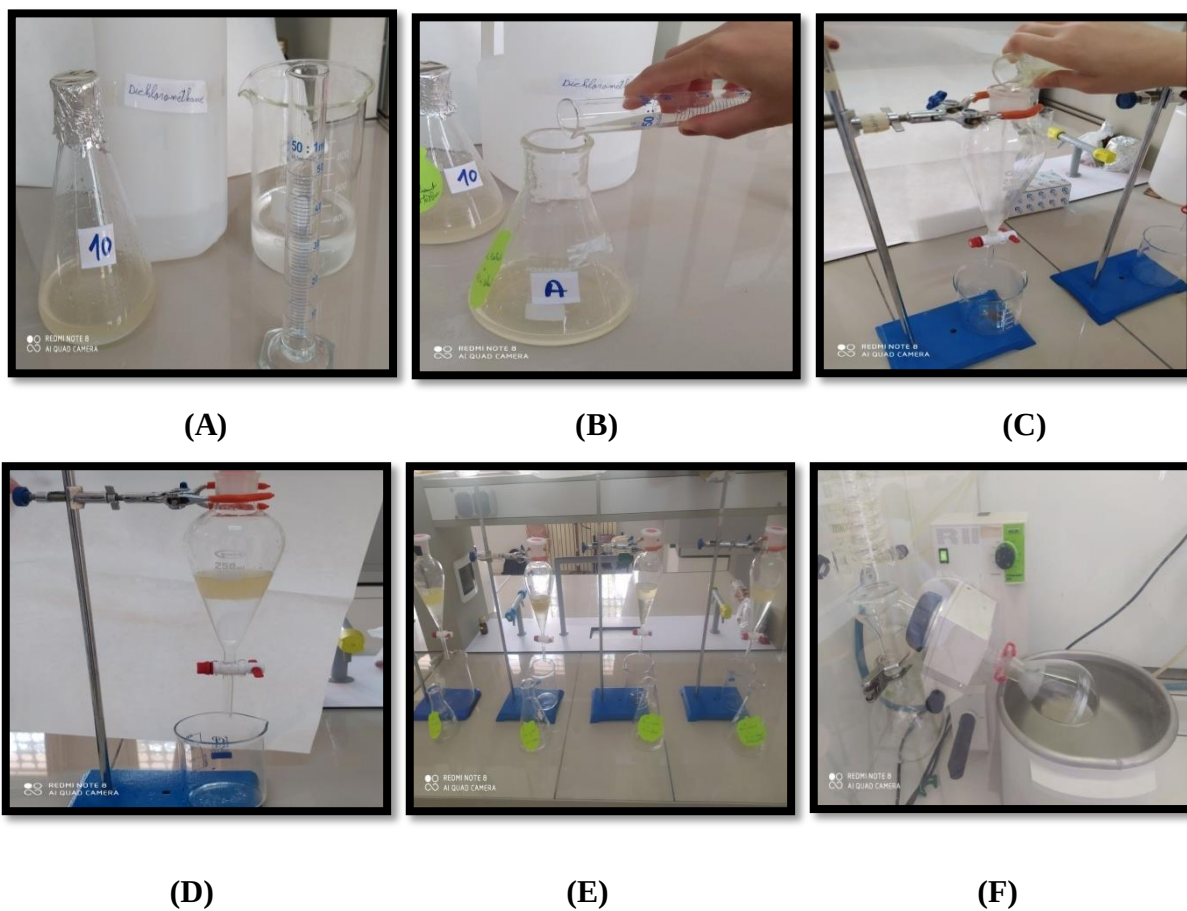


Figure 19 :(A), (B) : Le surnageant est mesuré et additionné d'un même volume de solvant ;(C) : le mélange (surnageant +solvant) est versé dans des ampoules à décanter ;(D),(E): La Séparation de la phase aqueuse et la phase ; (F) : Le mélange évaporé dans L'appareil rotatif évaporateur sous vide (Original).

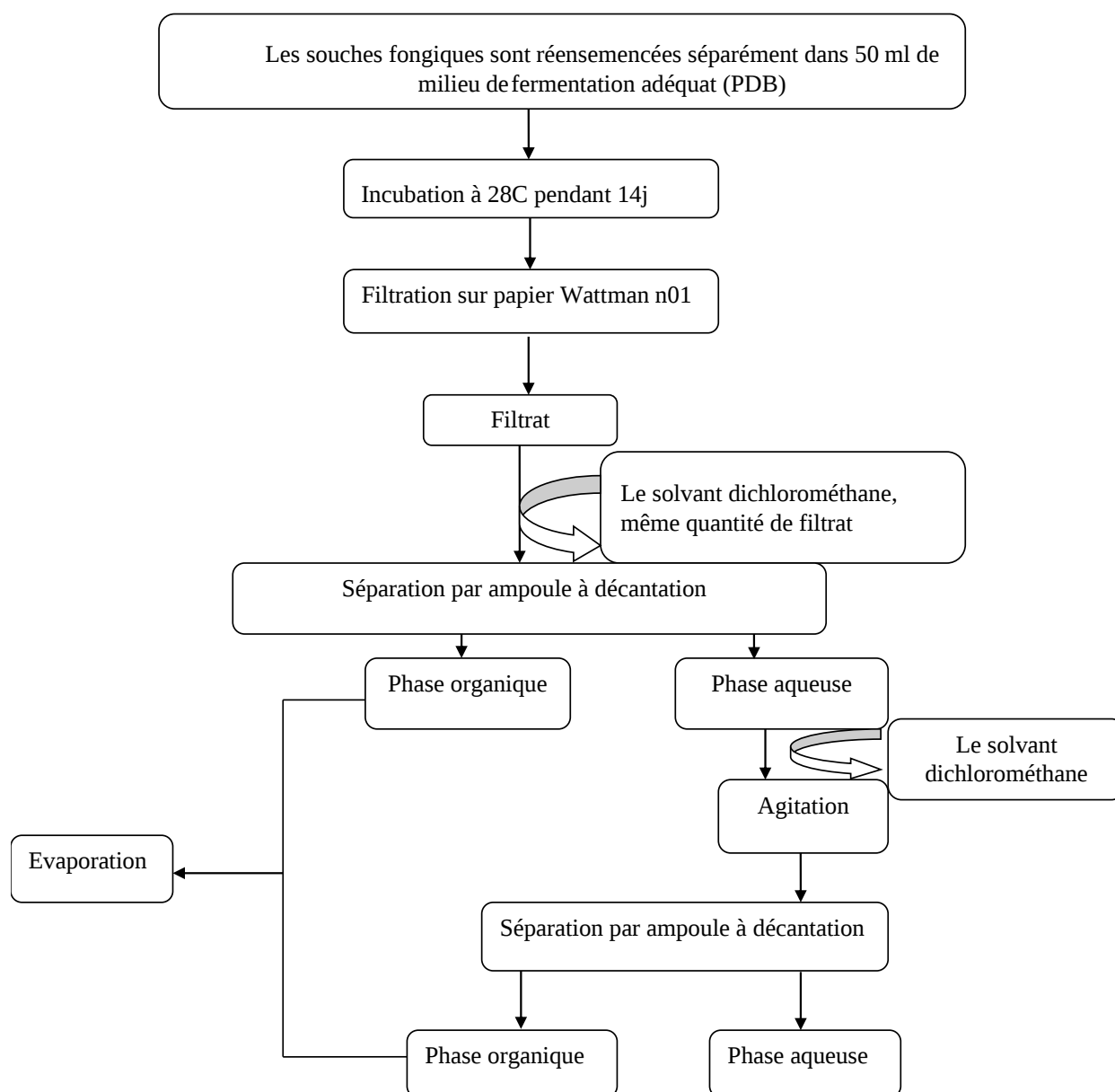


Figure 20: Extraction des métabolites secondaires fongiques bruts MSFB (Mohanta *et al.*, 2008 Barik *et al.*, 2010).

4.5.1. Technique des disques

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes.

Avant de commencer la techniques, des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à partir du papier Wattman N°1, et stérilisés. Les boites contenant le milieu Muller-Hinton ont été ensemencées par les bactéries à l'aide d'un écouvillon à partir d'une suspension bactérienne équivalente à 0.5 Mac Farland. Ensuite, les disques en papier sont chargés par 10µl des différents

extraits et séchés devant le bec, puis déposés sur la gélose (**Figure 21**). Les boîtes sont ensuite mises au réfrigérateur pendant 4h pour permettre la pré-diffusion des substances bioactives (**Tortorano et al., 1979**) ; puis incubées à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibitions sont mesurées, même s'ils sont de faible diamètre sont considéré comme résultat positif.



Figure 21: Technique des disques (Original).

4.5.2. Technique des puits

Cette technique consiste à perforer la gélose Muller-Hintonensemencée avec la bactérietest de façon à obtenir des puits.

Des boîtes de pétri contenant une couche de gélose Mueller-Hinton d'une épaisseur de 4 mm, sont préparées avec les bactéries tests. Après un séchage de 5 min, la gélose est perforée avec un cylindre en verre de 3 mm de diamètre stérile. Les puits préparés sont prêts pour recevoir un volume de 10µl du filtrat. Les boîtes sont ensuite laissées à température ambiante pendant 30 minutes, puis incubées à 37 °C (**Tortorano et al., 1979**).

La mesure des zones d'inhibition autours des puits est effectuée après 18 h à 24 h d'incubation (**Figure 22**).



Figure 22: Technique des puits (Original).

CHAPITRE IV:

Résultats et discussion



Ce travail porte sur la production des substances antibactériennes secrétées par des moisissures isolées à partir du sol d'une région proche de source thermale. En effet, les échantillons du sol utilisés pour cet objectif ont été prélevés du site Hammam Abdallah (Bouhama).

1. Isolement des moisissures du sol

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales d'échantillon de sol du hammam Abdallah (Bouhama) ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. Nous avons pu sélectionner 10 colonies que nous avons purifiées.

2. Identification des isolats

L'identification de ces isolats étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par les chercheurs (**Botton et al, 1990 ; Guiraud, 1998**), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques du mycélium et des conidies ou spores (cloisonnement du mycélium, forme des spores, forme des organes de fructification, etc).

2.1. Identification macroscopique

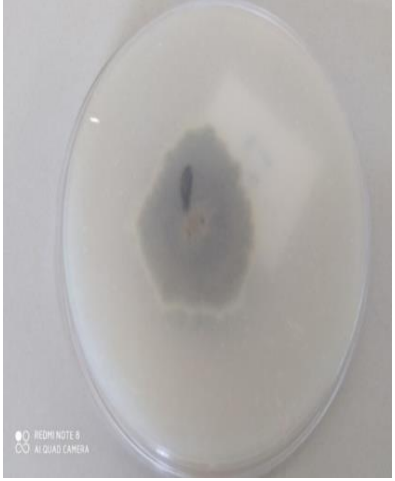
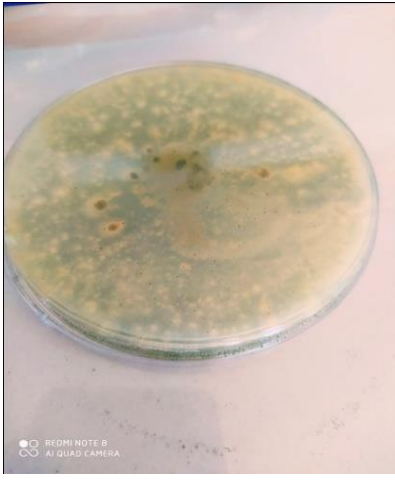
Les caractères macroscopiques des différentes souches de moisissures isolées et sélectionnées sont étudiés sur milieu gélosé PDA, l'un des milieux les plus fréquemment utilisés (**Botton et al, 1990**). L'étude macroscopique a été réalisée par l'observation, à l'œil nu, des caractères culturels (aspect de la colonie, couleur, revers des boîtes de Pétri., et la vitesse de la croissance ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.).

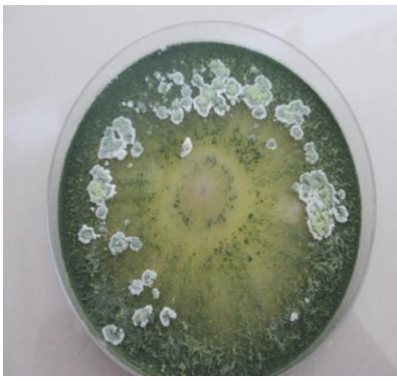
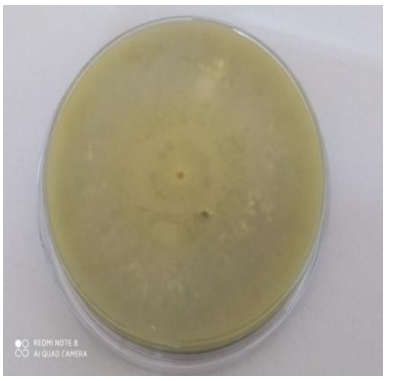
L'aspect macroscopique des souches fongiques a été étudié après sept jours d'incubation sur milieu PDA. Il a été constaté que les 10 souches présentent un développement plus ou moins lent avec des différences constatées dans l'aspect macroscopique de la colonie pour chaque souche.

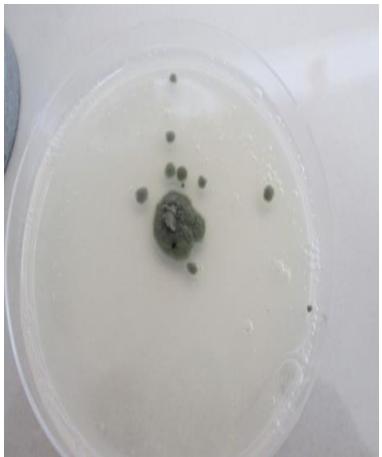
Le tableau regroupe les différents aspects macroscopiques des moisissures isolées.

Tableau 4 : Aspects macroscopiques des isolats fongiques obtenus.

Espèce	Description	Aspect macroscopique	
		Face	Revers
S1 <i>Aspergillus niger</i>	Couleur : Vert foncé à noir Colonie simple à croissance rapide sur milieu de PDA de 3 à 7 jours Aspect : Veloutée à poudreuse irrégulière Revers : pas de pigment jaune-vert.		
S2 <i>Aspergillus niger</i>	Couleur : noir Colonies : chargées de spores de couleur noir un thalle : à croissance rapide Aspect : velouté à poudreuse Revers : incolore		

S3 <i>Aspergillus niger</i>	Couleur : noir Foncé Colonies : chargées Aspect : velouté à Poudreuse Revers : noir foncé contour blanc		
S4 <i>Aspergillus flavus</i>	Couleur: Vert foncé Texture: tapie poudreuse, Veloutée Les colonies : duveteuses à Croissance très rapide Revers : pas de pigment		
S5 <i>Trichoderma sp1</i>	Couleur: Blanche au début puis Vert pistache Texture: tapie poudreuse Les colonies : duveteuses à Croissance très rapide Revers : pas de pigment		

S6 <i>Trichoderma</i> <i>sp2</i>	Couleur : bleu-vert foncé avec des lignes blanches Colonies : chargées Aspect : velouté à Poudreuse Vitesse de Croissance : très rapide Revers : incolore		
S7 <i>Trichoderma</i> <i>sp3</i>	Couleur : Vert au début de sporulation puis vire au Vert olive avec des taches blanches Vitesse de Croissance : très rapide Colonie multiple, granuleuse et sèche. Revers : pas de pigment	 	 

S8 <i>Trichoderma</i> <i>sp4</i>	Couleur: Vert pistache au début puis Vert olive contour blanc Texture: poudreuse, Veloutée Les colonies : duveteuses à Croissance très rapide, un thalle d'abord blanc puis vert olive. Revers : pas de pigment		
S9 <i>Cladosporium</i> <i>sp</i>	Couleur : grise foncé tourné par un cercle blanc Colonie : cratériforme plate et poudreuse. Vitesse de croissance : Lente à modérément rapide Aspect : veloutée ou floconneuse Revers : noir		
S10 <i>Alternaria</i> <i>sp</i>	Couleur: blanche au début puis grise Texture : Cotonneuse irrégulière Plissée Vitesse de Croissance : très rapide Revers : noir	 	 

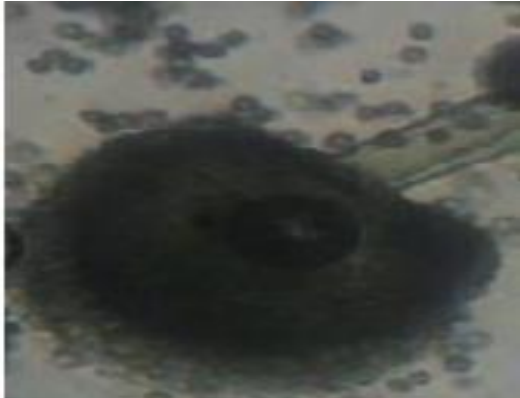
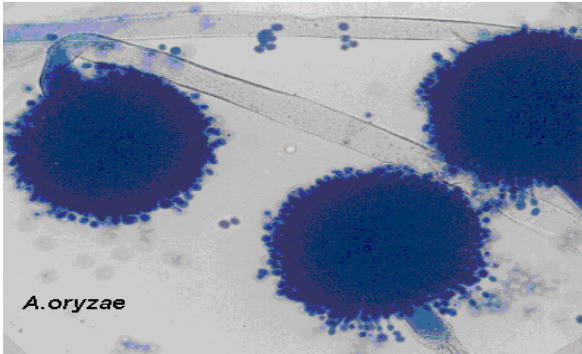
La comparaison de nos résultats de la caractérisation morphologique avec les clés d'identification ont permis de déterminer le genre de chaque isolat, et de rapprocher à l'espèce pour d'autres cas. En effet, l'identification phénotypique est insuffisante pour la détermination de certaines espèces de champignons filamenteux, il y a des tendances aujourd'hui à développer des méthodes plus rapides d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (identification génétiques) (Almi, 2016).

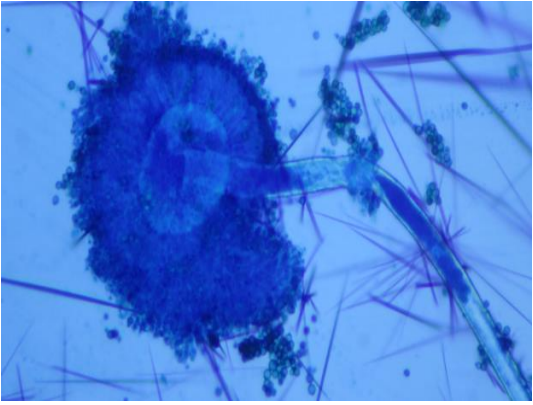
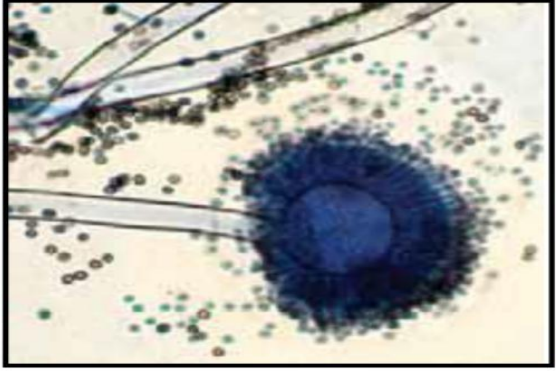
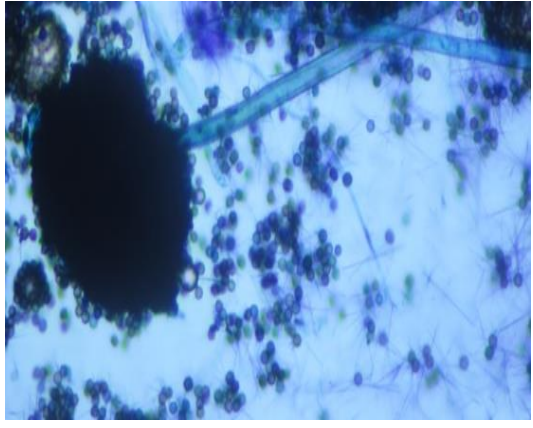
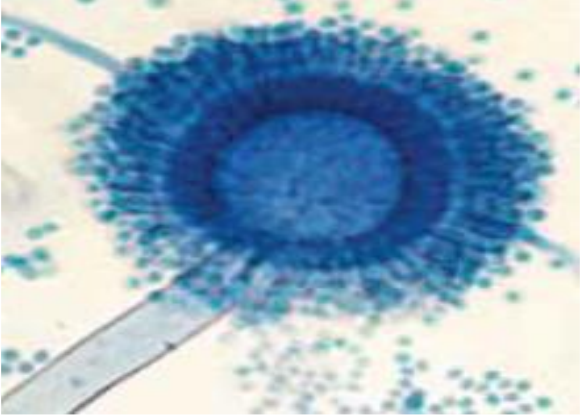
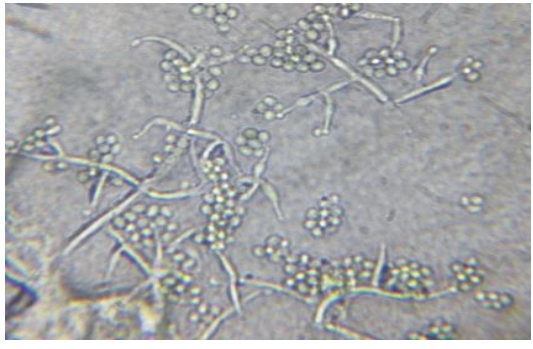
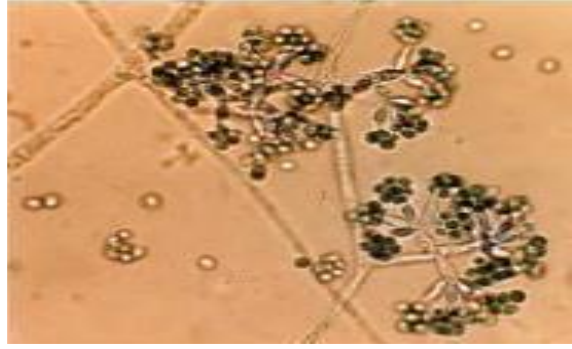
2.2. Identification microscopique

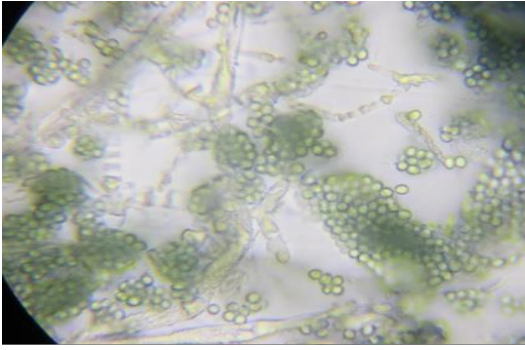
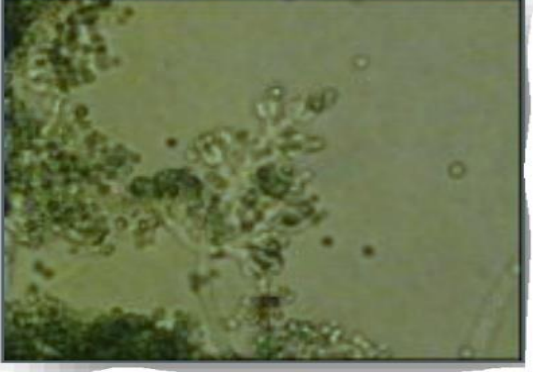
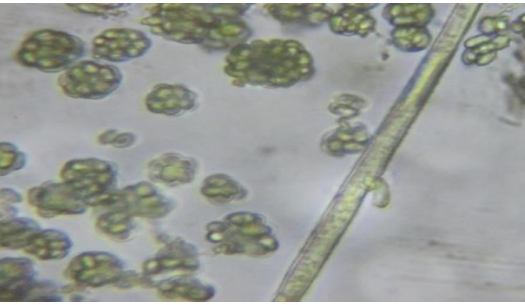
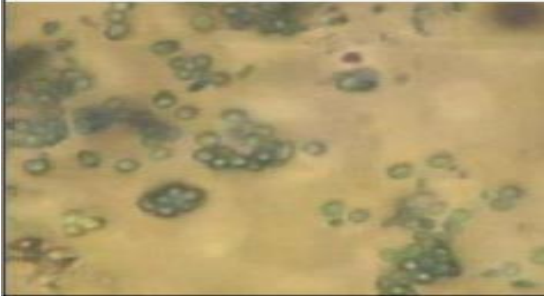
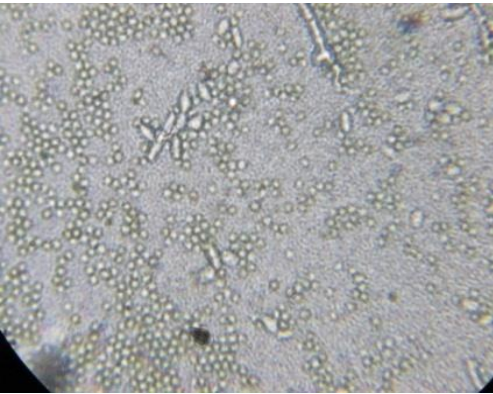
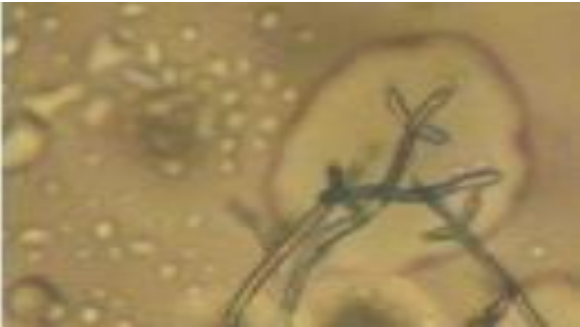
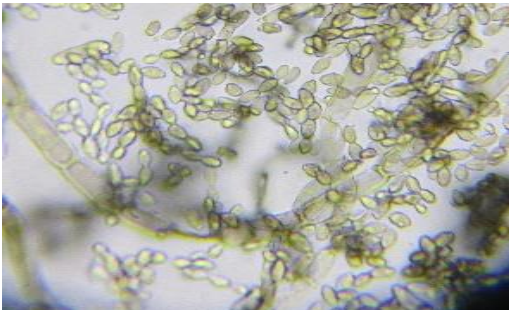
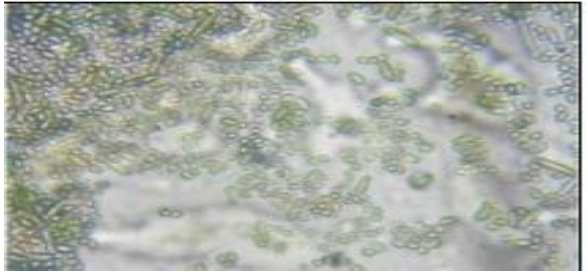
L'étude microscopique permet de compléter les informations fournies par les observations macroscopiques. Elle porte sur l'observation des structures caractéristiques des souches fongiques isolées ont été soumises à une identification microscopique réalisée par une observation au grossissement X40 et X100 (Cette identification étant fondée essentiellement sur l'étude morphologique de mycélium ; absence ou présence de cloisons, couleur, différenciation) et des spores (forme, couleur, texture de parois).

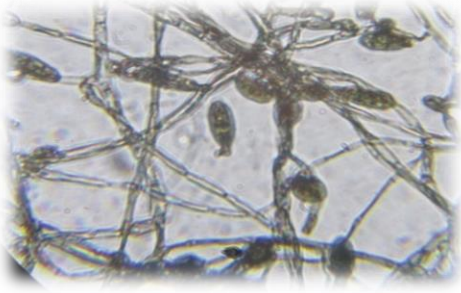
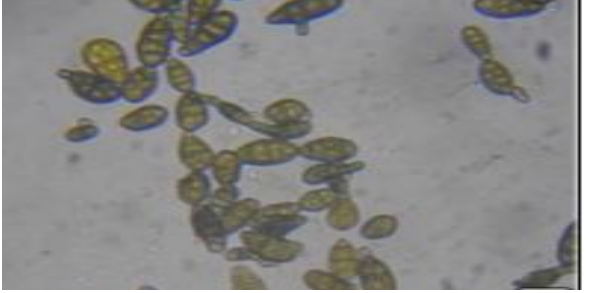
Les résultats observés ont permis de noter 04 genres de moisissures (*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma* et *Alternaria*) qui sont rassemblés dans le (tableau 5) ci-dessous.

Tableau 5: Aspects microscopiques des isolats fongiques obtenus.

Espèce	Aspect microscopique	Photo référence
S1 <i>Aspergillus niger</i>		 <i>A.oryzae</i> (Chabasse <i>et al.</i> , 2002)

S2 <i>Aspergillus niger</i>		 (TABUC ,2007)
S3 <i>Aspergillus niger</i>		 La tête de conidie Wilh (Raper et al., 1965)
S4 <i>Aspergillus flavus</i>		 (Chabasse et al., 2002)
S5 <i>Trichoderma sp1</i>		 (Benhamou N, 1997)

S6 <i>Trichoderma</i> <i>sp2</i>		 (Chabasse <i>et al</i>, 2002)
S7 <i>Trichoderma</i> <i>sp3</i>		 (Ghorri 2016)
S8 <i>Trichoderma</i> <i>sp4</i>		 (Ghorri 2016)
S9 <i>Cladosporium</i> <i>sp</i>		 (Benlamodi 2016)

S10 <i>Alternaria</i> sp		 (Benlamoudi 2016)
--	---	--

L'isolement à partir du sol du site Hammam Abdallah (Bouhama). Obtenus montrent l'existence d'une flore fongique plus ou moins variée de 10 isolats fongiques appartenant à 4 genres : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Alternaria*.

❖ **4 souches décrites par les caractéristiques suivantes :**

- Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule
- Des conidies produites par des phiales (Phialides) formées directement sur la vésicule ou sur des métules
- Têtes conidiennes unisériées ou bisériées
- Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires

Par ces caractères, ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

❖ **4 souches présentent les caractéristiques suivantes :**

- Thalle à croissance rapide
- Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit
- Des phialides en forme de quille, en verticilles sur des conidiophores ramifiés à angle droit ou sur leurs branches latérales
- Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides

Ces souches semblent appartenir au genre *Trichoderma*

❖ **1 souche caractérisée par:**

- Conidies elliptiques possédant une ou plusieurs cloisons, lisses ou verruqueuses d'insertions souvent bien visibles de phytopathogènes

- Les Toxinogène à cylindriques simples ou avec des cicatrices d'insertion souvent bien visibles.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Cladosporium*

❖ 1 souche caractérisée par:

- Les conidiophores sont bruns, septes et ont souvent l'aspect de « zigzags ». Ils portent des conidies simples ou ramifiées.
- Les conidies présentent des cloisonnements transversaux et longitudinaux.
- Des tubes germinateurs peuvent également être observés à la surface des conidies principaux moisissures allergisants (Criquet *et al.*, 2008).

Ces critères rejoignent ceux du genre *Alternaria*

L'analyse des résultats montre, par ordre décroissant, que le genre majoritaire est *Aspergillus* et *Trichoderma* avec une fréquence de 40 %, Selon Dendouga *et al.*, (2016), la présence de *Trichoderma* spp est associée à un taux de matière organique élevé et une faible salinité. Suivie du genre *Cladosporium* avec un pourcentage de 10 %, le genre *Alternaria* avec un pourcentage de 10 % (Figure 23).

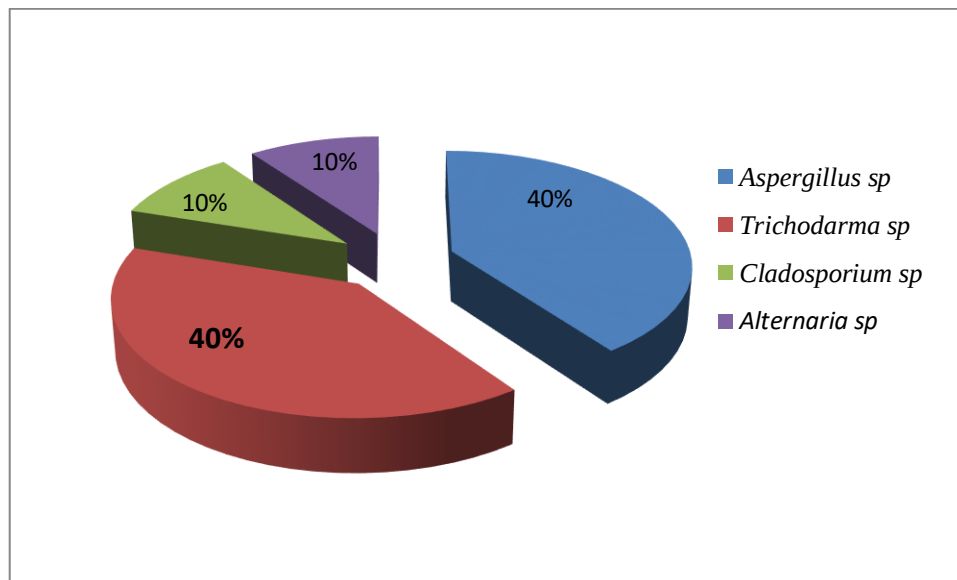


Figure 23: Genres fongiques isolés du sol de Hammam Abdallah (Bouhama).

Ces genres fongiques sont présents dans la majorité des sols de toutes natures, Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2002 et Boiron en 1996 ont déclaré qu'*Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria* et *Cladosporium* sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains.

Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, il peut être influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark et Zarnoch, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler et Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000).

Nos résultats sont donc en concordance avec ceux de Abdelaziz en 2006, qui a pu isoler le genre *Aspergillus* majoritairement avec une fréquence de 37.5% regroupant 6 espèces différentes dont : *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, à partir du sol aride et avec une fréquence de 42.85% à partir d'un autre sol de Chegga.

3. Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des moisissures a été largement décrite in vitro dans plusieurs études. Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 4/10 espèces vis-à-vis de quatre bactéries tests (*Escherichia coli* ATCC 11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853(Gram-), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus cereus* ATCC 10987 (Gram+).

La plupart des isolats ont développé une activité antibactérienne au moins sur une des bactéries tests. En effet une zone de lyse de taille différente autour des disques déposés a été mise en évidence (Figure 24). La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse (mm).

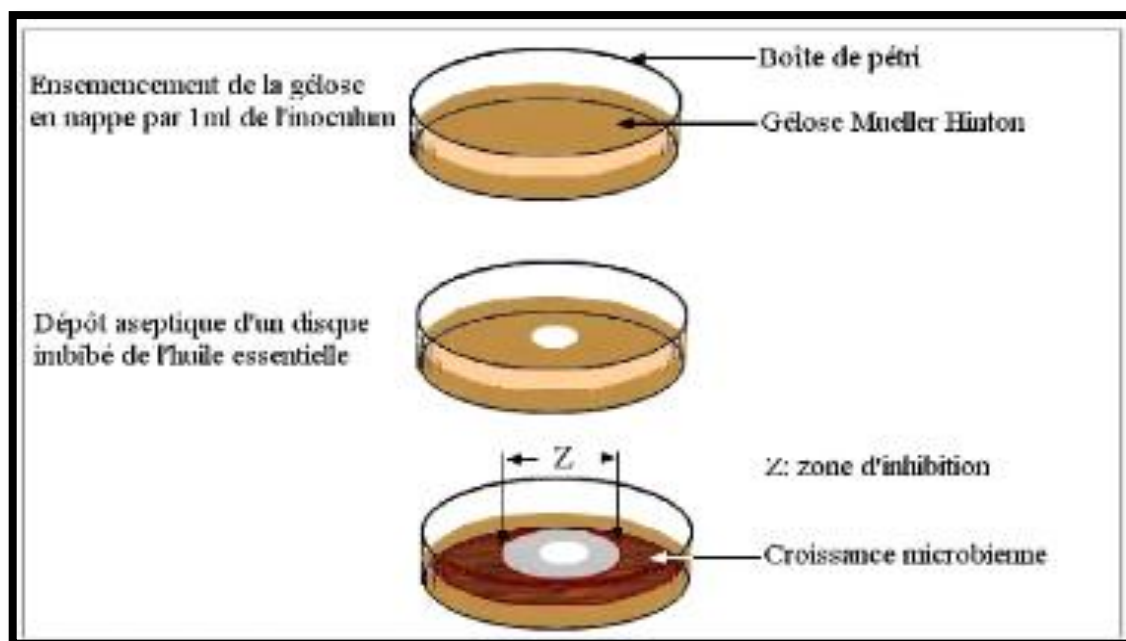


Figure 24: Résultats attendus après réalisation des tests par la méthode des disques.

L'activité antibactérienne contre les quatre bactéries a été évaluée en observant la zone d'inhibition de la croissance d'espèces testées en contact de nos souches (*Aspergillus niger*, *Trichoderma sp*, *Alternaria sp* et *Cladosporium sp*) en utilisant les 3 techniques (**Technique des cylindres d'agar, la technique des Disques, la technique des puits**) les diamètres d'inhibition relevés sont regroupés dans les tableaux ci- dessous.

Les résultats sont symbolisés par les signes suivant la sensibilité des souches vis-à vis des extraits testés :(-) : résistant ($\emptyset < 08\text{mm}$), (+) : sensible ($09 < \emptyset < 14 \text{ mm}$), (++) : Très sensible ($15 < \emptyset < 19 \text{ mm}$) et (+++) : excrément sensible ($\emptyset > 20$).

3.1. Technique des cylindres d'agar

Tableau 6 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des cylindres d'agar.

N°d'isolat	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition $\emptyset$ (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B.cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	—	—	—	—
2	<i>Trichoderma sp 2</i>	—	—	—	—
3	<i>Alternaria sp</i>	—	—	—	+
4	<i>Trichoderma sp 3</i>	—	+	++	+

Le test d'antagonisme par la technique des cylindres d'agar a montré la capacité des quatre souches du genre *Aspergillus* et *Trichoderma*, *Alternaria* à produire des substances biologiques actives à effet antibactérien sur quatre bactéries tests.

L'apparition d'une zone translucide autour des cylindres d'agar permet, après incubation, de déceler la présence des métabolites fongiques qui inhibent la croissance des bactéries tests.

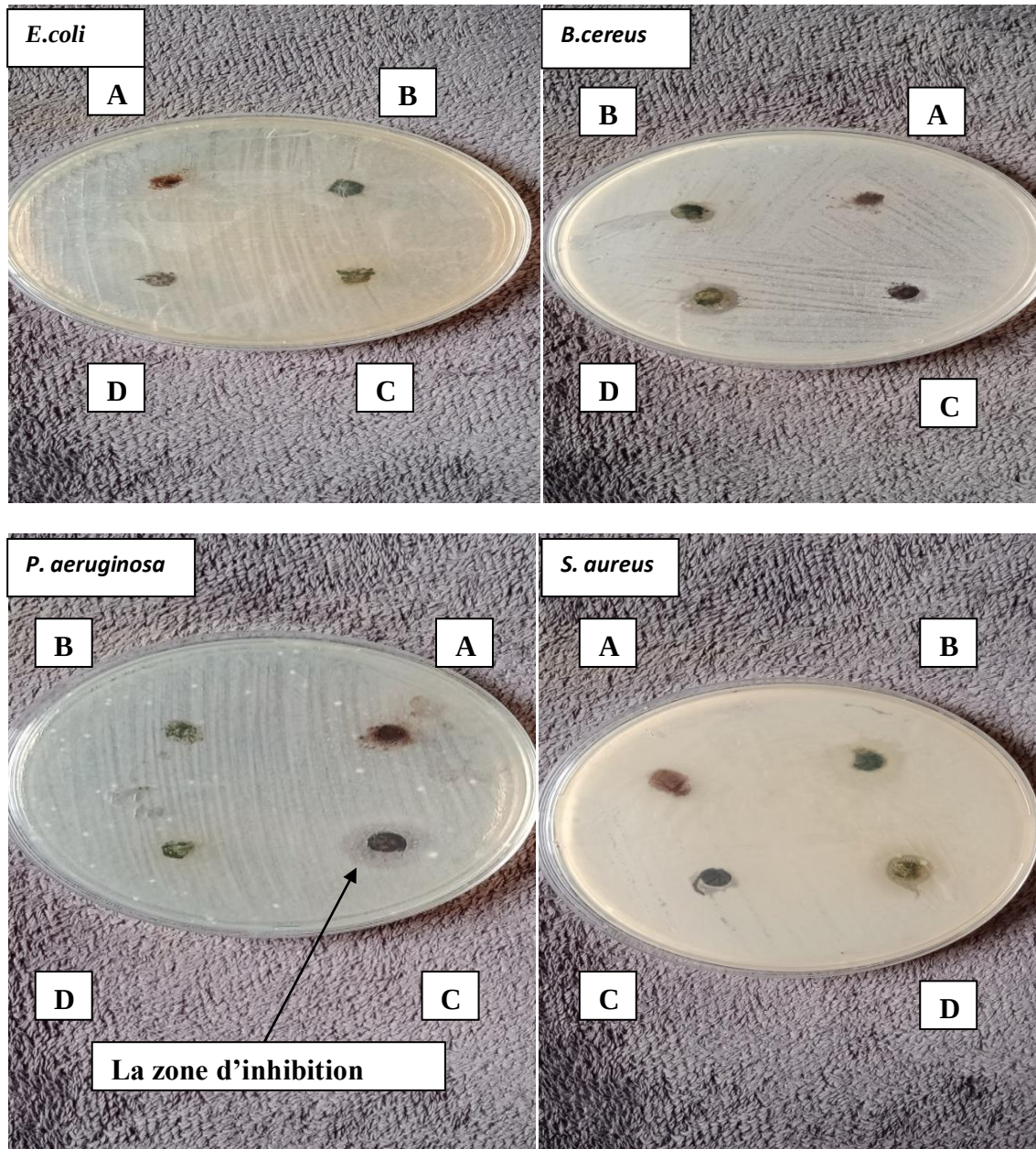


Figure 25: Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la technique des cylindres d'agar : *Escherichia coli* ; *Bacillus cereus* ; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus*.

(A) : *Aspergillus niger*

(B) : *Trichoderma sp 2*

(C) : *Alternaria sp*

(D) : *Trichoderma sp 3*

➤ **La souche *Aspergillus niger***

Après l'incubation les résultats du test de l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus niger* ont été négatifs avec les trois bactéries *E.coli* , *S.aureus* et *P.aeruginosa* par

ailleurs, un résultat positif a été obtenu avec *Bacillus cereus* ; donc en revanche *Bacillus cereus* a montré une sensibilité uniquement avec *Aspergillus niger* avec l'observation de zone d'inhibition de 7mm (**Figure 26**).

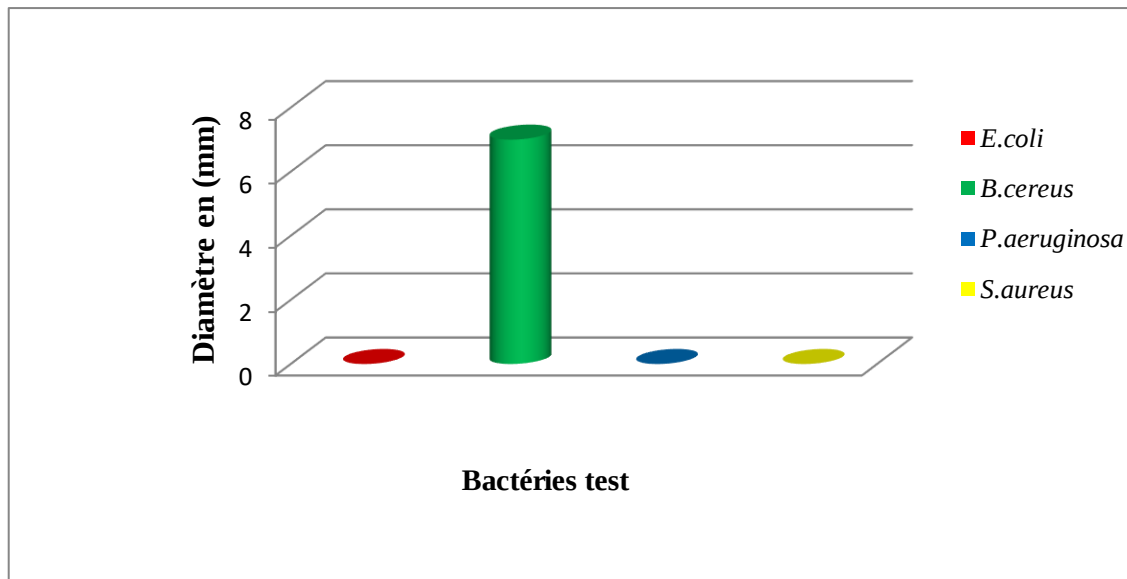


Figure 26: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche *Aspergillus niger* par la technique de cylindre agar.

➤ La souche *Trichoderma sp2*

Les zones d'inhibition les plus fortes ont été observées contre *S. aureus* avec des diamètres de 7 mm pour la souche fongique *Trichoderma sp2*, après de moins fort été observées contre *Bacillus cereus* avec des diamètres de 6 mm.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée avec les deux souches testées *E. coli* et *P.aeruginosa*. (**Figure 27**).

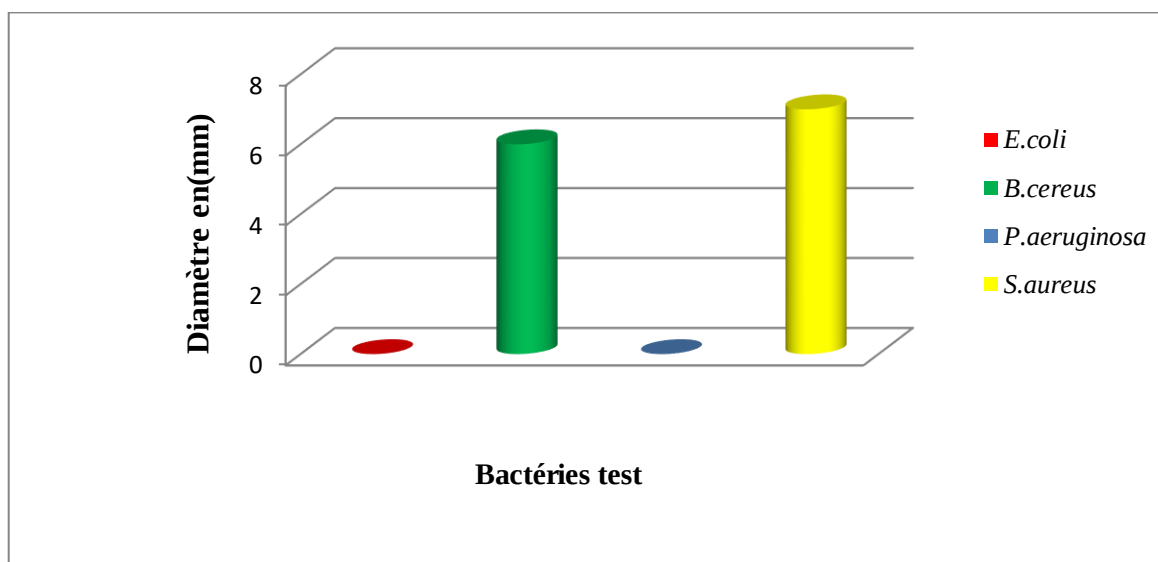


Figure 27: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Trichodarma* *sp2* par la technique de cylindre agar.

➤ **La souche *Alternaria* sp**

La souche *Alternaria* sp, à montré un grand effet contre *Bacillus cereus* et *S. aureus* avec une zone de lyse égale à 8mm ; 9mm successivement.

Une absence totale d'activité antibactérienne vis-à-vis *E. coli* et *P.aeruginosa* (**Figure 28**).

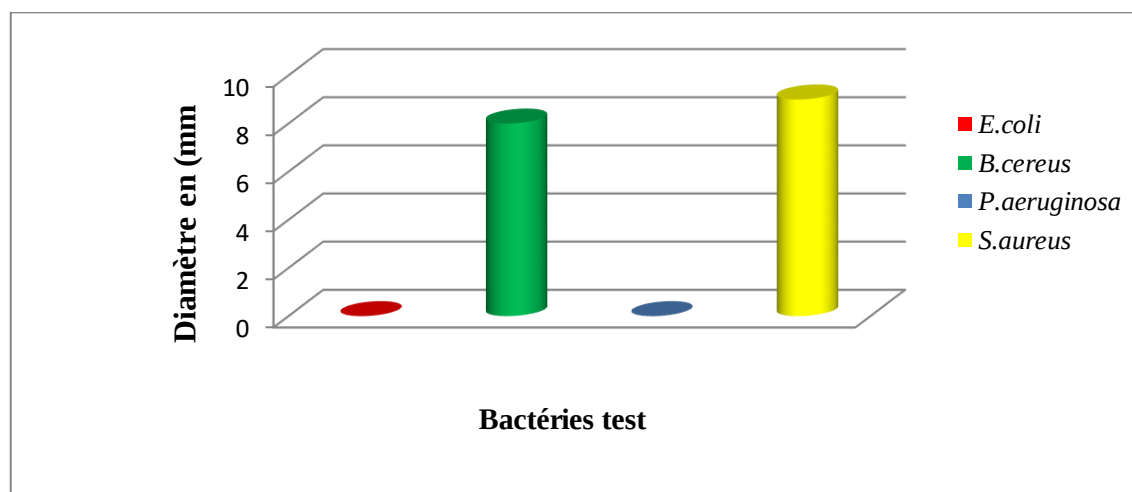


Figure 28: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Alternaria* sp par la technique de cylindre agar.

➤ La souche *Trichoderma sp₃*

Pour la souche *Trichoderma sp₃*, la plus grande activité a été enregistrée ou elle a donné une zone d’inhibition de 15 mm vis-à-vis de *P.aeruginosa*. Aussi présentent un pouvoir antibactérien le plus important avec une zone d’inhibition d’un diamètre de 13mm vis-à-vis *S. aureus* et de 12mm contre *B. cereus*.

Aucune zone d’inhibition n’a été observée avec la souche testée *E. coli*. (**Figure 29**).

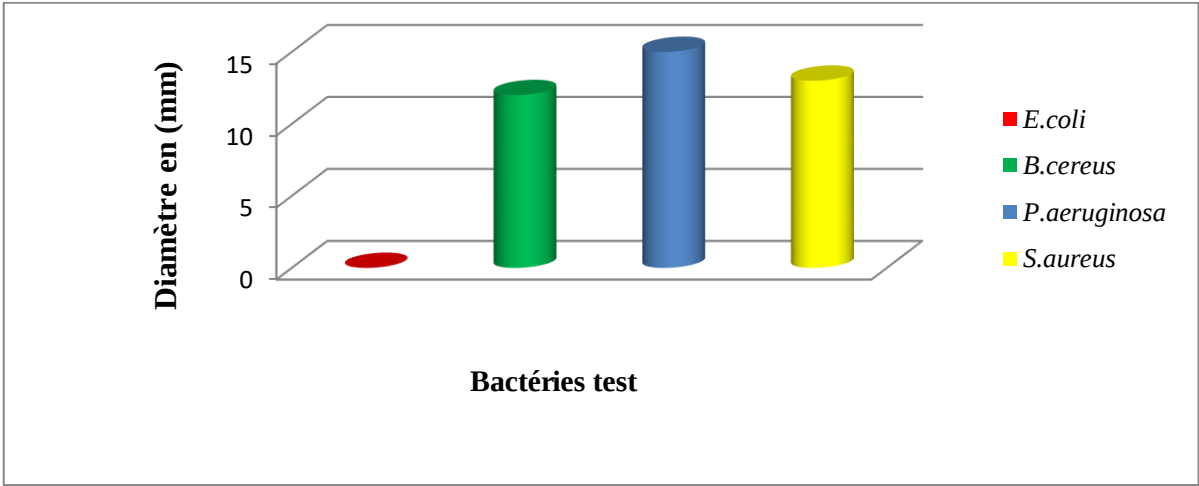
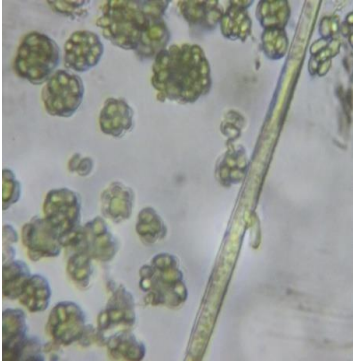


Figure 29: Mise en évidence de l’activité antibactérienne de la souche du genre *Trichoderma sp₃* par la technique de cylindre agar.

❖ Identification de la souche active

Tableau 7 : Aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.

Face de la souche	Revers de souche	Sous microscopie	souche
			<i>Trichoderma sp₃</i>

3.2. La technique des disques

Le test de l'activité antibactérienne des extraits obtenus consiste à rechercher leurs effets antagonistes sur le développement des espèces bactériennes.

Après la diffusion des composés antibactériens sur gélose, des zones d'inhibition différentes apparues sur les boîtes (**Figure 30**). Le tableau au -dessus présente les différents diamètres.

Tableau 8 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des Disques.

N°d'isolat	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	++	—
2	<i>Trichoderma sp₂</i>	—	—	—	—
3	<i>Alternaria sp</i>	—	—	—	—
4	<i>Trichoderma sp₃</i>	+	+	+++	+

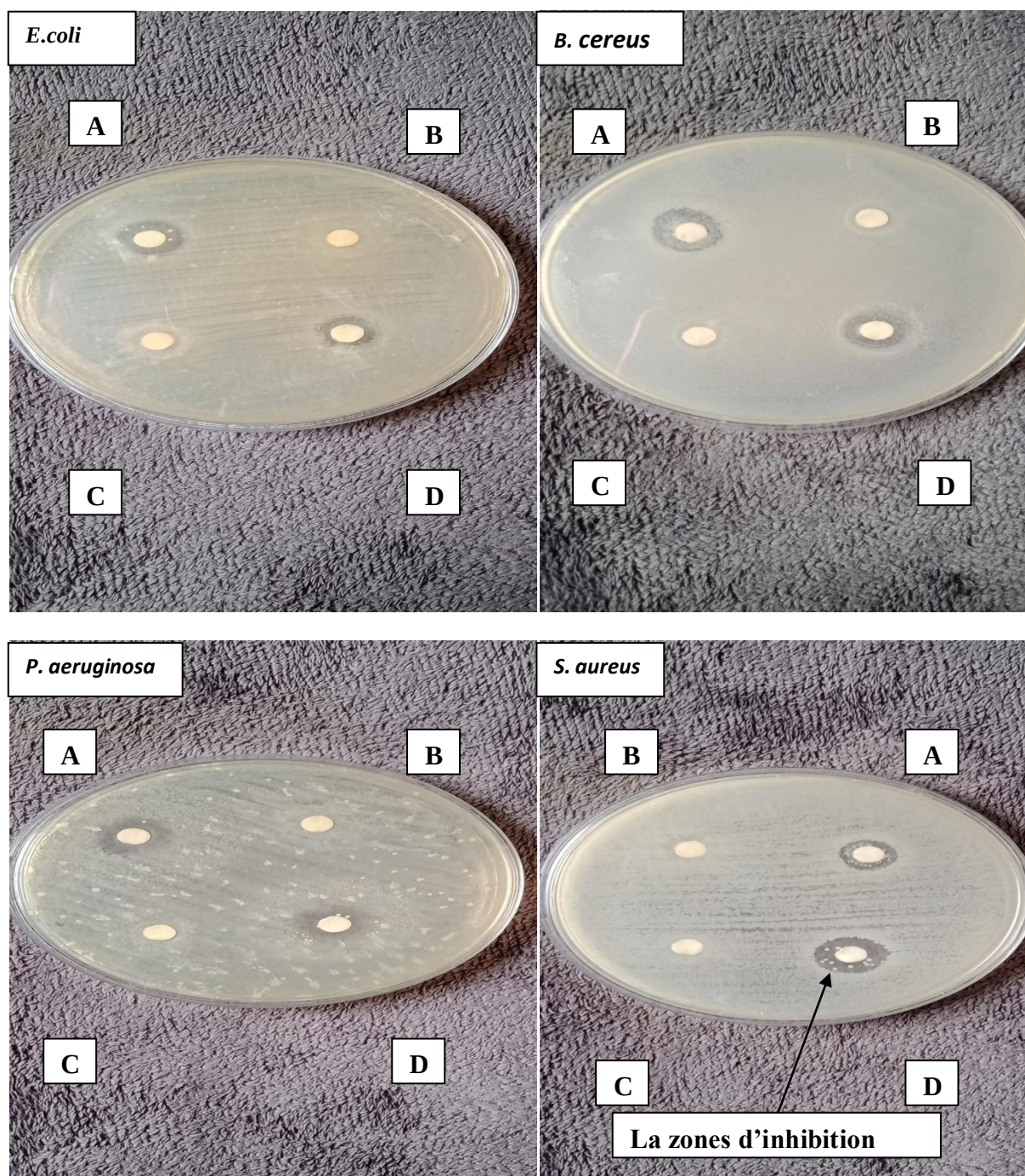


Figure 30: Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la technique des Disques :
Escherichia coli ; *Bacillus cereus*; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus*.

(A) : *Aspergillus niger*

(B) : *Trichoderma sp₂*

(C) : *Alternaria sp*

(D) : *Trichoderma sp₃*

➤ La souche *Aspergillus niger*

Après un jour d'incubation, on a observé l'apparition d'une zone claire autour des disques, imbibés par l'extrait bioactif d'*Aspergillus niger*, dont le diamètre de la zone d'inhibition diffère selon la souche testée. Le diamètre le plus grand est dans le cas de *Pseudomonas aeruginosa* (15mm), suivie le cas de *E. coli* (12mm), le petit est dans le cas de *B. subtilis* (10mm) et *S. cereus* (10 mm) (**Figure 31**).

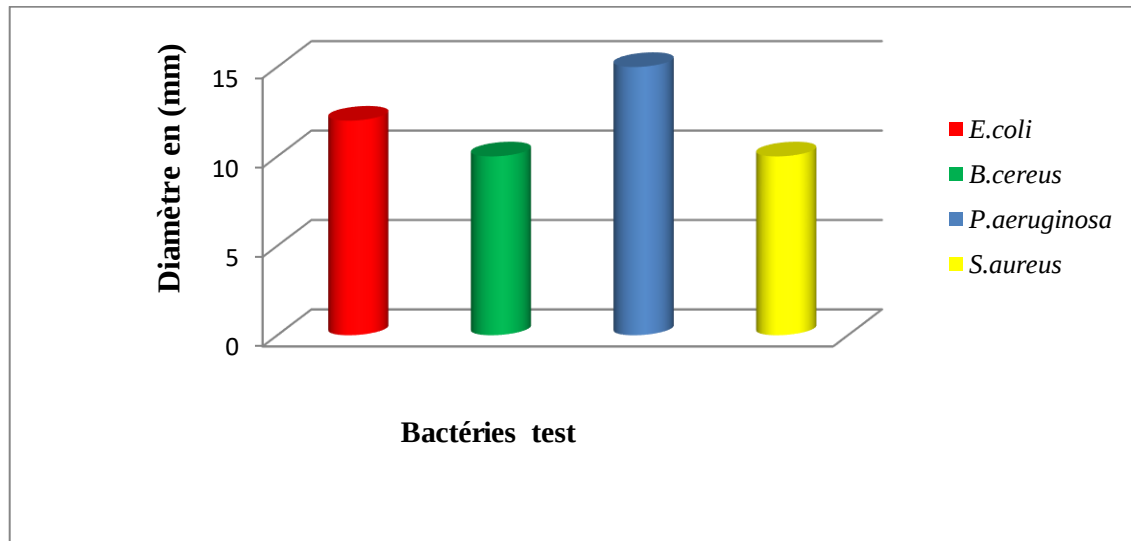


Figure 31: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Aspergillus niger* par la technique des disques.

➤ La souche *Trichoderma sp2*

D'après les résultats mentionnés dans la figure 32, le filtrat de la souche *Trichoderma sp2* a donné une zone d'inhibition de 6 mm de diamètres avec les trois souches testés *E coli* ; *B. cereus*; *S.aureus*. Mais avec la bactérie *P. aeruginosa* aucun effet n'a été observé (**Figure 32**).

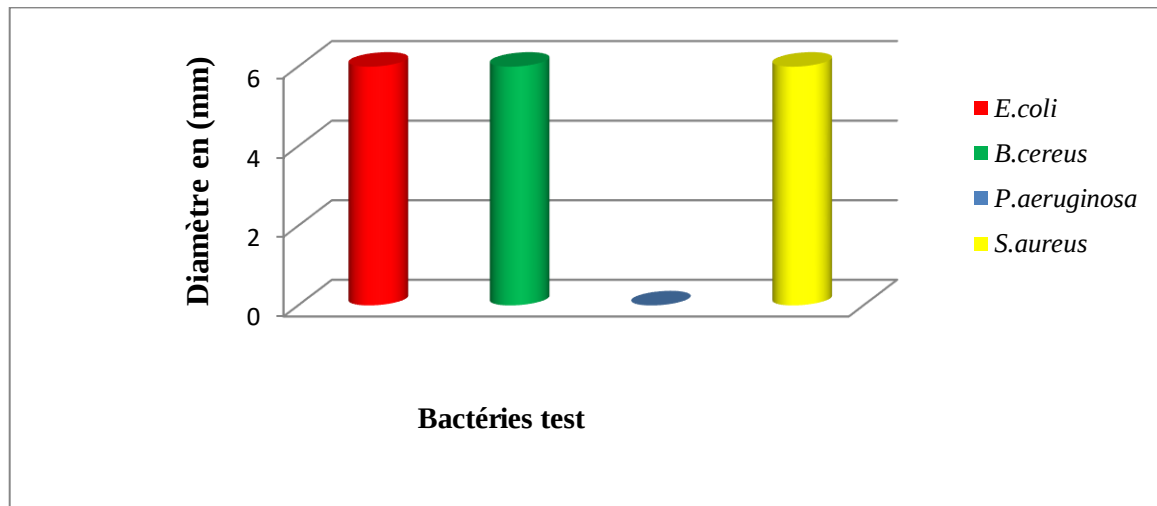


Figure 32: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Trichodarma* *sp*₂ par la technique des disques.

➤ **La souche *Alternaria* sp**

Pour la souche *Alternaria* sp, la plus grande activité a été enregistrée ou elle a donné une zone d'inhibition de 8 mm vis-à-vis de *P. aeruginosa*. Aussi présente un pouvoir antibactérien faible avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 8 mm vis-à-vis *E. coli* et *B. cereus*.

Aucune zone d'inhibition n'a été observée avec la souche testée *S. aureus* (**Figure 33**).

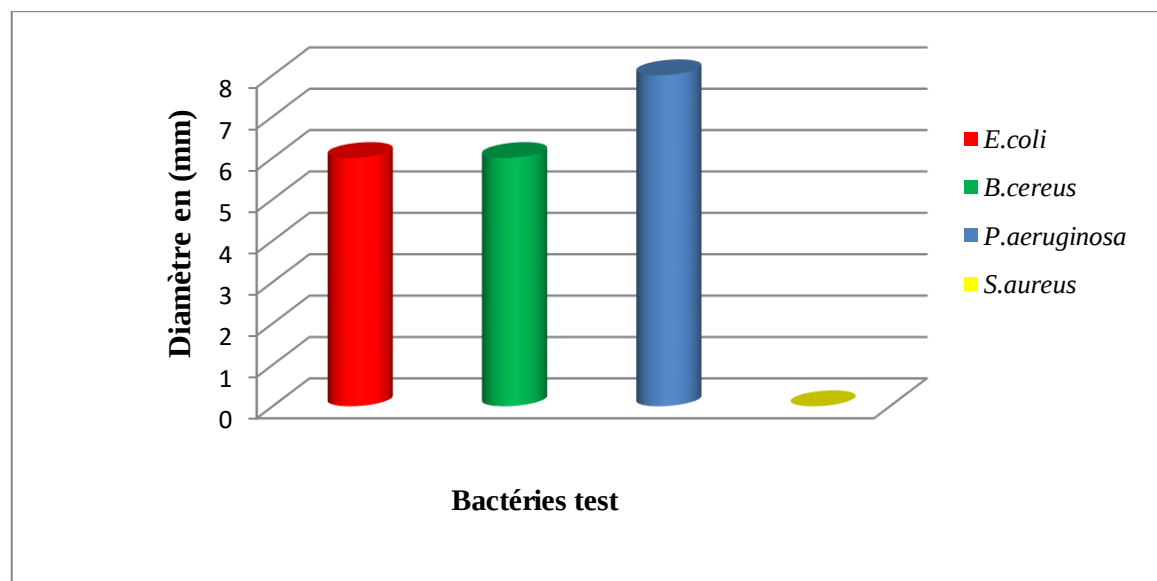


Figure 33: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Alternaria* par la technique des disques.

➤ La souche *Trichoderma sp3*

Pour la souche *Trichoderma sp3*, la plus grande activité a été enregistrée vis-à-vis la souche *P.aeruginosa* qui a donné une zone d'inhibition de 20 mm.

Présente un pouvoir antibactérien le plus important avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 14 mm vis-à-vis de *S. aureus* et 13 mm contre la souche *B.cereus*. Et à faible effet antibactérien contre *E. coli* avec une zone de lyse de 10 mm (**Figure 34**).

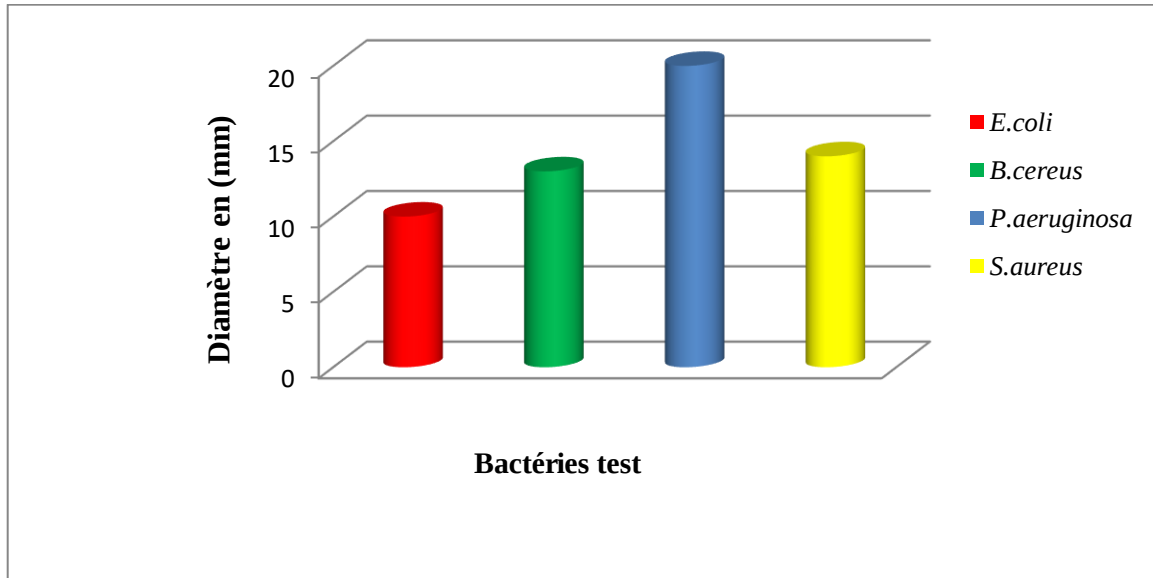
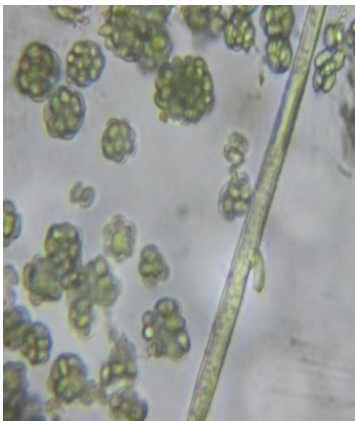


Figure 34: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Trichoderma sp3* par la technique des disques.

❖ Identification de la souche active

Tableau 9 : Aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.

Face de la souche	Revers de souche	Sous microscopie	Souche
			<i>Trichoderma sp3</i>

3.3. La technique des puits

La première remarque qui peut être soulevée est que les résultats de la technique des puits n'étaient pas en corrélation avec ceux obtenus par la technique des disques.

Pour cette technique, les résultats montrent que seuls les filtrats des deux souches *Aspergillus niger* et *Trichoderma sp₃* présentent une activité antibactérienne.

Après la diffusion des composés antibactériens sur gélose, des zones d'inhibition différentes apparues sur les boîtes (**Figure 35**). Le tableau au -dessus présente les différents diamètres.

Tableau 10 : Résultats de l'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des puits.

N°d'isolat	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B. cereus</i>	<i>P. saeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	++	+	+	+
2	<i>Trichoderma sp 2</i>	—	—	—	—
3	<i>Alternaria sp</i>	—	—	—	—
4	<i>Trichoderma sp 3</i>	+	+	+	+

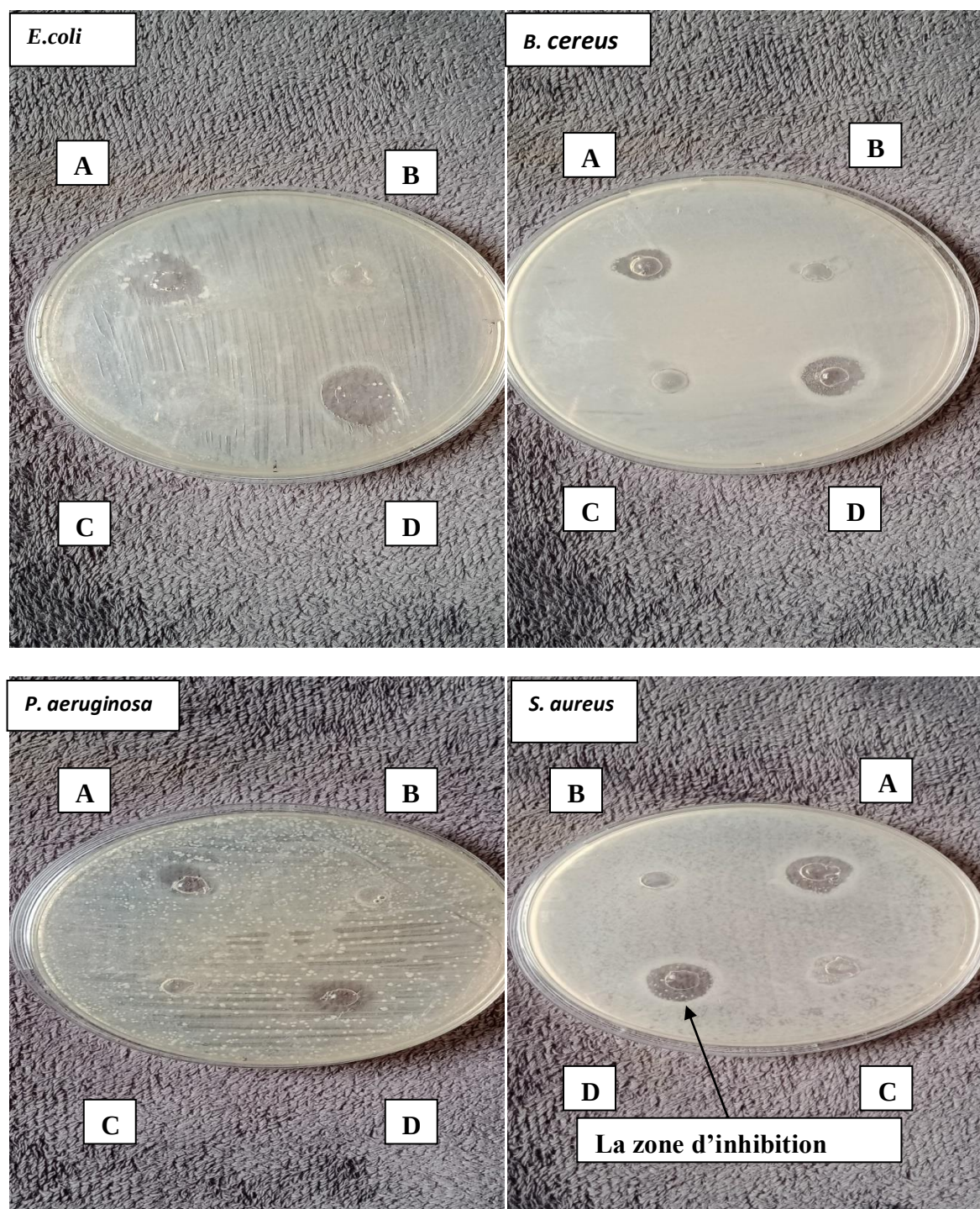


Figure 35: Activité antibactérienne des quatres souches fongiques par la technique des puits:

Escherichia coli ; *Bacillus cereus*; *Pseudomonas aeruginosa* ; *Staphylococcus aureus*.

(A) : *Aspergillus niger*

(B) : *Trichodarma sp₂*

(C) : *Alternaria sp*

(D) : *Trichodarma sp₃*

➤ La souche *Aspergillus niger*

Les résultats montrent qu'il y'a un effet d'inhibition de la souche *Aspergillus niger* avec des diamètres qui varient entre (13-17 mm). Les diamètres les plus importants sont (17mm) pour *Escherichia coli* et (13mm) pour *P. aeruginosa* ; *S. aureus*.

La souche *Aspergillus niger* présente un pouvoir antibactérien important avec une zone d'inhibition d'un diamètre de 11mm vis-à-vis *B. cereus* (**Figure 36**).

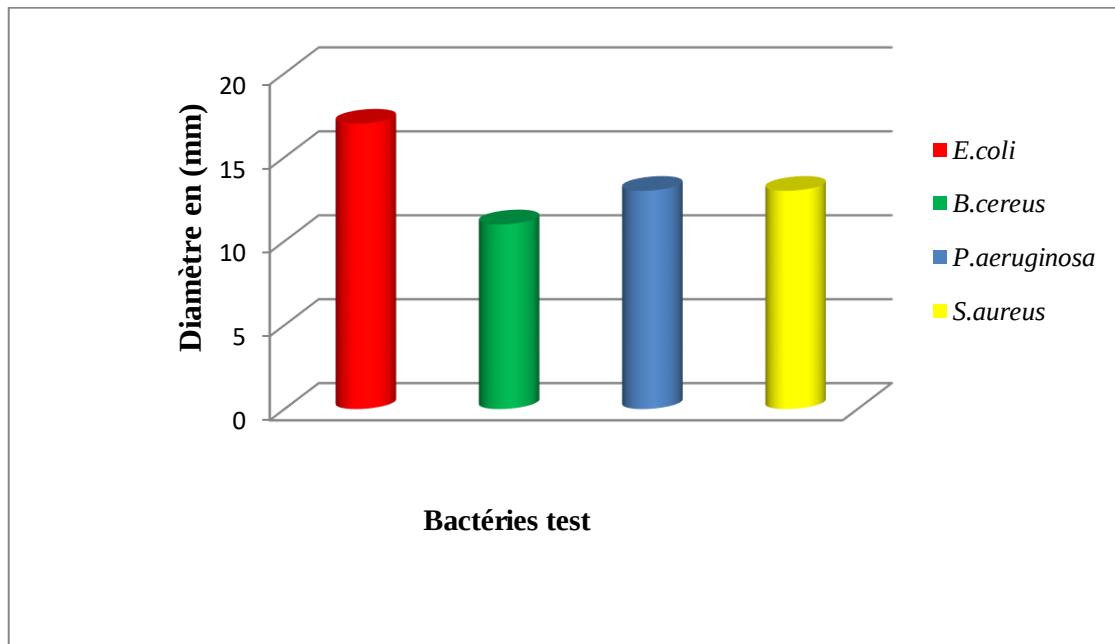


Figure 36: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Aspergillus niger* par la technique des puits.

➤ La souche *Trichoderma sp2*

Une absence totale d'activité antibactérienne de la souche *Trichoderma sp2* vis-à-vis *E. coli* ; *B. cereus* ; *P. aeruginosa* ; *S. aureus* (**Figure 37**).

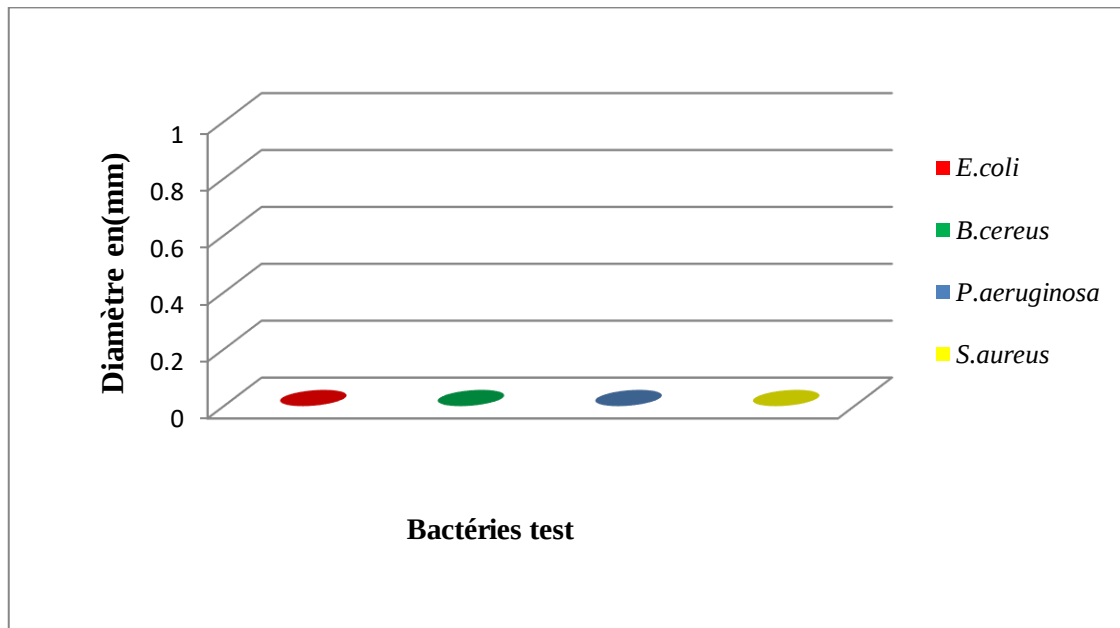


Figure 37: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche du genre *Trichodarma sp₂* par la technique des puits.

➤ La souche *Alternaria sp*

Les résultats obtenus montrent qu'à partir de l'extrait de souche *Alternaria sp*, aucun résultat positif n'a été obtenu (aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée) donc il n'y a aucun effet antibactérien (**Figure 38**).

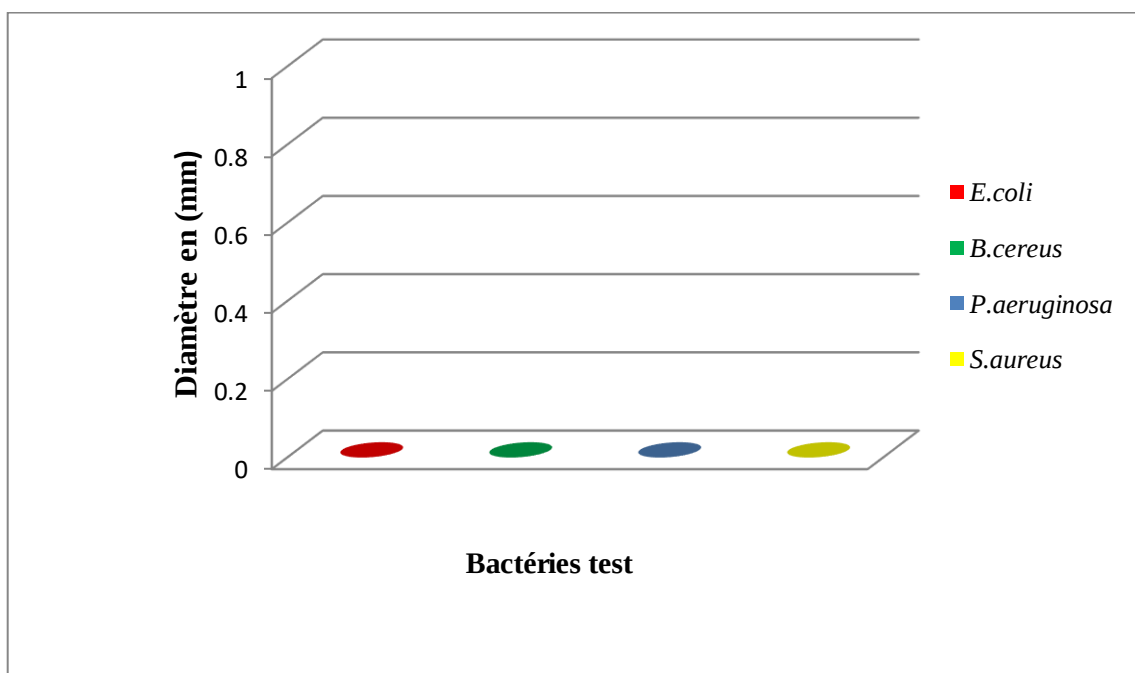


Figure 38: Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche par la technique des puits.

➤ La souche *Trichoderma sp₃*

On a remarqué que la souche *Trichoderma sp₃* montre une activité importante avec une zone d’inhibition vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* de 13 mm de diamètre. Et de 12 mm de diamètre contre *B. cereus*.

Elle a montré plus d’antagonisme vis-à-vis d’*Escherichia coli* et *P.aeruginosa* avec des zones d’activité de 14 mm (**Figure 39**).

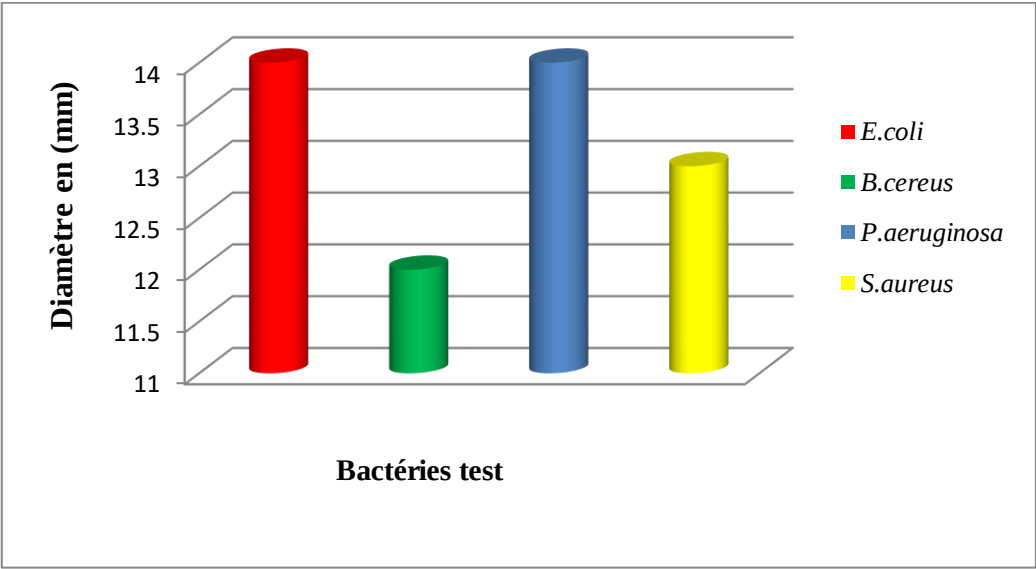
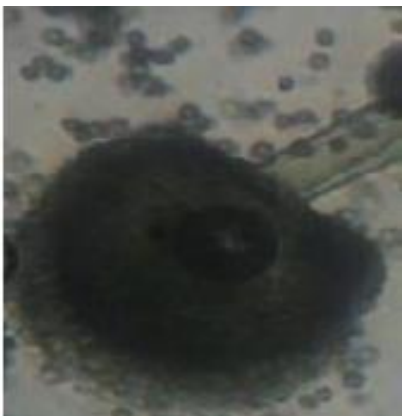


Figure 39: Mise en évidence de l’activité antibactérienne de la souche du genre *Trichodarma sp₃* par la technique des puits.

❖ Identification de la souche active

Tableau 11 : Aspect macroscopique et microscopique et identification de la souche la plus active.

Face de la souche	Revers de souche	Sous microscopie	souche
			<i>Aspergillus niger</i>

Le but de notre étude est de détecter l'activité antibactérienne de 4 souches fongiques. En utilisant la technique des cylindres d'agar ; la technique des disques et la technique des puits contre quatre souches bactériennes (*E. coli* ; *B. cereus* ; *P. aeruginosa* et *S. aureus*).

Selon **Botton et al., (1990)**, les espèces de moisissures sont connues par leur production de substances à effet antibactérien, elles produisent, généralement, des métabolites secondaires biologiquement actifs, synthétisés en fin de croissance et possèdent des structures chimiques différentes de celles des protéines. Il est connu que ces genres constituent le réservoir principal de substances antibactériennes, possèdent des structures chimiques différentes de celles des protéines (**Attalah et Kacem-chaouche, 1992**).

Les métabolites secondaires sont généralement produits par fermentation par un nombre limité d'organismes, principalement par les actinomycètes et les champignons, à la fin de leurs cycles de croissance, souvent pendant la phase stationnaire, et sont connues par leur effet antibactérien. (**Barrios-González et Mejía, 2008 ; Botton et al., 1990**).

La comparaison entre les résultats de l'activité antifongique réalisée sur milieu solide (technique des cylindre d'agar), et celle réalisée sur milieu liquide (technique des disques de diffusion), révèle que les moisissures utilisées (*Aspergillus niger* ; *Trichoderma sp₂* ; *Alternaria sp* et *Trichoderma sp₃*) possède une activité antibactérienne des extraits de fermentation, contrairement qui se sont avérées moins résistantes lorsqu'elles sont réalisées sur milieu solide (technique des cylindre d'agar).

Nos résultats s'accordent avec ceux d'Abdulwahid et al., (2013), qui ont révélé que *Aspergillus niger* possédait un effet inhibiteur significatif contre *E. coli* ; *B. cereus* ; *P. aeruginosa* ; *S. aureus*. En effet, il est connu que les genres *Aspergillus* constituent le réservoir principal de ces substances (**Botton et al., 1990**).

Le genre *Trichoderma* est réputé pour sa production d'un large panel de métabolites secondaires estimé à plus de 100 composés dotés d'activités antibiotiques (**Aïteche et al., 2018**). Plusieurs espèces du genre *Trichoderma* produisent une grande variété de peptaïbols, qui sont des molécules d'antibiotiques. Grâce à leurs charges positives, ces molécules se déposent facilement à la surface négativement chargée des bactéries, certains sont actifs sur les bactéries Gram positif, d'autres sur les bactéries Gram négatif, tandis que d'autres sont actifs sur les deux types (**Cosette et al., 1999**).

Leur production d'enzymes, de substances bioactives et leur développement rapide font les *Trichoderma* spp des agents potentiels et une matière de choix pour l'exploitation industrielle et pour la lutte biologique (**Roquebert, 1996 ; Kubicek et Harman, 2002**).

Le champignon *Trichoderma* s'est avéré particulièrement efficace dans la lutte de microbes pathogènes **(Paul et Masih, 2006 ; Melo et Faull, 2000)**. Il possède la résistance innée à la plupart des produits chimiques agricoles **(Harman, 2006)**.

Les espèces de *Trichoderma* peuvent sécréter des enzymes extracellulaires et des antibiotiques, jouant un rôle important contre les agents phytopathogènes **(Chet *et al.*, 2006 ; Melo et Faull, 2000 ; Shelton, 1997)**.

Conclusion et perspectives



L'objectif principal de ce mémoire est la recherche de l'activité antibactérienne élaborée par les moisissures isolées du sol d'une source thermale Hammam Abdallah (Bouhama). vis-à-vis de quatre souches bactériennes ; deux à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10987) et deux à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

En effet, les cultures des prélèvements sur PDA ont permis l'isolement de dix moisissures différentes. Le pouvoir inhibiteur de l'antibiotique au cours de l'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries.

Pour l'identification des moisissures Thermophile isolées, une étude macroscopique a été réalisée sur milieu PDA et une étude microscopique a été effectuée, cette dernière a permis de déterminer les genres : *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* et *Alternaria*, où le genre le plus dominant est : *Aspergillus* et *Trichoderma*.

La production des substances antibactérienne, a été testée par trois techniques à savoir la technique des cylindres d'agar. La technique des disques et la technique des puits. Les résultats de ces tests montrent que quatre espèces fongiques ont montré un effet antibactérien contre les bactéries testées.

En perspective, ce travail est une étape préliminaire pour des études plus larges, plus approfondies et plus accomplies incluant :

- ✓ La purification et l'identification des métabolites bioactifs produits par les souches fongiques thermophiles.
- ✓ La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- ✓ L'optimisation de la biosynthèse des MSFB à des fins médicales.

La production des substances antibactériennes à l'échelle industrielle (Scall-up).

Références bibliographiques



-A-

- Abdelaziz W. (2006)**. Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes À partir des sols sahariens. Thèse de Magister. Université des frères Mentouri. Constantine. P : 135
- Ait-Mouhoub S. E. (2015)**. L'automédication aux antibiotiques en médecine générale : étude Quantitative auprès de patients. Thèse de doctorat. Université de picardie jules verne.P :21
- Aiteche H., Benzid K. (2018)**. Activité antagoniste de la souche *Trichoderma asperellum* (T34) sur demi-tubercules de pommes de terre infectés par *Dickeya solani*.memoire de master, Université de Béjaia.
- Akbar S., Sultan S. (2016)**. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement Shamsa. Brazilian Journal of Microbiology.P :47, 563-570.
- Albino U.B., Andrade G. (2006)**. Evaluation of the functional group of microorganisms as bioindicators on the rhizosphere microcosm. In: Rai MK (Ed) Handbook of Microbial Biofertilizers. Food Products Press. P: 29-49.
- Almi H. (2016)**. Etude des myco-pathogènes de *Lens culinaris* et évaluation de l'effet de Deux souches de *Trichoderma harzianum*.
- Alspaught J.A., Perfect J.R ., Hatman j. (1997)**.*Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*11:3206-3217.
- Anonyme. (2011)**. Bilan Campagne agrumicole. Office Régional de Mise en Valeur Agricole du Souss-Massa, Service de production agricole.
- Atherton G., Bartholomew J. (2015)**. Aspergillus and aspergillosis web site.
- **Attalah M., Kacem –Chaouche N. (1992)**. Production of ochratoxin A in a semi synthetic : « in the second Regional Mycological Conf. RMC 2 ». Cairo. Egypt.Vol.16(32), Pp.1699-1704.
- **Alvarez –Rodriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E., Martinez M.J., Larriba G.,**
- Coque J-J.R. (2002)**. Cork taint of wines: role of filamentousfungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of 2,4,6 – Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology*. 68 (12) :5860-5869.

-B-

- Bachelier G. (1978).** La faune des sols ; son ecologie et son action. Edition O.R.S.T.O.M. p: 391
- Badill G., de Briève C., Guého E. (1987).** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris.
- Barik B.P., Tayung K ., Jagadev P.N., Dutta S.K. (2010).** Phylogenetic placement of an Endophytic fungus *Fusarium oxysporum* isolated from *Acorus calamus* rhizomes with Antimicrobial activity. *European Journal of Biological Sciences*; 2:8-16.
- Barnett H.L., Hunter B.B. (1998).** Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Barrios-González J., Mejía A.(2008).** Production of antibiotics and other commercially valuable secondary metabolites. Pp. 302-336. *In* : Pandey A., Soccol C.R. and C. Larroche (Eds), *Current developments in solid-state Fermentation*. Asiatech Publishers, INC.SPRINGER, New Delhi, India.
- Benghrieb A., Gerboua W. (2018).** Etude de l'activité antibactérienne de moisissures isolées à partir des milieux salins. Université des Frères Mentouri Constantine 1 faculté des sciences de la nature et de la vie, Algérie.75p
- Benhamou N., Chet I. (1997).** Cellular and molecular mechanisms involved in the interaction between *Trichoderma harzianum* and *Pythiummultimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, p. 2095–2099.
- Benlamoudi w., Guezoul O. (2016).** Essai de lutte biologique in vitro contre quelques maladies fongiques de la tomate dans la région d'Oued Righ par l'utilisation de souches autochtones de *Trichoderma harzianum* Persoon (1794) W Benlamoudi - Mém. Master, Univ. Ouargla.P :19.
- Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58:1-26.
- Berg RD. (1996).** The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in Microbiology* 4:430–435
- Bertrand Y ., De Halleux G. (2005).** Chevaux et prairies. France Agricole.France. P:205-223.
- Bloem J., Lebbink G., Zwart K. B., Bouwman L. A., Burges S., Devos J. A., De Ruiter P.C. (1994).** Dynamics of microorganisms, microbivores and nitrogen mineralization in winter

wheat fields under conventional and integrated management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. P: 51,129-143.

-Boruta B., Lemanowicz J., Bartkowiak A.(2016). Variation in biological and physicochemical parameters of the soil affected by uncontrolled landfill sites. *Environmental Earth Sciences*, DOI10.1007/s12665-015-4955-9.

- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.p:13-19-69-79.

-Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies, p : 34-428.

-Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson.Paris, p12-426.

-Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H ., Kitouni M., Boudmemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrice de substance antimicrobiennes à partir de la SEBKHA DE AIN MLILA. 23: 5-10.

-Bousboua H.(2005). Eléments de microbiologie : Programme de graduation : biologie, médecine, pharmacie, chirurgie dentaire, sciences vétérinaires, sciences alimentaires, agronomie. Constantine (Algérie) : Campus-club. 2ème édition .P : 161-166, 304.

-Boudih S. (2011). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers: évaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires in vitro. P : 15- 16.

-Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris.126 p.

Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y ., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.

-Bouزيد N.(2006). Les champignons parasites des plantes cultivées (*avec version Anglaise sur CD*). Centre de Publication Universitaire, Tunisie, P : 456.

-Branger M., Bresler G., Vaamonde G., Degrossi C., Pinto V. F. (2007). Moisissures et Risques alimentaires (mycotoxicoles). *Revue Française des Laboratoires*.p : 373.

-Branger A., Richer M.M., Roustel S. (2007). Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Edition : Educagri. Pp : 38.

-Bush R. K., Prochnau J. J. (2004). Alternaria-induced asthma. *J allergy clin immunol.* February; volume 113, number 2 : 227-234.

-Bullerman L. B., Bianchini A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing, *International Journal Food Microbiology* 119, 140-146.

-C-

-Cabioc'h J. FJY, Toquin A., Boudouresque C.F., Meinesz A., Verlaque M. (1992). Guide des algues des mers d'Europe : Manche/Atlantique. 1. P : 272.

-Calvet J. (2003). Le sol propriétés et fonction contribution et structure, phénomènes aux interfaces (tome 1). Édition France agricole. P: 88

-Calvet R. (2000). Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), P : 83-90.

-Calvet R. (2003). Le sol, propriétés et fonctions. T2 phénomène physique et chimique, application agronomique et environnement. Ed. France Agricole. P : 27, 511, 456.

-Calvet R. (2003) a. Le sol, propriétés et fonctions, tome 1, Constitution et structures, phénomènes aux interfaces. Ed. France Agricole.

-Calvet R. (2003) b. Le sol, propriétés et fonctions, tome 2, Phénomènes physiques et chimiques : Applications agronomiques et environnementales. Ed. France Agricole.

-Calvo A.M., Gardner H., Wand Keller N.P. (2001). Genetic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J. biol. Chem.* 276: 20766-20774.

-Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W. (1996) . Identification of Pathogenic fungi, *Public Health Laboratory Service*.

-Carlile M.J., Watkinson S.C. The Fungi. (1994). (Academic Presseds). Caron D.2000. Fusarioses des épis, Sait-on prévoir leur développement. Perspectives Agricoles Janvier 2000, pp 56-62.

-Carson M. J. Hartwell L. (1985). CDC17: An essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell.* 42: 249-257.

-Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002), Les mycotoxines : contaminants omniprésents Dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc. P :19.

- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (2002).** Balkan endemic nephropathy and the Associated urinary tract tumours: review on etiological causes, potential role of mycotoxins. *Food Additive and Contaminants* .19 (3), p: 282-302.
- Chabasse D. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale ; P : 25-27.
- Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L ., Brun S and Penn P. (2002).** Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt medical. Labo Analy De biomédicale.
- Chet I., Viterbo A., Brotman Y. (2006).** Plant Biocontrol by *Trichoderma spp.* Department of biological chemistry. [www.weizmann.ac.il / biological chemistry /scientist / chet / chet . html/](http://www.weizmann.ac.il/biological_chemistry/scientist/chet/chet.html/).
- Cherif H., Ayari F., Ouzaria H., Marzoratib M., Brusettib L., Jedidia N., Hassena A.,Daffonchiob D. (2009).** Effects of municipal solid waste compost, farmyard manure and chemical fertilizers on whea growth, soil composition and soil bacterial characteristics under Tunisian arid climate. *European journal of soil biology*.p:45, 138 -145.
- Chesnokova MG., Shalaj, Kraus YA., Cherkashina NV., Mironov A. (2016).** Analysis of corrosion defects on oil pipeline surface using scanning electron microscopy and soil thionic and sulfate-reducing bacteria quantification. *Procedia Engineering*, P152, 247 -250.
- Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noël T., Villard j. (2005).** Moisissures et risques alimentaires (mycotoxicooses). *Revue Francophone des Laboratoires*, N°373 :61-66.
- Champion R. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. Techniques et pratiques, INRA Edition.
- Chapeland-Leclerc F., Papon N., Noel T., Villard J. (2005).** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicooses). *Revue Française des Laboratoires*, 373.P : 61-66.
- Chabasse D., Bouchara JP., de Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation en biologie médicale. BIOFORMA N° 25.
- Chabasse D., Bouchara J.P., De Gentile L., Brun S., Cimon B., Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp : 157.
- Champion R. (1997).** Identifier les champignons transmis par les semences. INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) 147, rue de l' Université, 75338 Cedex 07.P : 17-34.
- Champ S.P., Raw P., Chang A. (1987).** An endogenous inducer of sexual developement in *Aspergillus nidulans*.*J. Gen. Microbiol.* 133:1383- 1388.

- Champe S.P., El-Zayat A.A.E. (1989).** Isolation of sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J. Bacterial*. 171: 3982-3988.
- Clatworthy A. E., Pierson E., Hung D.T. (2007).** "Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy." *Nat Chem Biol* 3(9): 541-8.
- CONNEY GD., EMERSON R. (1964).** Thermophilic fungi. W. H. FREEMAN AND COMPANY. San Francisco et London. pg. 3-28
- COSETTE P., REBUFFAT S., BODO B., MOLLE G. (1999).** The ion-channel activity of longibrachins LGA I and LGB II: effects of Pro-2/Ala and Gln-18/Glu substitutions on the alamethicin voltage-gated membrane channels. *Biochim. Biophys. Acta Biomembranes*, 1461 (1) : 113-122.
- Cottinet D. (2013).** Diversité phénotypique et adaptation chez *Escherichia coli* étudiées en microfluidique digitale, L'université Pierre Et Marie Curie ; P : 21.
- Criquets C. (2008).** IMEPUMRCNRS 6116. Planche Tp mycologie publié sur internet le 03/03/2008.
- Crisan, E.V. (1973).** Current Concepts of Thermophilism and the Thermophilic Fungi. *Mycologia*. 65 : 1170-1198.

-D-

- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétale. Edition INDRA. Paris p : 63-81, 383.
- Dealarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Tec & Doc ; éditions médicales internationales, pp : 776.
- Debuyser A. (2003).** Différenciation des propriétés du sol par des apports d'engrais et d'amendements. Cas de l'essai de longue durée des 42 parcelles (versailles). Thèse de Doctorat. Université de Bourgogne. Dijon. France.
- Dendouga W., Bouregghda H., Belhamra M. (2016).** Biocontrol of wheat Fusarium crown and root rot by *Trichoderma* spp. And evaluation of their cell wall degrading enzymes activities. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 51(1), 1-12.
- Dennis C., Webster J. (1971).** Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57: 41-48.

- Demain A., Fang A. (2000).** The natural functions of secondary metabolites .*Adv.Biochem. Eng. Biotechnol.* 69 : 1-39.
- De Ruiter P.C., Van Veen J. A., Moore J. c, Brussaard L. et Hunt H. W. (1993).** Calculation of nitrogen mineralization in soil food webs. *Plant and soil*.P: 157,263-273.
- Dix N.J., Webster J. (1995).** Fungal Ecology, Chapman & Hall, London. ISBN 0-412-22960-9 G.L. Hennebert. Fr. Balon La Mérule des maisons. Louvain-La-Neuve, ARTEL, Edition CUCO, 19%.
- Dommergues Y., Mangenot F. (1970).**ecologie microbienne du sol .Masson et Cie, paris, pp 9-72(796).
- Drénou C. (2006).** Les racines face cache des arbres. Institut pour le développement forestier, Paris, p : 335.
- Dulmage H.T., Rivas R. (1978).**A survey to soil microorganisms, with particular référence to the actinomycetes as sources of substances toxic to *Heliothis virescens*.*Journal of Invertebrate Pathology.*, 31, 118-122.
- Dziekan G., Hahn A., Thune K, Et Al.(2000).** Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* In A Teaching Hospital: Investigation Of Nosocomial Transmission Using A Matched Case-Control Study. *J Hosp Infect*; 46:263–70.

-E-

- Elidemir O., Colasurdo G.N., Rossmann S.N., Fan L.L.(1999).** Isolation of *Stachybotrysen* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. *Pediatrics*, 104, 964-966.
- Ellis D.H. (1980).** Thermophilous Fungi Isolated from some Antarctic and Bub-Antarctic Soils. *Mycologia*. 72: (5) 1033-1036.
- Emerson A.E. (1968).** A revision of the fossil genus *ulmeriella* (Isopetera *Hodotermitidar* ,*hodotermitinae*). *AMN* 2332 : 1-22.
- Engelhart S., Looock A., Skutlarek D., Sagunski H., Lommel A., Färber H., Exner M. (2002).** Occurence of toxigenic *Aspergillus versicolor* isolates and Sterigmatocystin in carpet dust from damp indoor environments. *Appl. Environ. Microbiol* ; 68(8): 3886-3890.
- Etzal R.A. (2002).** Mycotoxins. *JAMA*. 297 (4) :425 – 427.

-F-

- FAO. (2001).** La biodiversité et biotes du sol. P : 10.
- FAO, (2002).** La séquestration du carbone dans le sol pour une meilleure gestion des terres. Rapport sur les ressources en sols du monde. P: 59.
- Floc'h J. Y. L.V. (2010).** Les secrets des algues. p : 168.
- Frémy J.M., Grosso F., Dragacci S. (2005).**Analyse et detection de mycotoxines. Techniques de L'ingénieur.[https. //WWW.techniques –ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/securite-au-laboratoire-42378210/analyse-et-detection-des-mycotoxines-P3330](https://WWW.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/mesures-analyses-th1/securite-au-laboratoire-42378210/analyse-et-detection-des-mycotoxines-P3330).

-G-

- **Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blocker H., Hofle G ., Muller R. (2002).** The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor.12 ; 277(15) :13082-90.
- Garon-Ladiere S. (2004).**Etude structural des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsis armata* (Bonnemaisoniales). P: 332.
- Gertz J., Siggia E.D., et Cohen B.A.(2009).**Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters. *Nature.*, 457,215-218.
- Gherras S, El Himer N. (2017).** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en Toxicologie industrielle et environnemental .P :7-20.
- Ghoreishi G., Alemzadeh A., Mojarrad M., Djavaheri M. (2017).** Bioremediation capability and characterization of bacteria isolated from petroleum contaminated soils in Iran. *Sustainable Environment Research.*P : 27, 195-202.
- Gibson A.M., Baranyi J., Pitt J.I., Eyles M.J., Roberts T.A. (1994).** Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. *Food Microbiology* 23 (1994) 419-431.
- Giraud J. (1998).**Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris. p 7 ; 8-101.p 330.
- Gobat, J. M., Aragno M., Matthey W. (1998).**Le sol vivant, bases de pédologie, biologie des sols.Collection gérer l'environnement.Presses polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. Vol 14, p : 4-50.

-Gobat J.M., Aragno M., Matty W. (2010). Le sol vivant. 3ème Edition. Revue et augmenté. Pp 150-165.

-Guezlane B., Tbibel N., Kahlouche B., Atmani G.S. (2011). Microbiologie Travaux Pratiques 2ème année TCB et LMD, 4ème édition corrigée.

-GUNGI S., ARIMA K., BEPPY T. (1983). Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47: 2061-2069.

-H-

-Hapwood D.A. (1988). Toward's and under standing of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. .R.Soc.LandB*. 235: 121-138.

-Halewyn M. A., Lercterc J. M., King N., Belonger M., Legris M., Frenett Y. (2001). Les risqué à la santé associés à la presence de moisissure en milieu intérieur (edn), Quebec. Canada.

Harman, G. E. (2006). *Trichoderma* spp. Including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. kongii*, *T. hamatum* and other spp. Cornell University, Geneva. ([http : //www nysaes .cornell . edu /ent / biocontrol / pathogens / trichoderma. Htm/](http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.htm/)).

-Hawksworth D.L., Mound. (1991). Biodiversity databases: the crucial significance of collections. In Hawksworth D. L. (ed.) *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture*. CAB International. Wallington, UK. 17-29.

-Hien E., Favre-Bonte S., Masse D., Nazaret S. (2010). Impact de l'épandage de déchets urbainssur les communautés bactériennes de sols agricoles dans la périphérie d'Ouagadougou, Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 4, (5).P:1721-1729.

-I-

-Imtiaz MR., Mujawara LH., Shahzade T., Almeelbia T., Ismaila I, Oves M. (2016). Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiological Research*.P:26-41,183.

-Ingold C.T., Hudson H.J. (1993). Growth and Nutrition. En 'The Biology of Fungi'. Chapman & Hall. London. 7-24.

-J-

- Jayanthi B., Emenike C.U., Agamuthu P., Khanom S., Sharifah M., Fauziah S.H., (2016).** Selected microbial diversity of contaminated landfill soil of Peninsular Malaysia and the behavior towards heavy metal exposure. *Catena*.P:25-31,147.
- Jennings D.H., Lysek G. (1996).** Fungal biology: understanding the fungal l.

-K-

- Kaper JB., Nataro JP., Mobley HLT. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123–140.
- Kane B.E., Mullins J.T. (1973).** Thermophilic Fungi in a Municipal Waste Compost System. *Mycologia*. 65: 1087-1100.
- Kawamura C., Tsujimoto T., Tsug T. (1999).** Targeted dissuption of melanin biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japeneses pear pathotype of *Alternaria alternate*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 12: 59- 63.
- Kebir T. (2012).** Étude de contamination, d'accumulation et de mobilité de quelques métaux lourds dans des légumes, des fruits et des sols agricoles situent près d'une déchargeindustrielle de l'usine al zinc de la ville de ghazaouet. Thèse, université abou bekr belkaid, Tlemcen.P :6 -28.
- Keller SE, Sullivan TM, Chirtel S (1997).** Factors affeting the growth of *Fusarium Proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and Ph. *Journal of industrial Microbiology & biotechnology*, 19, P : 305-309.
- Kubicek C. P., Harman G. E. (2002).***Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1: Basic biology, taxonomic and genetics. Taylor & Francis, London, pp: 4-60.
- Kučeríka J., Tokarskib D., Demyand MS., Merbache I., Siewertf C. (2018).** Linking soil Organic matter thermal stability with contents of clay, bound water, organic carbon and nitrogen.*Geoderma*. P : 38-46,316.
- Kumar N., Singh R.K., Mishra S.K., Singh A.K., Pachouri U.C. (2010).** Isolation and screening of soil Actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *International Journal of Microbiology Research*. 2 (2), 12-16.

-Kwon Chung W., Bennett J.W. (1992). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Review* .16, p:497-516.

-L-

-Larpant J.P., Larpant –Gourguand M. (1996). Mémento Technique de microbiologie, 2^{ème} edn. Technique et Documentation .Lavoisier. 1.

-Lavelle P. et Spain, A. V. (2001). Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, the Netherlands. P : 65.

-Lecellier A. (2013). Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman. Thèse de doctorat d'état, Reims. P : 15.

-Leghlimi H. (2013). Cellulase de souches fongiques issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales). Sélection des souches et étude des caractéristiques des enzymes. Thèse de doctorat d'état, université constantine 1. P : 134.

-Leyral G., Vierling E. (2001). Microbiologie et toxicologie des aliments : Hygiène et sécurité alimentaires. 3^{ème} Edition, DOIN, Paris, P : 15-20, 268.

-Locatelli A. (2015). Prévalence de pathogènes humains dans les sols français, effet des facteurs pédoclimatiques, biologiques et du mode d'utilisation des sols. - PhD Thesis, Université de Bourgogne, Dijon, France. P : 3.

-Locquin M. (1984). Mycologie générale et structurale .Ed. Masson. P : 551.

-Lyczak J. B., C. L., Cannon ., Pier G. B. (2000). "Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist." *Microbes Infect* 2(9): 1051-60.

-M-

- Madigan M.T., Matinko J.M., Parker J. (1997). Brok biology of microorganisms, 8th edn. USA.

-Mammeri M. (2017). Le Thermalisme de la région de mila. Memoire de magister en géologie. P : 107-108

-**Marilley Laurent., Vogt Gudrun., Aragno M.(2007).** Diversité bactérienne du sol et de larhizosphère et effet d'une augmentation en CO2 atmosphérique ; Laboratoire demicrobiologie, Université de Neuchâtel, Rue Emile-Argand 11, Neuchâtel.

-**Mazure P., Nakanishi K., El-Zayat A.A.E ., Champ S.P. (1991).** Structure and synthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem.Comm.* 20:1486- 1487

-**Melo I.S., faull J.L. (2000)** .Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma spp* . Scientia Agricola. 14 p.

-**Meyer A., Deiana J., Bernard A. (2004).** Cour de microbiologie générale. *J.Appl.Microbiol.* 66 (4), p:1523-1526.

- **Mohanta J., Tayung K., Mohapatra U. (2008).**Antimicrobial potentials of endophytic fungi inhabiting three Ethnomedicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India. *The Internet Journal of Microbiology*; 5(2).

-**Mouria B., Ouazzani-Touhami A ., Douira A. (2012).** Isolement Et Identification De La Mycoflore Du Compost Des Déchets Urbains Solides, *Nature & Technologie*, P13-P28.

-N-

-**Nguyen M.T. M.(2007).** Identification des espèces de moisissures, potentiellement productrices de mycotoxine dans le riz commercialise de cinq provinces de la région centrale du Vietnam- études des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines, thèse de Doctorat de l'institut national polytechnique de Toulouse.P : 100.

-**Nicklin J., Graeme-Cook K., Praget T., Killington R. (2000).** L'essentiel en microbiologie. Ed.Berti.p:211-217.

-O-

-**Osman KT. (2013).** Soils: Principles, Properties and Management. Springer Science Business Media Dordrecht, DOI 10.1007/978-94-007-5663-2.

-P-

- Paul, B. and Masih, I. (2006).** Lutte biologique contre les maladies cryptogamiques de lavigne: la pourriture grise (*Botrytis cinerea*), l'oïdium (*Uncinula necator*) et le mildiou (*Plasmopara viticola*). www.u-bourgogne.fr/Iuw/lutte.html-24k p:10.
- Pedro G.(1996).** La science du sol a l'aube du XXI ème siècle. Rennes.17.P:136-143.
- Peuk A.D.(2000).** The chemical composition of xylen sapin Vitis vinifera L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer.*Am. Enol. Viticult.* 51:329-339.
- Pfohl-Leszowicks A. (1999).** Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque. ; Paris : Tec&DOC ,478P.
- Pfohl-Leszkowicz A. (2001).** Définition et origines des mycotoxies in Les mycotoxines dans L'alimentation: évaluation et gestion du risque, Ed. Tec & Doc. pp. 3-14.
- Pinton P.(2012).** Toxicité et mode d'action, du déoxynivalenol et de ses dérivés acétyles sur l'intestin. Ecole doctorale 472. Thèse de doctorat, pp.10.
- Pitt J.I. (2000).** Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology* 38: 17-22 Suppl. 1
- Pitt J.I. (2000).** Toxigenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), 184 - 192.
- Plesiat P. (2012).** Biochimie de la résistance. *ANTIBIOGRAMME*.2:17-35.
- Poisson D.M., Da Silva N.J., Rousseau D., Esteve E. (2007).** *Tinea corporis gladiatorum*: Specificity and epidemiology. *Journal De Mycologie Medicale*. 17(3), P : 177-82.
- Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A. (2003).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp: 1164.

-R-

- Raper K.B., Fennell . (1965).** The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* 5: 163-176.
- Raphael M. (2007).** Synthèse sur la diversité de la pédofaune en système agroforestier.Centre de transfert Montpellier Sup.Agro. P : 65.

- Rahoui M., Souidi B., Chiang C., Badraoui M., Marcoen J.M., Benzakour M. (2001).** Atlas de la qualité des sols et des eaux souterraines dans le périmètre irrigué des Doukkala. Réalisation : A.Bamouh. Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II. P : 1-29.
- Reboux G. (2006).** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compound. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* ; 46, 208-212.
- Reboux G., Bellanger A., Roussel S., Grenouillet F., et Million L. (2010).** Pollution atmosphérique, Moisissures et habitat : risques pour la santé et espèces impliquées, *Revue française d'allergologie* 50, P : 611–620.
- Ritchie ME. Raina R. (2016).** Effects of herbivores on nitrogen fixation by grass endophytes, legume symbionts and free-living soil surface bacteria in the Serengeti. *Pedobiologia*. P : 59, 233-241.
- Robert P. (1996).** Le sol : interface dans l'environnement. Edition Masson, Paris. P : 241.
- Roquebert M.F. (1996).** Interactions antagonistes des *Trichoderma* sp. dans les systèmes telluriques : Systématique, biologie et écologie des organismes. Compte-rendu des 4èmes Rencontres en Toxinologie, Paris, pp : 13-15.
- Roquebert M.F. (1997).** Les moisissures : nature, biologie et contamination. Ed. Université de Lyon. France. P : 10.
- Roussos S. (1985).** Croissance de *Trichoderma harzianum* par fermentation en milieu solide: Physiologie, sporulation et production de cellulases. Thèse d'Etat, Université de Provence, Marseille. 193p.
- Ruark G. H., Zarnoch S. J. (1992).** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. *Soil Sc. Soc. Am.* 56 :1945-1950.

-S-

- Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J., Kishan V. (2008).** Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol.* 7: 349-355.
- Salangsang JA, Et Al.(2010).** Patient-Associated Risk Factors For Acquisition of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* In A Tertiary Care Hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*; 31:1139–47.

- Shelton T. (1997).***Trichoderma* for Biocontrol of Plant Pathogens: From Basic Research to commercialized products.Cornell University NYSAES. Geneva.p8.
- Schmit J.P., Mueller G.M. (2007).**An estimate of the lower limit of global fungal diversity. Biodiversity and Conservation.P: 16 ,99-111.
- Sidhu G.S. (2002).** Mycotoxin genetics and gene clusters. European Journal of Plant Pathology ; 108, 705-711.
- **Smith C.K., Coyea M.R., Munson A.D. (2000).** Soil carbon, nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. Ecol. App. 10:75-78.
- Stenfors L.P., Granum P.E. (2001).** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. FEMS Microbiol. Lett. 197, 223–228.
- Stolp H. (1988).** Microbial Ecology: organisms, habitats, activities: Camblidge University Press.New York. P : 308.
- **Subler S., Kirsh K.S. (1998).** Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-tillcornfield. Bio. Fert. Soils. 26 :243-249.

-*T*-

- Tabuc K. (2007).** Thèse présentée pour obtenirle titre de docteur de l’institut national polytechnique de toulouse et de l’universite de bucarest en pathologie, mycologie, genetique et nutrition p:30-31.
- Tansey M.R., Jack M.A. (1976).** Thermophilic fungi in sun-heated soils [Indiana]. Mycologia. 68: (5) 1061-1075.
- Tessier D. (1999).** La capacité d’échange cationique et son importance dans la gestion actuelle des sols. Etrait des comptes rendus de l’Académie d’Agriculture de France. Tome 85, N°2.
- Thakur S.B. (1977).** Occurrence of spores of thermophilic fungi in the air at Bombay [India]. Mycologia. 69: (1) 197-199.
- Thorn G. (1997).** The fungi in soil. In: Van Elsas J.D, Wellington EMH, Trevors ST (Eds.Modern Soil Microbiology, New York Marcel Dekker. P: 63-127.
- Tortora J., Funk B.F., Case Ch.I. (2003).** Introduction à la microbiologie, (edn) universite de versailles saint-quentin-en-yvelines ufr des sciences de la sante paris – ile –de –france – ouest.

-**Tortorano A.M., Cabrini E., Viviani M.A. (1979).** Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux méthodes CMI en gelose et méthode des disques. *Bull Soc Fr Myc Med.* 8: 69-74.

-**Touati R, Amor-Chelihi L. (2016).** Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master en microbiologie. Edition Berti. P: 3-6.

-**Trail F., Mahinti N., Linz J. (1995).** Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology.* 141:755-765.

-W-

-**Walsh C. (2003).** Antibiotics: actions, origins, resistance. American society for microbiology (ASM). 335 p

-**WHO (World Health Organization). (1990).** Selected mycotoxins: ochratoxins, tricothecenes, ergot. International programme on chemical safety. Environmental health criteria 105. WHO, Geneva. 263 p

-Y-

-**Yiannikouris A., Jouany J.P. (2002).** Mycotoxins in feeds for ruminants; fate and effects on animals. *INRA Production Animales.* 15, 3-16.

-Z-

-**Zupančiča N., Turniškić R., Milerd M., Grčmanc H. (2018).** Geochemical fingerprint of insoluble material in soil on different limestone formations. *Catena*, 170. P : 10-24.

Annexe

Annexe 01**➤ Composition des milieux de cultures****• Potato Dextrose AGAR (PDA)****Composition :**

Pomme de terre.....	200g
Glucose.....	15g
Agar.....	20g
Eau distillé.....	compléter jusqu'à 1000ml

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes. .

Voici le protocole utilisé pour la préparation de milieu de culture pour la croissance des

Champignons :

Préparation :

- Laver la pomme de terre non pelée.
 - Couper en cubes dans 500 ml d'eau distillée.
 - Porter à ébullition pendant 30 – 45 min.
 - D'autre part faire fondre le glucose dans 500 ml d'eau distillée.
 - Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.
 - Ajouter l'agar dans les flacons.
 - Compléter le volume à 1000 ml.
 - ajuster le pH= 6,4 ± 0,2 à 25°C
 - Stériliser par autoclavage à 121° C / 2H min.
- ☐☐ La préparation de **PDB** liquide est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar. Ajuster pH (6 à 7).

• Milieu Mueller-Hinton (DIFCO Laboratoires, 1996)

Le milieu de Mueller-Hinton est recommandé pour tester la sensibilité des microorganismes aux antibiotiques et agents chimio thérapeutiques.

Agar	17g/l
Infusion de boeuf	300g /l

Hydrolysate acide de caséine	17,5g/l
Amidon.....	1, 5 g/l

PH final: 7, 3

- **Gélose nutritive**

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est :

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
Gélose	15 g

PH 7.2, autoclave 20 minutes à 120°C (**Guiraud, 1998**).

- **Bouillon nutritif**

Bouillon nutritif poudre	2.3 g
L'eau distillée.....	100ml

- Mettre 2.3 g de bouillon nutritif dans un bécher, et compléter le volume jusqu'à 100ml.

-Mettre le tout sur plaque agitateur et agiter jusqu'à homogénéisation.

-Répartir 10ml dans chaque tube.

-Autoclavage à 121°C pendant 20min.

Annexe 02

➤ Solutions

- **Eau physiologique**

Eau distillée	1000ml
Chlorure de sodium (Na Cl)	9g

La solution est généralement composée d'eau distillée et de chlorure de sodium (NaCl) dilué à 9 pour 1000 (= solution à 0,9 % (*masse/volume*) de NaCl, soit 9 g.l⁻¹).

Annexe 03**➤ Identification des espèces fongiques**

Espèces	<i>Aspergillus sp</i>	<i>Trichoderma sp</i>	<i>Alternaria sp</i>	<i>Cladosporium sp</i>
Nombre	4	4	1	1

Annexe 04**➤ Résultats de L'activité antibactérienne**

- Résultats de L'activité antibactérienne des souches fongiques vis-à-vis des souches testées par la technique des cylindres d'agar.

N°d'souche	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. saeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	0 mm	7 mm	0 mm	0 mm
2	<i>Trichoderma sp 2</i>	0 mm	6 mm	0 mm	7 mm
3		0 mm	8 mm	0 mm	0 mm
4	<i>Trichoderma sp 5</i>	0 mm	12 mm	15 mm	13 mm

- Résultats de L'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis Des souches testées par La technique des Disques.

N°d'souche	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. saeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	12 mm	10 mm	15 mm	10 mm
2	<i>Trichoderma sp 2</i>	6mm	6 mm	0 mm	6 mm
3		6 mm	6 mm	8 mm	0 mm
4	<i>Trichoderma sp 5</i>	10 mm	13 mm	20 mm	14 mm

- Résultats de L'activité antibactérienne des isolats fongiques vis-à-vis Des souches testées par La technique des puits.

N°d'souche	Les souches fongiques présumées	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test			
		<i>E.coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. saeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
1	<i>Aspergillus niger</i>	17 mm	11 mm	13 mm	13 mm
2	<i>Trichoderma sp 2</i>	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
3		0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
4	<i>Trichoderma sp 5</i>	14 mm	12 mm	14mm	13 mm

Annexe 05

➤ Les bactéries tests

- *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie à Gram négatif découverte dans des infections humaines en 1862 par Luke. Elle a ensuite été isolée par Carle Gessard en 1882, qui lui a donné le nom de bacille pyocyanique du fait de sa morphologie (bâtonnets) et de sa capacité à produire des pigments de couleur bleue-verte (la pyocyanine et la pyoverdine) (Lyczak *et al.*, 2000).

La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques rend son traitement difficile. Il est donc important d'étudier les facteurs de virulence de cette bactérie afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour développer de nouveaux médicaments (Clatworthy *et al.*, 2007).

- *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des bactéries sphériques (coques) aérobie-anaérobie facultative à Gram positif, avec un diamètre de 0,5 à 1,5 µm, très résistantes dans le milieu extérieur et peu exigeantes en culture. *S. aureus*, communément appelé staphylocoque doré, est un staphylocoque à coagulase positive. Il a été nommé ainsi par Rosenbach en 1884 en raison de la production de caroténoïdes donnant à la bactérie sa pigmentation de surface caractéristique (Salangsang JA *et*

al., 2010)... C'est une bactérie commensale de la peau et des muqueuses dont la niche principale est la fosse nasale (**Dziekan G et al.**, 2000).

- ***Bacillus cereus***

Bacillus cereus est une bactérie Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles par ciliature périt riche ou immobiles. Morphologiquement, les espèces du groupe *B. cereus* sont des bacilles minces, droits ou légèrement incurvés avec des extrémités carrées, pouvant former des chainettes. Ce sont des bactéries à Gram positif de 1 x 3-4 µm. Leur structure est constituée d'une membrane interne et d'un peptidoglycane épais qui a la fonction de maintenir la forme de la cellule (**Stenfors et Granum**, 2001).

- ***Escherichia coli***

E. coli est un bacille à Gram négatif aérobie-anaérobie facultatif (AAF) faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Son habitat principal est le tractus intestinal inférieur des animaux à sang chaud où elle fait partie des AAF dominantes, même si les bactéries anaérobies strictes sont 100 à 1000 fois plus nombreuses (**Berg RD**, 1996).

Bien que la plupart des *E.coli* soient des souches commensales non pathogènes, et même bénéfiques pour leur hôte, il existe certains pathotypes responsables de maladies humaines provoquant plus de 2 millions de morts chaque année dans le monde (**Kaper et al.** 2004), Le chromosome d'*E coli* est constitué de 4,6 millions de paires de bases. Il comporte 4 300 gènes codant pour des protéines. À titre de comparaison, l'ADN d'un être humain est mille fois plus longues, 3,2 milliards de paires de bases, mais ne comporte que 2 ou 3 fois plus de gènes (20 000 environ) (**Cottinet D**, 2013).

Abstract

This work consists in the study of the antibacterial activity of thermophilic moulds isolated from the soil of a thermal spring Hammam Abdallah (Bouhama- Mila). 10 fungal strains were isolated from soil samples.

The macroscopic and microscopic study showed 4 species belonging to the genus *Aspergillus*, 4 species to the genus *Trichoderma*, and only one species to *Cladosporium* and *Alternaria*.

Analysis of the results showed, in descending order, that the majority genera were *Aspergillus* and *Trichoderma* with a frequency of 40%, followed by the genus *Cladosporium* with a percentage of 10%, and the genus *Alternaria* with a percentage of 10%.

Evidence of the antibacterial activity of a total of 4/10 species belonging to the genera of *Aspergillus*, *Trichoderma* and *Alternaria* was made against four bacterial strains; two Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10987) and two Gram - (*Escherichia coli* ATCC 11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) following three techniques: the agar cylinder technique, the disc technique and the well technique.

The results obtained show that the four fungal species exhibit more or less considerable activity and that Gram-negative bacterium were the most affected where the mean of the inhibition zones reach 20 mm in diameter.

Key words: Thermal spring, Isolation, Identification, Mold, Antibacterial activity.

المخلص

يتكون هذا العمل من دراسة النشاط المضاد للفطريات الحرارية المعزولة عن تربة ينبوع حراري هو حمام عبد الله (بوحامة - ميله). وعزلت 10 سلالات فطرية عن عينات التربة.

أظهرت الدراسة المجهرية 4 أنواع تنتمي إلى جنس *Aspergillus* ، و 4 أنواع إلى جنس *Trichoderma* ، ونوعاً واحداً فقط من *Cladosporium* , *Alternaria* .

وقد أظهر تحليل النتائج، بترتيب تنازلي، أن الغالبية العظمى من عامة الناس كانت جنس *Aspergillus* و جنس *trichoderma* بمعدل تردد 40%، ثم أعقبها جنس *Cladosporium* بنسبة 10%، والجنس *Alternaria* بنسبة 10%.

أدلة على نشاط مضاد للبكتيريا في مجموع 10/4 أنواع تنتمي إلى جيل الأسبرجيلوس وتريشوديرما والتبادل أجريت ضد أربع سلالات جرثومية؛ اثنان جرام + (*Bacillus* ، ATCC 25923 *Staphylococcus aureus*) و اثنان جرام - (*ATCC10987 subtilis*) و اثنان جرام - (*Escherichia coli* ATCC11303 , *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853) باتباع ثلاث تقنيات : اسلوب اسطوانة الأغار ، واسلوب القرص وتقنية البئر.

وتبين النتائج التي تم الحصول عليها أن الأنواع الفطرية الأربعة تمارس نشاطاً كبيراً أو أقل، وأن البكتيريا سلبية الغرام كانت الأكثر تأثراً عندما يصل متوسط مناطق التثبيط إلى قطر 20 مم.

الكلمات المفتاحية : ينبوع حراري، عزل، تعريف، نشاط قديم، مضاد للبكتيريا.

« Étude de l'activité antibactérienne d'une collection de moisissures thermophiles »

- METROUB Amel
- BENCHIHEUB Rihab

Mots clés : Source thermale, Isolement, Identification, Moisissures, Activité antibactérienne

- **Président :** Mr.KALLEB Rabeh MAA/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila
- **Examineur :** Mme. AMARI Salima MAA/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila
- **Promoteur :** Mme. BENSERRADJ Ouafa MCB/ C.U.Abelhafid Boussouf .Mila

« Année Universitaire : 2020/2021 »