



N° Ref :.....

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 : Science de la nature et de la vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème :

**L'étude de l'activité antibactérienne des moisissures isolées à
partir des milieux salins**

Présentée par : BOUHEMARA Yasmina

BOUHENNACHE Hiba

Devant le jury composé de

Mr. Kallab.R

M^{me}. Zaidi S

M^{me}. Benserradj W

Président

Examinatrice

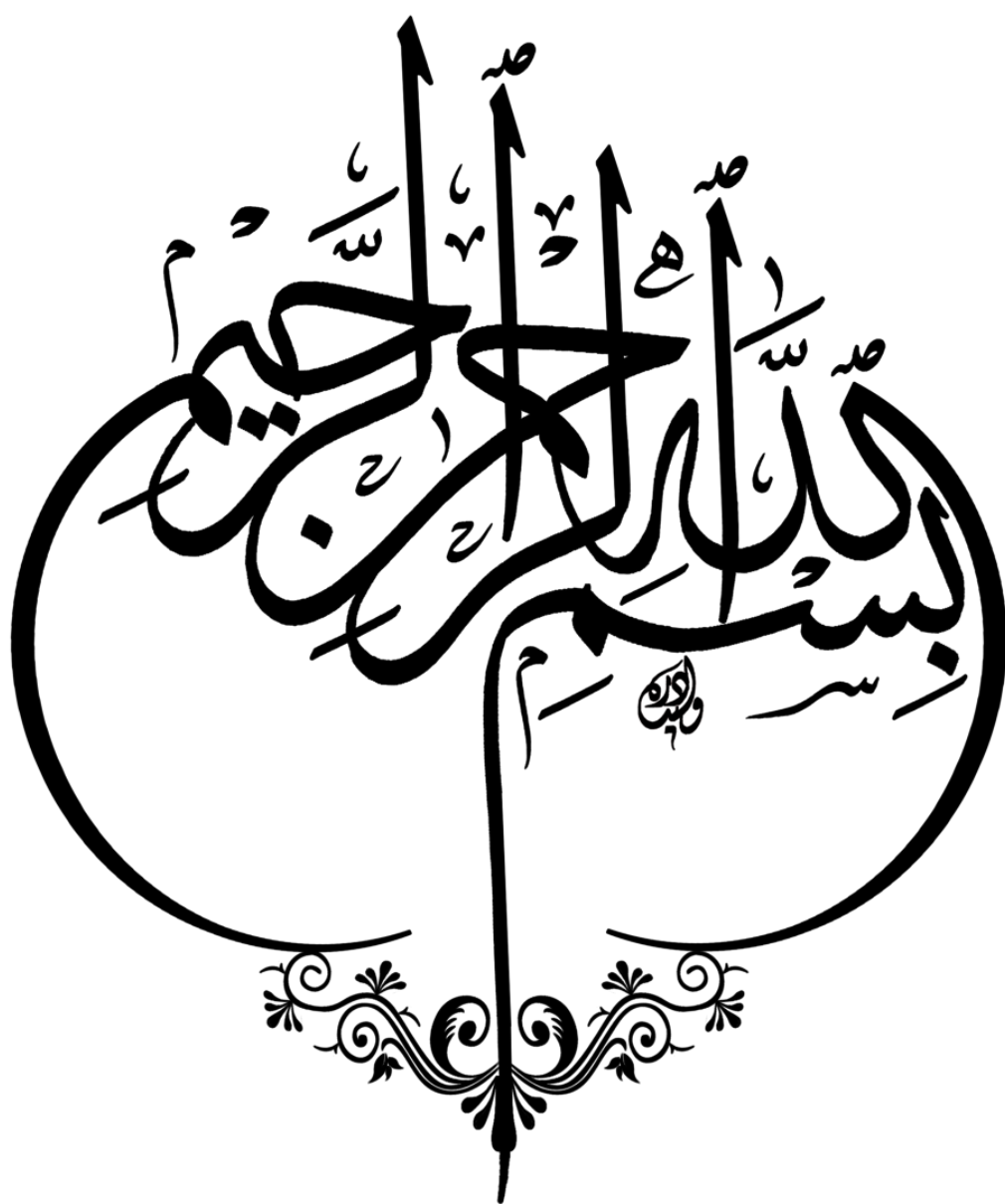
Encadreur

C.U.Mila

C.U.Mila

C.U.Mila

Année Universitaire: 2018/2019



Remerciement

Avant tout, nous remercions Dieu de nous avoir donné force et détermination pour mener à bien ce travail.

Nous remercions Mme Ben Serradj Wafa de nous avoir aidés et guidés dans notre travail.

Nous voudrions également exprimer notre profonde gratitude à Monsieur Kallab Rabeh d'avoir accepté le chef du jury pour notre soutenance.

Nous adressons nos sincères remerciements à M^{lle} Zaidi. S pour son honneur d'avoir accepté l'étude notre mémoire.

Dédicaces

Je dédi ce travail :

D'abord et avant tout ... Une prière sincère à mon père décédé Mouhamed boussof ... Puisse Allah éclairer votre tombe, pardonner vos péchés et vous maintenir en paix. Vous étiez fier et toujours fier de nous et de toute la famille ...

Je suis vraiment fier quand je dis que je suis sa fille ... Si je devais vous donner mon âge pour enregistrer mon nom en votre nom mais que je n'ai que beaucoup de mots d'expressions sincères. Vous étiez états la sagesse, la science et la virilité. Que Dieu ait pitié de vous.

À ma chère mère Akila qui m'a toujours aidée et guidée sur le chemin du succès.

Quoi que je fasse ... je ne peux pas te rendre ce que vous avez fait pour moi ...

Tout mon succès pour toi ... Dieu te garde et garde soin.

À mes parents Rabeh et Rabiaa Dieu vous bénisse.

À mes frères en général et à mon frère Mouaad en particulier, vous avez été le seul lien avec moi dans toutes les étapes de mon succès et merci vous ne suffirez pas pour ce que vous avez fait pour moi ...

À Mon fiancé Zohair.... Merci de m'avoir aidé à terminer mon travail ... Mille mercis pour tout ce que vous avez fait pour moi .. Je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi..... Merci d'être dans ma vie.

À tous les membres de ma famille Aicha Khaoula, Chahla, Hala, Intissar, Houda, Mahbouba, Saliha, Nacira, Wassila, Amani, Rihab, Iman, Nadjoua, Badra, Karima..... merci pour vous.

À tous mes amis..Ines, Aya, Amani, Abir, Mouna, Ilham, Cherifa, Chahla, Nejla, Yasmina..... Merci pour vos encouragements.

À tous ceux qui s'intéressent à ma réussite.

Hiba

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu, j'ai pu réaliser ce modeste travail que je

Dédie:

A mes chers parents,

Qui m'ont tout donné sans rien en retour

Qui ont toujours cru en moi

Je vous *aime* énormément.

A mes sœurs et mes frères

Fatiha, Nora, Fars ,Bilal , Foziya, Naaman

Vous êtes la lumière de ma vie sans votre présence je pourrai

Jamais avancer.

A mon chérie :

Walid, l'ange de ma vie

A mon promiseuse, M me Wafa

A mes amies que j'ai vécu avec elles des beaux moments au cours

De mon cursus à l'université.

A tous mes Enseignants

A tous mes Collègues

A toute personne qui me connaît.

Yasmin

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

Chapitre 1: milieux salins

I. Généralités	3
II. Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins	5
III. La vie en milieux hyper salins.....	6

Chapitre2: les moisissures

I. Généralités sur les champignons.....	8
II. Développement des moisissures	8
II.1. La phase végétative	8
II.2. La phase reproductive	11
II.2.1. Reproduction asexuée.....	11
II.2.2. Reproduction sexuée	12
III. Le mode de vie des moisissures	12
III.1. Saprophytes	12
III.2. Parasites	12
III.3. Symbiose	12
IV. Le mode de nutrition	13
V. Classification	14
VI. Ecologie	14
VII. Métabolites secondaires des moisissures	15
VII.1. Mycotoxines.....	15
VII.2. Antibiotiques	17

Chapitre 3:Matériel et méthodes

I. Matériel et méthode	19
I.1. L'agent pathogène	19
I.2. Isolement de l'agent antagoniste	20
I.2.1. Site d'étude et échantillonnage	20
I.2.2. Isolement et purification	23

I.3. Identification des isolats sélectionnés	26
I.3.1. Identification macroscopique.....	26
I.3.2. Identification microscopique	26
I.4. Etude de l'activité anti- bactérienne	27
I.4.1. Préparation des bactéries tests	27
I.4.2. Préparation des suspensions bactériennes	27
I.4.3. La technique des cylindres d'agar	27
I.5. Etude de l'activité enzymatique	28
I.5.1. Détermination de l'activité protéolytique	28
Chapitre 4:Résultats et Discussion	
I. L'agent pathogène.....	29
II. Isolement de l'agent antagoniste	29
III. Identification des souches isolées.....	30
III.1. Etude macroscopique.....	30
III.2. Etude microscopique	36
IV. Etude de l'activité anti-bactérienne.....	47
V. Etude de l'activité enzymatique	52
V.1. Détermination de l'activité protéolytique.....	52
Conclusion et Perspectives.....	54
Références bibliographiques	55

Annexes

Résumé

Liste des abréviations

Mg²⁺ : ion magnesium.

g/l : gramme/litre.

m : mètre.

Ca²⁺ : ion calcium.

% : Pourcent.

(p/v) : poids/volume.

Na⁺ : ion sodium.

K⁺ : ion potassium.

pH : Potentiel hydrogène.

Cl : chlore.

NaCl : chlorure de sodium.

M : Molarité.

µm : Micromètre.

°C : Degré Celsius.

- : Négative.

+ : Positif.

h : Heure.

cm : centimètre.

g : gramme.

PDA : Potato dextrose agar.

min : minute.

ml : millilitre.

MH : Mueller Hinton.

BN : Bouillon nutritif.

> : Supérieur.

< : Inférieur.

Liste de tableaux

Titre	Page
Tableau 1 : Composition ionique d'environnements hyper salins.	6
Tableau 2 : Exemples de mycotoxines de certaines moisissures.	16
Tableau 3 : Mycètes productrices d'antibiotiques.	17
Tableau 4 : Les caractéristiques des souches bactériennes utilisées.	19
Tableau 5 : Etude macroscopique des isolats fongique isolés à partir de la Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.	31
Tableau 6 : Etude microscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.	37

Liste de figures

Titre	Page
Figure 1 :(A) Marais salants de Costa Blanca en Espagne (thalassohalins), (B) la Mer Morte (athalassohalins).	3
Figure 2 : Photographie de Sebkha Ezzemoul Aïn M'lila (Algérie)	4
Figure 3 : Photographie Satellite du bassin versant d'El Eulma (Algérie)	5
Figure 4 : Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre	7
Figure 5 : Structure d'un hyphes et son développement vers la formation d'un mycélium	9
Figure 6 : les structures de talles filamenteux : hyphes cénocytique (à gauche), hyphes septés (à droite)	10
Figure 7 : Schématisation de la structure de la paroi fongique	10
Figure 8 : Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées.	11
Figure 9 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure.	12
Figure 10 : Schéma général de la dégradation des polymères et des oligomères et de l'absorption des monomères chez les champignons et pseudo-champignons.	13
Figure 11 : Situation géographique de site d'étude (Sebkhet Ezzemoul) (Carte topographique de Constantine Echelle 1/200.000) (Source : INSID)	21
Figure 12 : Photos de sebkha Ezzemoul d'Ain M'Lila prises en mois de février.	22
Figure 13 : Site d'échantillonnage à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.	23
Figure 14 : Le milieu de culture PDA préparé.	24
Figure 15 : Méthode de dilution	25
Figure 16 : Ensemencement des isolats de moisissures.	25
Figure 17 : Purification de moisissures	26
Figure 18 : Boîte de Pétri présentant l'activité des isolats obtenus vis-à-vis les bactéries pathogènes.	28
Figure 19 : Isolats de moisissures du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes de Sebkha Ezzemoul d'Ain-m'lila de différents pourcentages de NaCl.	29

Figure 20 : La flore fongique isolée sur le milieu PDA à partir de Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.	47
Figure 21 : différents zones de lyses obtenues par dix souches vis-à-vis les bactéries testées.	48
Figure 22 : La variation de la zone d'inhibition entre différentes souches et <i>E.coli</i> .	49
Figure 23 : Variation de la zone d'inhibition en fonction des espèces de moisissures isolées contre <i>P.aeruginosa</i> .	50
Figures 24 : La variation de la zone d'inhibition entre des différentes souches et <i>B.cereus</i>	51
Figure 25 : Résultat de la croissance des souches protéolytique sur gélose au lait.	53

Introduction

Introduction

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant, leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances (Boughachiche *et al.*, 2011). A cela s'ajoute le fait que les antibiotiques sont absolument indispensables pour le traitement de la quasi-totalité des maladies infectieuses amenant la plupart des industries pharmaceutiques à orienter leurs recherches vers deux axes principaux : la recherche de nouveaux médicaments et le contrôle des phénomènes de résistance des bactéries aux antibiotiques (Olaitan *et al.*, 2014).

En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multi-résistance de bactéries pathogènes (Tchamba *et al.*, 2014), la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes et ceci particulièrement dans les pays en développement en général et ceux d'Afrique Subsaharienne en particulier, en raison de l'inexistence de réglementation et de contrôle (Diande, 2010; Savadogo et Traoré, 2011; Bagré *et al.*, 2015). Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules d'antibiotiques (Boughachiche *et al.*, 2011).

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 extrêmes serait fort probable d'au temps plus, qu'il a été prouvé que les moisissures isolées à partir des milieux extrêmes, notamment, hypersalins, 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 antibactérienne d'isolats fongiques sélectionnés à partir de sebkha d'Ezzemoul, AinM'Lilla. Pour ce faire, ce travail comporte les parties suivantes :

- Chapitre 1 et 2: une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur les moisissures, les environnements hypersalins.
- Chapitre 3: présente la méthodologie développée pour cette étude. Décrit le site d'étude et les différentes techniques utilisées.
- Chapitre 4: présente les résultats obtenus au cours de ce travail.

Chapitre 1:

Milieux salins

I. Généralités

Les environnements hyper salins sont définis comme étant des milieux contenant des concentrations en sels plus élevées que celles de l'eau de mer. Cependant, pour une définition plus spécifique des environnements hyper salins, on doit tenir compte, mis à part la concentration en sel, de l'origine de l'eau et des types de sels (Das-Sarma et Arora, 2001). L'origine des sels responsables de cette salinité est diverse : marine actuelle ou ancienne, pétrographique due aux ions libérés par l'altération de certaines roches sédimentaire, volcanique, hydrothermale et éolienne apportée par des embruns; elle est aussi très souvent anthropique induite par la mise en valeur hydroagricole et autres aménagements (eaux d'irrigation, remontées de nappes phréatiques, engrais, solutions nutritives des serres et des cultures hors sol, effluents urbains, etc.) (Loyer, 1991).

La concentration de sels et leur nature est variable et ils peuvent être classés dans l'une des deux catégories suivantes: thalassohaline ou athalassohaline (Rachel Sarah, 1998).

Les thalassohalins qui sont des environnements tenant leur origine de l'évaporation des eaux de mer, de tels environnements aquatiques sont désignés sous le nom de thalassohalins (du grec thalasso, la mer) (McGenity *et al.*, 2000 ; Oren, 2002 ; Oren, 2006). Leurs sels minéraux sont dans les mêmes proportions que celles contenues dans l'eau de mer (Litchfield et Gillevet, 2002 ; Grant, 2004 ; Gerday et Glansdorff, 2007) ; l'autre groupe correspond aux environnements **athalassohalins** dont la composition ionique diffère complètement de celle de l'eau de mer (Litchfield et Gillevet, 2002; Oren, 2002; Roussel *et al.*, 2008).

La figure 1 présente un exemple de chaque type d'environnements hyper-salins.



Figure 1 :(A) Marais salants de Costa Blanca en Espagne (thalassohalins) (Falb et al.,2005)
,(B) la Mer Morte (athalassohalins) (Sapin, 2009)

Les deux plus grands lacs hyper-salés étudiés sont: le Grand Lac Salé à l'Ouest des Etats Unis et la Mer Morte au Moyen Orient qui est la plus profonde avec 340 m ayant aussi une grande concentration en magnésium (Mg^{2+}) (44 g/l) (Das-Sarma et Arora, 2001).

Outre ces deux principaux lacs, il existe des environnements pouvant faire l'objet d'études. Il s'agit des Chotts et Sebkhass qui sont des vases salées périodiquement inondables surtout pendant la saison des pluies et recouvertes par des croûtes salines pendant la saison sèche (Figure 2).



Figure 2: Photographie de Sebkhass Ezzemoul Aïn M'lila (Algérie) (Kharroub, 2007).

Ces Chott et Sebkhass sont des cuvettes fermées à l'intérieur d'un Bassin versant qui a une fonction de collecteur: il recueille les précipitations et les transforme en écoulements depuis les sommets des reliefs montagneux, appelés lignes de crêtes, qui le délimitent jusqu'à ces cuvettes et par conséquent les alimente en eau (Demdoum, 2010).

La figure 3 montre un exemple de bassin versant. Il s'agit de celui d'El Eulma dans la Wilaya de Sétif (Algérie) regroupant des Chotts et Sebkhass.



Figure 3: Photographie Satellite du bassin versant d'El Eulma (Algérie) (Bouali et Brahimi, 2011).

II. Caractéristiques physico-chimiques des environnements hypersalins

La salinité des saumures se définit comme la somme des cations et des anions qu'il contient. Le principal sel, présent en quantité quasi inépuisable dans les mers, océans, lacs salés et aussi dans les mines de sel, est le chlorure de sodium. La majorité des eaux hypersalines contient 8 à 10 fois plus de sels dissous totaux que l'eau de mer (Caumette, 1998).

Dans les environnements thalassohalins l'eau de mer est concentrée par évaporation, tous les sels présents augmentent leurs concentrations dans les mêmes proportions jusqu'au seuil de précipitation. Les carbonates précipitent sous forme de carbonates de Ca^{2+} dès que la salinité atteint 6 % (p/v). Ensuite, le sulfate précipite et forme des dépôts de gypse (sulfate de Ca^{2+}) dès que la salinité dépasse 10% (p/v). Au-delà de 25 % (p/v), le chlorure de Na^+ commence à précipiter sous forme d'halite et précipite pleinement à 34 % (p/v) (10 fois la concentration de l'eau de mer). Les eaux sont par la suite enrichies en ions Mg^{2+} et K^+ dont les sels précipitent à des salinités 20 fois supérieures à celle de l'eau de mer (Blatt *et al.*, 1980 ; Rodriguez-Valera *et al.*, 1985).

En environnement athalassohalins, en plus de l'ion Na^+ , d'autres ions prédominent, comme l'ion Mg^{2+} dans la Mer Morte (Kharroub, 2007). Alors que les lacs hypersalés sodés présentent une autre variation dans la composition ionique. Il y'a prédominance des carbonates et des chlorures comme anions et le Na^+ comme cation. Le pH des lacs

hypersalins d'origine thalassohalines est généralement proche de la neutralité ou légèrement alcalin (Litchfield,1998) (Tableau 1). Alors que celui de la Mer Morte (origine athalassohaline) est légèrement acide (Oran, 2002). La saturation des eaux due à l'évaporation réduit encore le pH et la solubilité de l'oxygène. Mais l'agitation des eaux de surfaces par le vent permet l'aération et donc la disponibilité de l'oxygène pour les microorganismes aérobies des couches superficielles (Litchfield, 1998).

Tableau 01 : Composition ionique des environnements hyper-salins (Litchfield, 1998)

Composition ionique	Concentrations (g/l)					
	Lac Magadi (Kenya)	Lac Naturn Zugm (Egypte)	Grand Lac Salé de l'Utah (USA)	Mer Morte (Moyen Orien)	Eau de mer	Bassin de cristallisation de San Diego (USA)
Na ⁺	46	142	105,4	40,1	10,6	120
K ⁺	0,06	2,3	6,7	7,65	0,8	52
Ca ²⁺	0,0007	0,0	0,3	17,2	0,40	3,01
Mg ²⁺	-	0,0	11,1	44	1,27	14,4
Cl ⁻	14	154,6	181	224,9	18,9	210
CO ₃ ⁻	34,9	67,2	0,27	0,077	0,14	24,5
SO ₄ ²⁻	-	22,6	27	0,45	2,65	-
Azote total	0,038	-	4,3-7,2	-	-	-
pH	10,35	11	7,7	5,9-6,3	8,1	-

('-' non déterminé)

Dans le cas des Chotts et Sebkhas, les ions calcium et magnésium (Ca²⁺ et Mg²⁺) proviennent du lessivage des calcaires et dolomites constituant les massifs, l'ion sodium (Na⁺) provient surtout du lessivage des faciès triasiques salifères et des formations récentes Mio-Plio-Quaternaires ce qui explique aussi les grandes concentrations en chlore (Cl) (Demdoum, 2010).

III. La vie en milieux hyper salins

Il est clair que les halophiles sont trouvés dans les trois domaines: Archaea, Bacteria et Eukarya (Oran, 2002). La Figure 4 indique que ces domaines contiennent des représentants halophiles.

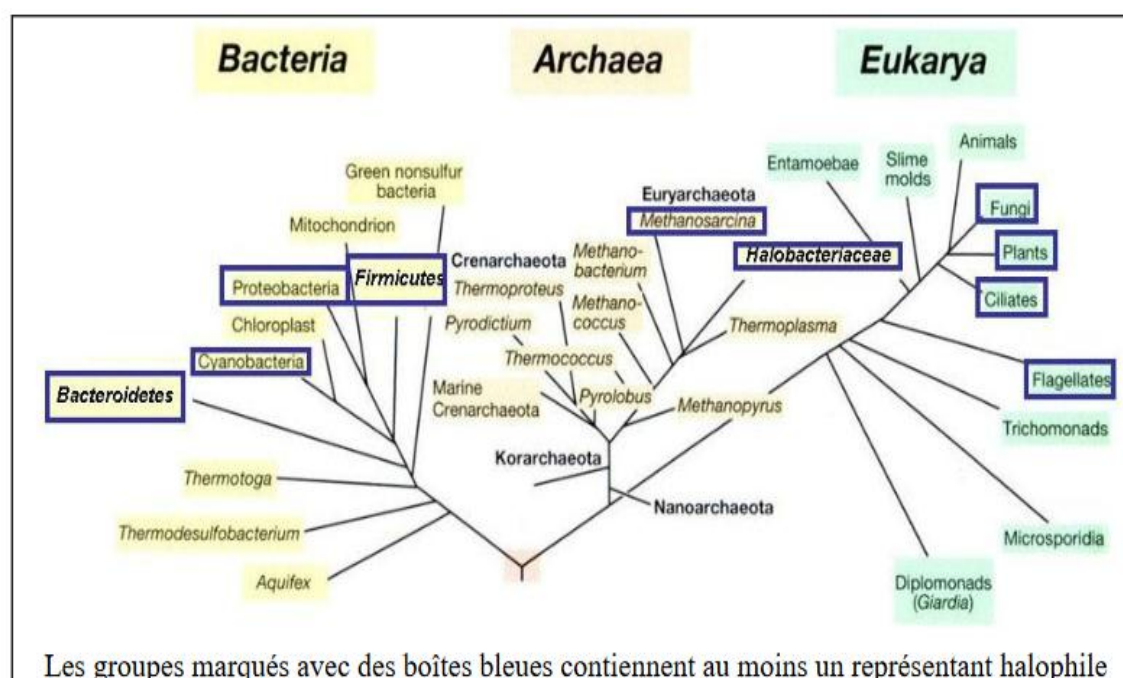


Figure 4: Arbre du vivant et la distribution de microorganismes halophiles dans l'arbre (Oren, 2008).

Dans le domaine Archaea, nous trouvons la plupart des microorganismes exigeant en sel dans l'ordre *Halobacteriales*, qui contient une seule famille, *Halobacteriaceae*. L'Halophilisme est répandu dans le règne bactérien: le phylum *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*.

Avec quelques exceptions notables, bien que les micro-organismes adaptés aux fortes concentrations en sels soient largement répandus parmi les règnes des archées et des bactéries (Oren, 2008). La vie eucaryote à de fortes concentrations salines est aussi possible. Parmi les eucaryotes halophiles, on retrouve des micro-organismes comme des champignons et des algues, ainsi que des macro-organismes comme la crevette *Artemia* retrouvée pour des concentrations de 150-200 g.L⁻¹ de sels (Oren, 2011). Des protozoaires flagellés ont été observés dans des étangs artificiels (Cho, 2005).

La concentration en sel requise pour la croissance et maximale supportée dépend souvent de la composition du milieu et de la température de croissance. Les définitions les plus utilisées ont été formulées il y a trente ans par Kushner qui distingue des catégories différentes: Halophiles extrêmes (2,5 à 5,2 M de NaCl), halophiles modérés (0,5 à 2,5 M de NaCl) et les microorganismes qui ne montrent pas d'exigence absolue en sel pour la croissance (Oren, 2008).

Chapitre 2 :
Les moisissures

I. Généralités sur les champignons

Historiquement, les champignons ont été considérés pendant longtemps comme une partie du règne végétal en raison de la ressemblance avec les plantes dans le fait, à quelques exceptions, qu'ils ont des parois cellulaires définies, sont non mobiles et se reproduisent par l'intermédiaire des spores (du grec spora: semence, spore) (Nasraoui, 2015).

Les champignons ou Fungi sont des organismes eucaryote uni ou pluricellulaires, hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes. Le terme «moisissure», au sens large, inclut les champignons filamenteux (mucorales, ascomycètes et deutéromycètes) (Reboux *et al.*, 2010).

Ils sont microscopiques, ubiquistes qui regroupent des milliers d'espèces. Ce sont des saprophytes dont le rôle est de dégrader la matière organique morte ou quelque fois vivante (Bush et Prochnau, 2004). Les moisissures fait généralement référence à leur aspect macroscopique. Sur le substrat colonisé, elle se représentant en texture laineuse, poudreuse et cotonneuse (Deleu *et al.*, 1999).

On peut distinguer deux grands types de moisissures:

- Les moisissures utiles:** qui sont utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés organoleptiques et technologiques supérieures comme le *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* en fromagerie, *Penicillium jensenii* ou *nalgiovense* en salaisonnerie (Sarah, 2011).

- Les moisissures nuisibles:** qui peuvent se développer sur différents substrats et entraîner une altération des qualités nutritionnelles et diététiques des produits. Ainsi, on estime que le développement incontrôlé de micromycètes est à l'origine de la perte de 5 à 10 % des récoltes mondiales (Filtenborg *et al.*, 1996).

II. Développement des moisissures

Le développement des moisissures comprend deux phases: une phase végétative et une phase reproductive (Davidson *et al.*, 1996).

II.1. La phase végétative

Les champignons filamenteux sont hétérotrophes et manquent de chlorophylle. Ils n'ont pas de tissus et par conséquent ils ne possèdent ni racines, ni tiges, ni feuilles, ni système vasculaire. Leur corps somatique (ou végétatif) est appelé thalle. Les thalles fongiques sont généralement filamenteux et multicellulaires (Nasraoui, 2015).

Le thalle est composé de filaments ou hyphes. Ces hyphes comprennent les organites classiques d'une cellule: noyau, mitochondrie, cytoplasme et vésicules (Sarah, 2011). l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium (Ghorri, 2015).

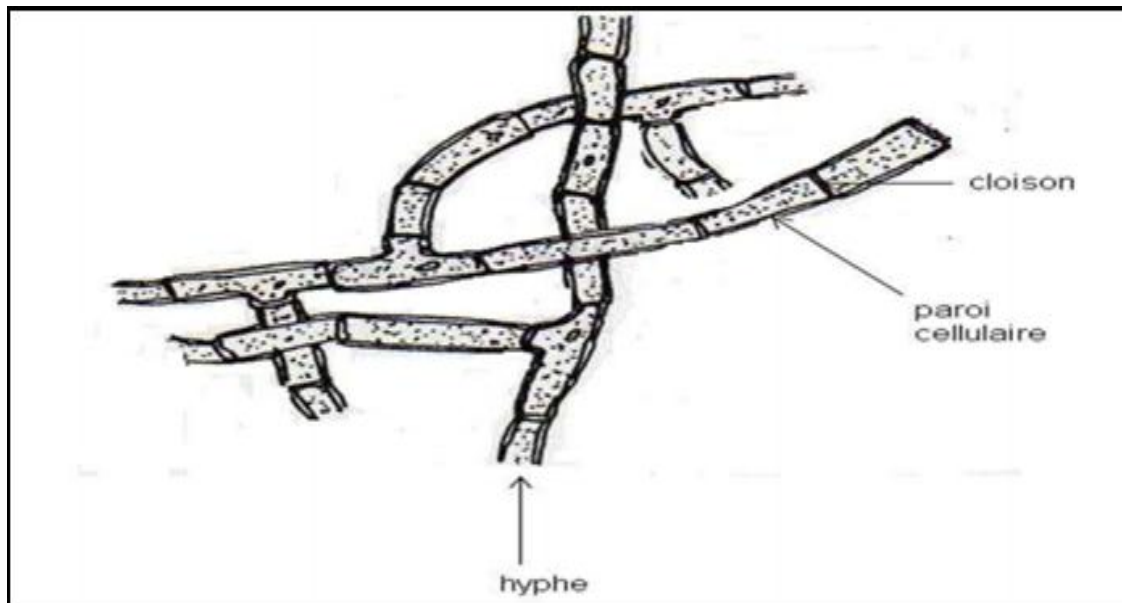


Figure 5: Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium (Chabasse *et al.*, 2002).

Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou Siphonné alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou septé (Girbardt, 1957 ; Trinci, 1969 ; Gregory, 1984 ; Bartnicki-Garcia, 2002) (Figure 6).

Les cloisons, appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules. Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes (Aurélien, 2013).

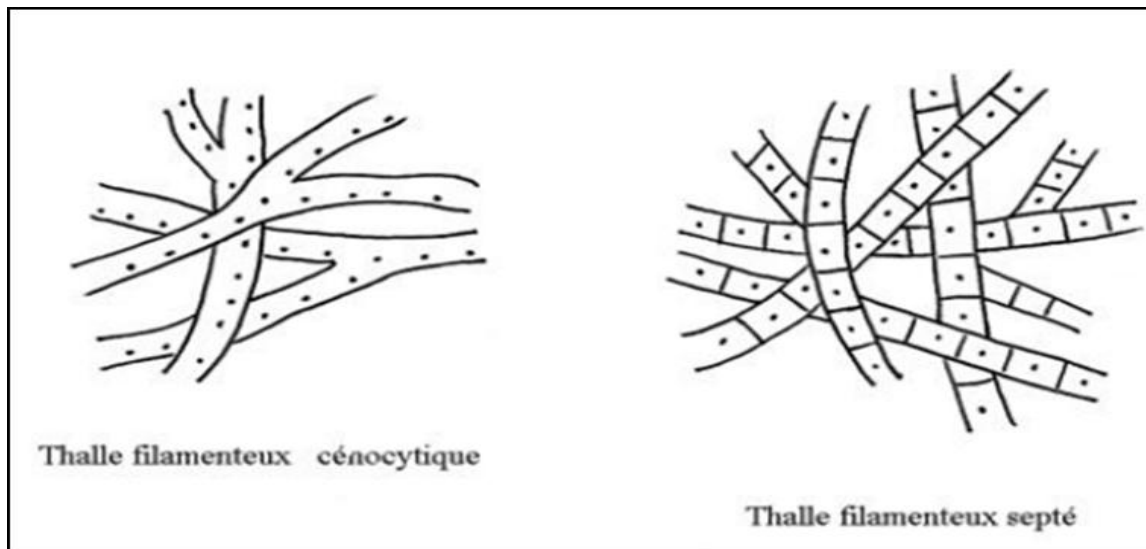


Figure 6 : les structures de talles filamenteux: hyphe cénocytique (à gauche), hyphe septé (à droite) (Nasraoui, 2015).

La paroi des champignons filamenteux constitué de: glycoprotéines qui jouent un rôle dans l'adhérence; mannoprotéines qui forment une matrice autour de la paroi et essentiellement de polysaccharides qui sont majoritairement la chitine, un polymère linéaire de polysaccharide azoté, la N-acétylglucosamine ; les sous-unités étant liées par des ponds β -1,4-glycosidiques et les glucanes, polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons β (Aurélien, 2013). Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire. (Nwe et Stevens, 2008).

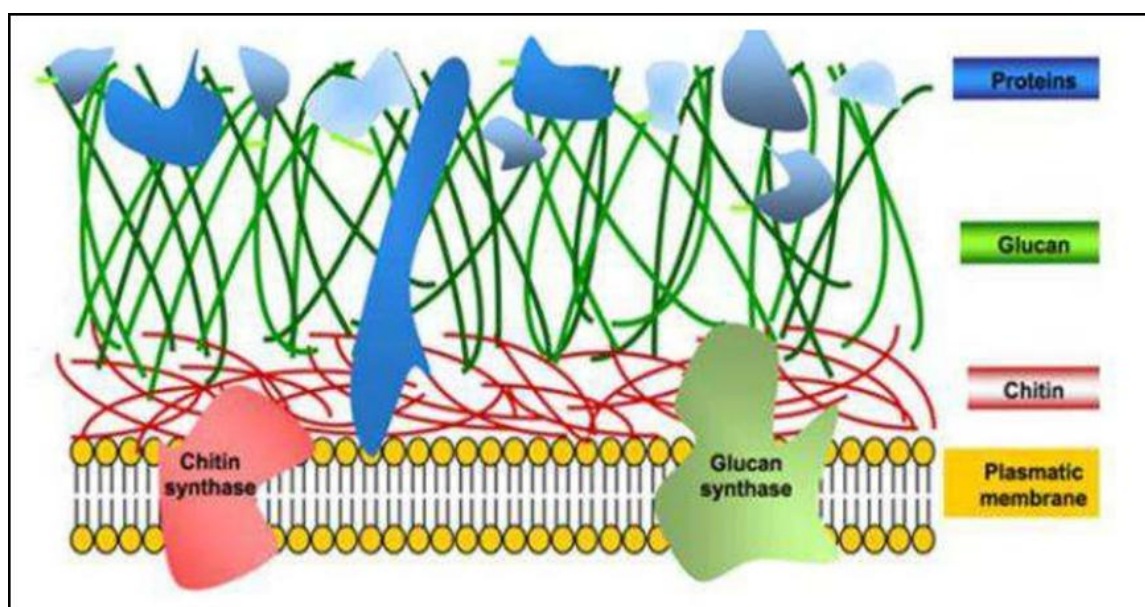


Figure 7: Schématisation de la structure de la paroi fongique (Nwe et Stevens, 2008).

II.2. La phase reproductive

Les champignons filamenteux se reproduisent par des spores. Leur cycle de propagation est assuré par deux types de spores: l'un intervenant dans la reproduction sexuée (stade parfait), l'autre dans la multiplication asexuée (stade imparfait) (Linas *et al.*, 1998).

II.2.1. Reproduction asexuée

La reproduction asexuée caractérisée par la dispersion de spores asexuées, permettant la propagation des moisissures afin de coloniser d'autres substrats. Cette forme de reproduction asexuée est appelée la sporulation (Adams *et al.*, 1998).

Il y'a plusieurs formes de reproduction asexuée et plusieurs types de spore: les spores peuvent être le résultat de la fragmentation d'un fragment parent de mycélium (arthrospores), elles peuvent aussi être produites de manière endogène à l'intérieur du sporocyste (sporocystiospores), ou de manière exogène en continu à l'extrémité des structures spécialisées appelées phialides (conidiospores) (Figure 08) (Aurélien, 2013).

Ces spores sont indispensables pour contaminer les nouveaux milieux par l'air ou par l'eau ou par des insectes quand le premier est épuisé (Fréalles *et al.*, 2017). Si les conditions favorables (substrat, chaleur, température, humidité) les spores vont germer et les logettes vont produire un tube germinatif, puis un mycélium ou vont se différencier des conidiophores à partir desquels vont se former les spores (Linas *et al.*, 1998).

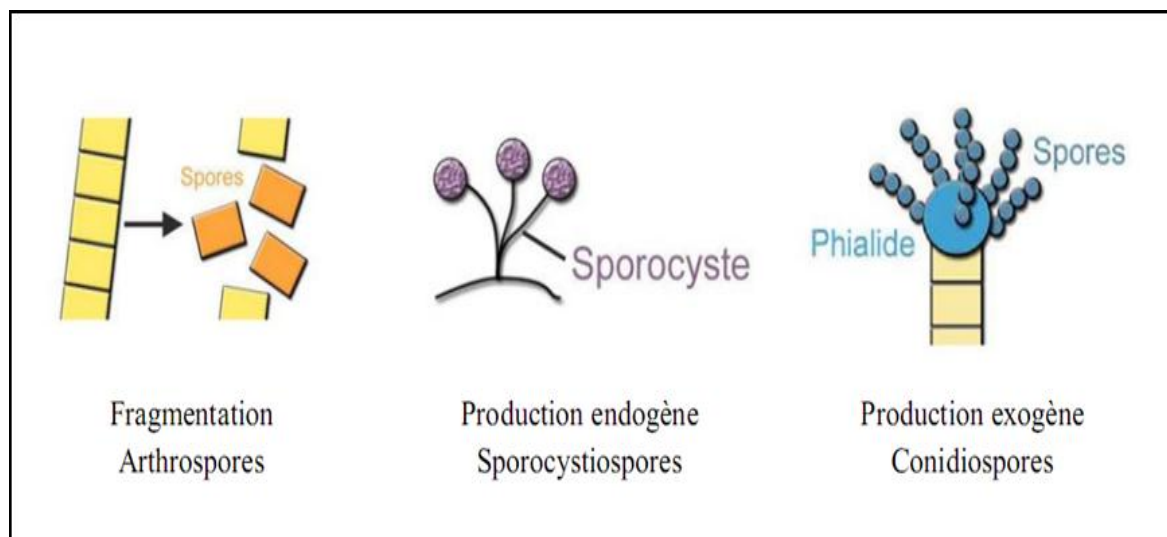


Figure 8 : Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées (Barnett et Hunter 1998).

II.2.2. Reproduction sexuée

Le cycle sexuel des champignons se déroule en trois étapes: plasmogamie, caryogamie et méiose (Ghorri, 2015).

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 Watkinson, 1994).

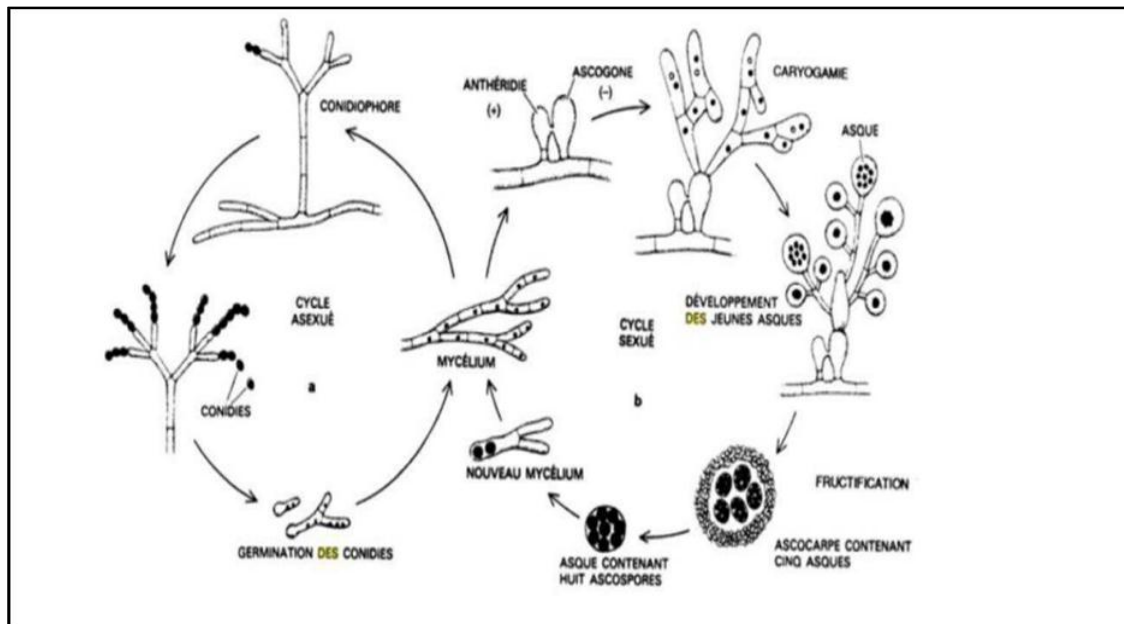


Figure 9: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure (Ghorri 2015).

III. Le mode de vie des moisissures

III.1. Saprophytes

La quasi-totalité des moisissures vivent aux dépens de la matière organique en décomposition. Ce sont des agents de recyclage de la matière minérale dans la nature (Kachour, 2004).

III.2. Parasites

Exploitent la matière organique vivante, qu'il s'agisse des végétaux, ou animaux, ou même d'autres mycètes (Lutzoni *et al.*, 2004).

III.3. Symbiose

Les associations symbiotiques entre champignons et végétaux supérieurs (mycorhize) constituent la forme de symbiose la plus répandue à l'échelle planétaire (Ghorri, 2015). Chacun des deux organismes tire le bénéfice de l'autre (Kachour, 2004).

IV. Le mode de nutrition

La majorité des moisissures sont exigeantes en éléments nutritifs nécessaires à leur croissance (Delphine, 2012).

Les éléments nutritifs les plus importants sont le carbone et l'azote comme composés organiques, les ions minéraux comme le potassium, le phosphore, le magnésium, le fer ou le soufre (Aurélie, 2013). Certains champignons, tels que les espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium*, préfèrent des sucres simples et se développent très rapidement (ils sont appelés « sugarfungi ») (Delphine, 2012). Donc les acides aminés peuvent pénétrer dans la cellule sans transformation, alors que des molécules complexes comme l'amidon, la cellulose ou les protéines nécessitent une digestion enzymatique préalable (Aurélie, 2013).

Cette digestion est réalisée par des enzymes extracellulaires qui contrôlent les réactions d'hydrolyse qui dissocient les grosses molécules en composants plus simples. La dégradation complète des gros polymères en molécules simples solubles est un processus où différentes enzymes extracellulaires sont impliquées. Une fois la molécule simple est absorbée dans la cellule, elle passe sous l'action des enzymes intracellulaires (Figure 10).

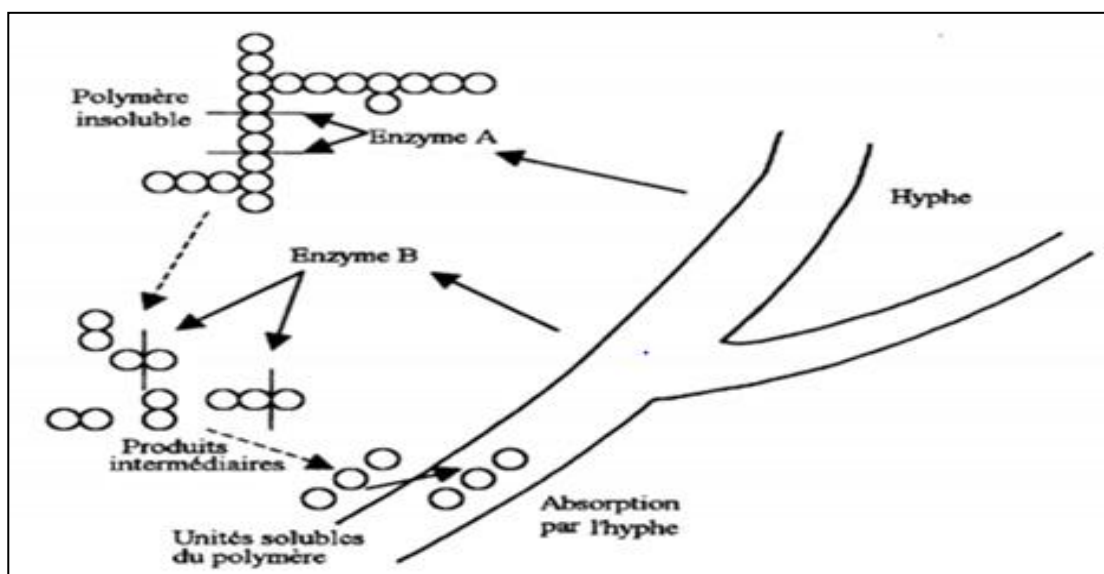


Figure 10: Schéma général de la dégradation des polymères et des oligomères et de l'absorption des monomères chez les champignons et pseudo-champignons

Les enzymes digestifs (intracellulaires et extracellulaires) peuvent ne pas être présents tout le temps dans le champignon. Ainsi, la synthèse de certaines de ces enzymes peut être induite par la disponibilité d'un élément nutritif particulier. Un milieu contenant la cellulose, par exemple, peut induire chez un champignon la production de cellulase qui dégrade cette substance. Par contre, l'absorption d'un élément nutritif particulier par les champignons peut être réprimée par la présence d'un autre élément nutritif plus facile à absorber. Par exemple,

un champignon peut utiliser préférentiellement le glucose et n'absorbe pas le saccharose, le maltose ou le galactose jusqu'à ce que le glucose soit épuisé (Nasraoui, 2015).

V. Classification

La classification des champignons filamenteux est en constante évolution. Pendant longtemps, elle s'est appuyée sur celle de Hawksworth, Sutton et Ainsworth, (1995), Fondée sur des caractères morphologique simple, elle a longtemps fait références, nécessitant une réorganisation de la taxinomie.

La classification, proposée par Know Chung et Benet, (1992), actualisée par Sutton *et al.*, (1998) et de Hoog et Guarro, (2000), fait référence aujourd'hui.

On différencie quatre divisions selon les modalités de la reproduction sexuée: les Chytridiomycotina, les Zygomycotina, les Ascomycotina et les Basidiomycotina. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits (Ounadjela. 2016).

VI. Ecologie

Les champignons filamenteux ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*.

On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes (Florent, 1993). 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.

Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur intense, manque d'eau), ce sont des spores particulières qui constituent les formes de résistance (pouvant régénérer un mycélium plusieurs dizaines d'années après sa formation). Etant donné leur mode de nutrition, les champignons peuvent, à la différence des autres végétaux, pousser dans une obscurité complète (grotte). Ils peuvent aussi vivre à des profondeurs de 3 200 m dans le sol (Locquin, 1984).

VII. Métabolites secondaires des moisissures

Les champignons filamenteux possèdent une capacité remarquable à se développer sur des substrats variés et relativement simple dont ils arrivent à utiliser les éléments constitutifs comme nutriments. Au cours de leur développement, ils produisent aussi des métabolites secondaires. Ces molécules sont synthétisées en réponse à différents types de signaux environnementaux (abiotiques et biotiques) (Richard, 2008).

Les produits du métabolisme "secondaire" non indispensables au fonctionnement de la cellule sont plutôt stockés en région subapicale. Les métabolites secondaire les plus connus sont les pigments, les antibiotiques, les mycotoxines (Roquebert, 1997).

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 and 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.*, 1994 ; Hapwood, 1988 ; Alspaugh *et al.*, 1997).

VII.1. Mycotoxines

Le terme mycotoxine vient du grec « mycos » qui signifie champignon et du latin «toxicum» qui signifie poison. (Bhatnagar *et al.*, 2004).

Les mycotoxines, métabolites secondaires dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques (Youcef, 2014).

A ce jour, 300 à 400 mycotoxines sont connues (Pamel *et al.*, 2011). Il s'agit de petites molécules peu solubles dans l'eau, peu volatiles et difficilement métabolisées par les organismes vivants (Ruppel *et al.*, 2004). Ces molécules, à froid ou à chaud, sont très stables et sont électriquement neutres (Crespy, 2005). Elles sont considérées comme un moyen de défense pour les champignons contre les parasites ou contre d'autres organismes en concurrence dans le même environnement (Youcef, 2014). Il existe des centaines de mycotoxines différentes qui diffèrent de par leur composition chimique et leurs effets sur les animaux et l'homme (Yiannikouris et Jouany, 2002).

Les mycotoxines qui sont produites par de nombreuses moisissures, dotées génétiquement d'un pouvoir toxigène (Reboux, 2006). Plus de 150 moisissures mycotoxinogènes sont connues actuellement, elles appartiennent principalement aux genres *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium*, *Fusarium* (Pamel *et al.*, 2011) (tableau 02).

Deux groupes de champignons (ou moisissures) toxigènes (producteurs de mycotoxines) peuvent être distingués. Le premier groupe est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant la ou les mycotoxine(s) sur les plantes au niveau du champ: il sera question de « toxines de champs ». L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte (Afssa, 2009).

Tableau 02: Exemples de mycotoxines de certaines moisissures (Halewyn *et al.*, 2001).

GENRE	ESPECES	PRINCIPALES MYCOTOXINES
Alternaria	A. alternata	Altértoxine I, II, alterariol, altenuisol, acide tenuazoïque
Aspergillus	A. flavus	Aflatoxine B1 et B2, citrine
	A. fumigatus	Fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgène, gliotoxine, acide helveolique, etc.
	A. niger	Acide oxalique
	A. versicolor	Aspercolorine, sterigmatocystine, versicolorine
Chaetomium	C. spp	Chaetomine
	C. globosum	Chasetoglobosine
Cladosporium	C. spp	Cladosporine, émodine, acide épycladosporique
Fusarium	F. spp	Trichotécènes (type B), toxine T2, fumonisine, vomitoxine, zearalenone
Memnoniella	M. spp	Griseofulvines, trichotécènes, (trichodermol, trichodermine)
Penicillium	P.brevicompactum	Brevianamide A, acide mycophénolique
	P. expansum	Citrinine, patuline
	P. viridiatum	Acide pénicillique, griseofulvines, ochratoxines, brevianamide A, acide mycophenolique
Stachybotrys	S.chartarum	Trichotécènes: satratoxine F, G et H, lacone, roridine, trichoverrine, sporidesmine G, verrucarine J
Trichoderma	T.viride	Trichodermine, trichoverrine, stratoxine, gliotoxine, fumitremorgène, iso-cyanide, toxine T-2.

VII.2. Antibiotiques

Sur base de l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec *anti* : contre, *mikros* : petit et *bios* : vie), on définit un composé de ce type comme toute substance capable d'agir contre la vie des microorganismes. L'adjectif antibiotique (du grec *anti* : contre, *biotikos* : concernant la vie) utilisé pour la première fois en 1889, en référence à une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, se précisera plus tard, comme une substance chimique produite par un microorganisme et disposant en solution diluée de la capacité d'inhiber sélectivement la croissance voir même de détruire d'autres microorganismes (Muylaert et Mainil., 2012).

Les antibiotiques sont des substances naturelles ou synthétiques possédant une toxicité sélective et capables d'inhiber la croissance d'une bactérie ou de la tuer. On parlera de bactériostase dans le premier cas, et de bactéricidie dans le second. Un antibiotique peut avoir une activité bactériostatique à faible dose et une activité bactéricide à forte dose (Jason, 2017).

Parmi un total de quelques 10700 antibiotique décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons (Botton *et al.*, 1990).

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 03: Mycètes 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>	Céphalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Cérulinine
<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>	Griséoflavin

Bien que les antibiotiques ne soient pas obligatoires pour la sporulation chez les mycètes, cependant, certains d’eau stimulent la formation des spores et empêchent la germination (Demain et Fang ,2000).

Matériel et méthodes

I. Matériel et méthodes

Ce présent travail a été réalisé durant la période de Mars à Mai au niveau du laboratoire des sciences de la nature et de la vie, département Biologie, Centre universitaire Abdelhafid Boussof Mila, et basé sur l'étude de l'activité antibactérienne des moisissures isolées à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes de Sebkha Ezzmoul d' Ain M' Lila.

I.1. L'agent pathogène

L'agent pathogène utilisé dans ce travail est composé de trois souches bactériennes de références ont été testées: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus cereus* connus comme étant pathogènes, présentant un danger potentiel sur la santé humaine. Ces souches bactériennes ont été obtenues auprès du laboratoire de contrôle de qualité et de la conformité « Ghaouat » d'Ain M' Lila. Les caractéristiques des souches sont citées dans le tableau 04.

Tableau 04: Les caractéristiques des souches bactériennes utilisées.

Famille	Genre et espèce	Gram	Référence
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia coli</i>	Négatif	ATCC11303
<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC27853
<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus cereus</i>	Positif	ATCC10987

Les bactéries ont été réactivées sur le bouillant nutritif (Annexe 03) (Bauer *et al.*, 1966). Puis incubées à 37°C pendant 24h.

I.2. Isolement de l'agent antagoniste

I.2.1. Site d'étude et échantillonnage

I.2.1. 1. Site d'étude

La région des zones humides Sud-Constantinois, située dans les hauts plateaux du Nord Est d'Algérie (Messai *et al.*, 2016). Elle constitue un patrimoine naturel remarquable en raison de leur richesse biologique et écologique. Elle est composée d'une vingtaine de sebkha ou chotts (Samraoui *et al.*, 2006). Elles sont fortement productrices par la présence de tous les maillons de la chaîne alimentaire et hébergent entre autre une biodiversité aquatique remarquable (Barkat, 2004). Ces zones humides, en tant que ressources naturelles présentent des intérêts scientifiques, économiques et esthétiques. Elles sont d'une grande importance pour les programmes de recherche et pour la conservation biologique (Bouaguel, 2013). Ils sont les écosystèmes plus productifs dans le monde (Nasirian *et al.*, 2014). Au cours de ce travail, la sebkha Ezzemoul a été choisie comme site étude.

Sebkha Ezzemoul est un lac salé avec un important encroûtement de sel (Moali et Remichi, 2009). Localisée dans la région d' Ain M'Lila (wilaya d'Oum El Bouaghi). Elle est située dans la dépression formée par la gamme côtière des montagnes, au Nord, la petite Kabylie et au Sud le massif de l'Aurès (35°53'N, 6°30'E). Soit à 800 mètres au Sud-Est de la route nationale principale (N3) reliant Constantine à Batna qui la sépare du chott de Tinnsilt (Figure 11 et 12). Elle a une superficie de 4400 hectare et une profondeur de 0,6 mètre. Cette sebkha est constituée par dépression retenant les eaux météoriques, est selon les définitions usuelles en limnologie, un véritable lac. C'est un type d'environnement athalassohalin largement distribué en Afrique du Nord (Kharroub, 2007). Elle est limitée par une prairie à base d'une végétation halophile (Salsolacées, Poacées et Chénopodiacées) et par des terrains agricoles à céréales (Moali et Remichi, 2009). Elle comprend 12 tables salantes (bassins de concentration) et un bassin de cristallisation, destinés à la production de sel et connu sous le nom de « salin de OuledZouai » (Kharroub, 2007).

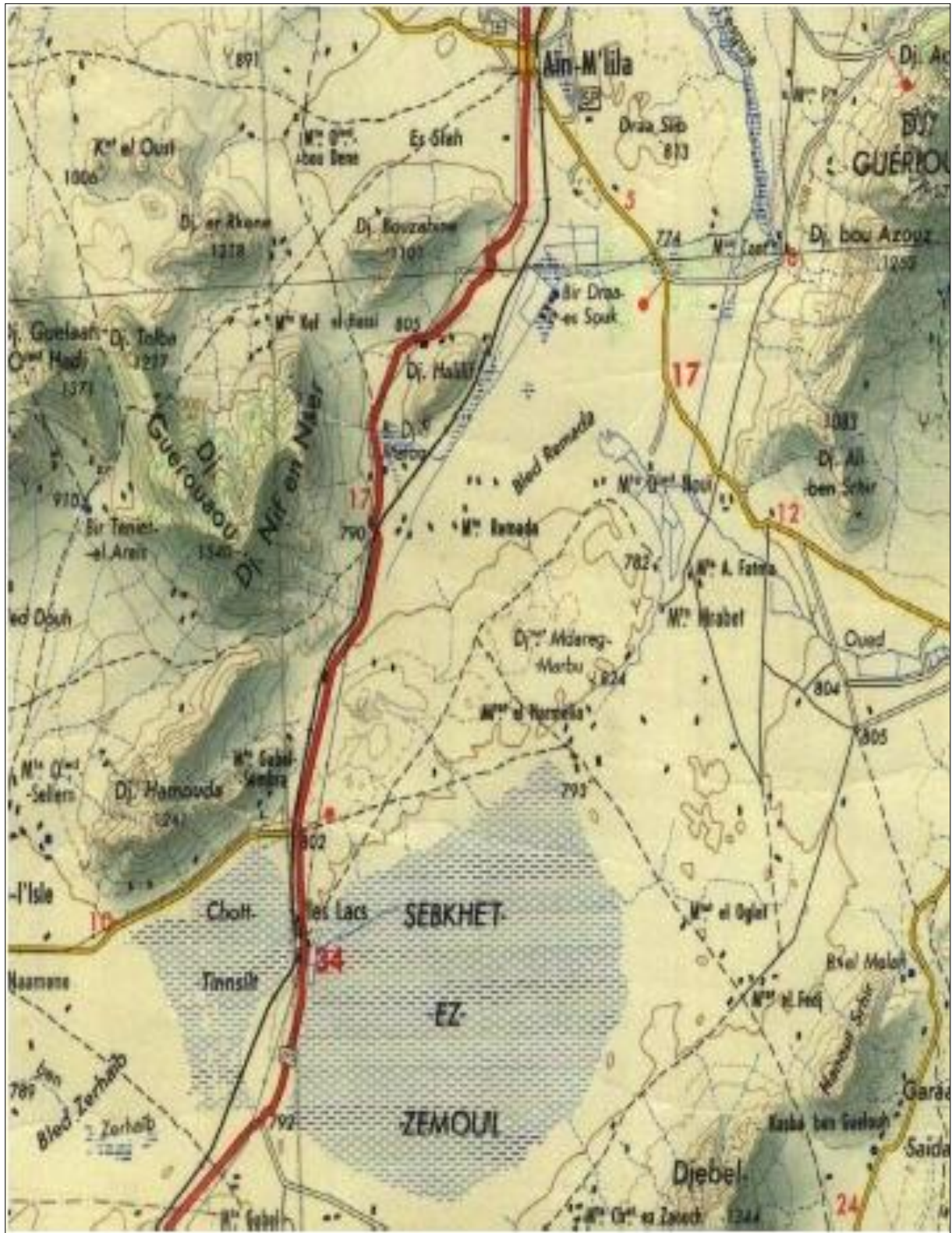


Figure 11: Situation géographique de site d'étude (Sebkhet Ezzemoul) (Carte topographique de Constantine Echelle 1/200.000) (Source : INSID) (Messai, 2016).



Figure 12: Photos de sebkha Ezzemoul d'Ain M'Lila prises en mois de février.

I.2.1.2. Echantillonnage du sol

Les échantillons du sol, utilisés pour cet objectif, ont été prélevés à partir d'un sol de sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila (Figure 13), au mois de Février 2019. Les gros débris ont été d'abord écartés (plante, racines, pierres, etc...), puis à 10 cm de profondeur, 10 g de sol de la rhizosphère de plantes adjacentes ont été prélevés à l'aide d'une spatule et placés dans un flacon stérile et transportés au laboratoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse, selon le protocole décrit par Pochon et Tardieux (1962).



Figure 13: Site d'échantillonnage à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.

I.2.2. Isolement et purification

L'isolement et la purification des moisissures prélevées ont été réalisés sur milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) (annexe 01) avec 3 concentrations différentes en NaCl (1.5%, 5 % et 10%).



Figure 14:Le milieu de culture PDA préparé.

Ce milieu est recommandé pour l'isolement et le dénombrement des moisissures. Il est à noter que la stérilisation, destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu, a été réalisée dans un autoclave par de la vapeur d'eau sous pression, à haute température. La stérilisation a été pratiquée à 121°C pendant 20 min (Botton *et al.*, 1990).

I.2.2.1. Méthode d'isolement

L'isolement des moisissures a été réalisé selon la méthode de suspension- dilution (dilutions plates) (Davet, 1996).

Pour préparer les suspensions du sol, 1g d'échantillon dans 9 ml d'eau distillée stérile (annexe 02) (Clark *et al.*, 1985 ; Ulacio *et al.*, 1997). Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-4} ont été effectuées (figure 15). Après la préparation des dilutions, une agitation vigoureuse avec le Vortex permet l'homogénéisation des milieux. A chaque tube, il a été attribué un code désignant son degré de dilution. La préparation des dilutions a pour objectif d'aider à obtenir, dans la mesure du possible, des isolats séparés.

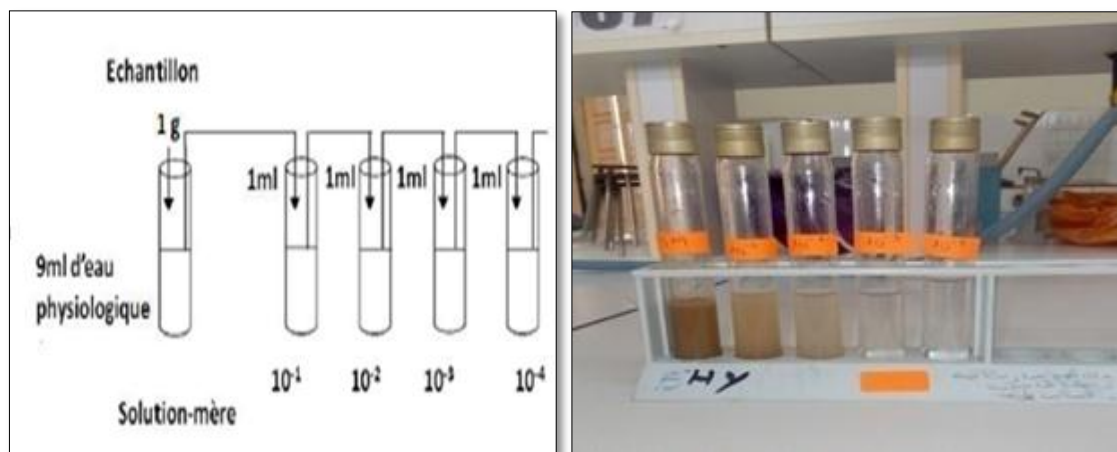


Figure 15 : Méthode de dilution

I.2.2.2. Purification

Les milieux ont été ensemencés dans des boîtes de Pétri sur PDA à raison de 1 ml par dilution (Ikasari et Mitchell, 1994). La croissance bactérienne est inhibée par l'addition d'Ampiline aux milieux de cultures à une concentration de 5 mg/l. Les boîtes ont été incubées à 30°C et sont observées quotidiennement pendant deux semaines.



Figure 16 : Ensemencement des isolats de moisissures.

Les moisissures développées ont été repiquées au centre sur le même milieu dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures.



Figure 17: Purification de moisissures

I.3. Identification des isolats sélectionnés

La caractérisation et l'identification sommaires des isolats d'intérêt ont été faites à échelle du genre à partir des caractères cultureux (macroscopique) et morphologique (microscopique) et la capacité de produire des substances antimicrobiennes (Compaore *et al.*, 2016).

I.3.1. Identification macroscopique

Les caractéristiques macroscopiques des colonies ont été déterminées avec une culture de 15 jours incubée à 30 C° dans le gélose de la pomme de terre Dextrose (PDA). L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants (couleur d'isolat, aspect et pigmentation) (Guiraud, 1998).

I.3.2. Identification microscopique

L'identification microscopique permet de détecter la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, la nature de la production et les caractéristiques des fructifications et des spores (Samson et Hoekstra, 1998 ; Hawkswarth, 1995).

Les préparations microscopique ont été effectuées à l'état frais entre lame et lamelle et par la technique de scotche. La technique première consiste à mettre un petit fragment mycélien sur la lame propre placée entre deux bec bunsen en présence d'une goutte de bleu de Méthylène et l'égerment le dilacéré avec une anse de platine pour éviter la réalisation

d'une préparation trop dense et inobservable, puis le recouvrir délicatement d'une lamelle en évitant de créer des bulles d'air ou des débordements.

La technique du scotch permet de révéler la présence du thalle, sa nature septée ou non septée, ainsi que les caractéristiques des fructifications des conidiospores et des spores (Chabasse *et al.*, 2002).

L'observation microscopique a été réalisée aux grossissements X40, X100 à l'aide d'un microscope optique.

I.4. Etude de l'activité anti- bactérienne

L'étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques a été réalisée à partir de l'apparition des zones claires après 24 heures d'incubation à 30 °C appelés la zone d'inhibition; son diamètre a été déterminé et mesuré. Ce test a été réalisé par la méthode de cylindres d'agar.

I.4.1. Préparation des bactéries tests

Les trois bactéries tests d'origine clinique isolées à partir de différents échantillons organique sont été utilisées: (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*). Les cultures bactériennes ont été préalablement réactivées dans des milieux sélectifs à 37°C, les souches ont été utilisées en phase de croissance exponentielle (jeunes; 18 à 24h).

I.4.2. Préparation des suspensions bactériennes

Quelques colonies de chaque bactérie ont été transférées dans des tubes à essai contenant de l'eau physiologique stériles (0.9 % NaCl). Ensuite un écouvillon stérile a été trempé dans la suspension bactérienne (Il est nécessaire d'éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse). L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum. Enfin, Bien Etaler l'inoculum sur toute la surface de boîte de Pétri contenant la gélose Muller Hinton (MH) (Annexe 04).

I.4.3. La technique des cylindres d'agar

Les souches fongiques qui ont étéensemencées sur milieu PDA et incubées pendant 7 jours à 30°C sont perforés à l'aide d'une pipette Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm de diamètre). Les cylindres d'agar obtenus ont été déposés de manière renversée au centre de la boîte des bactéries tests déjàensemencées dans un milieu Muller-Hinton. Les résultats ont été analysés après le 1^{ier} jour d'incubation (30°C). Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés.

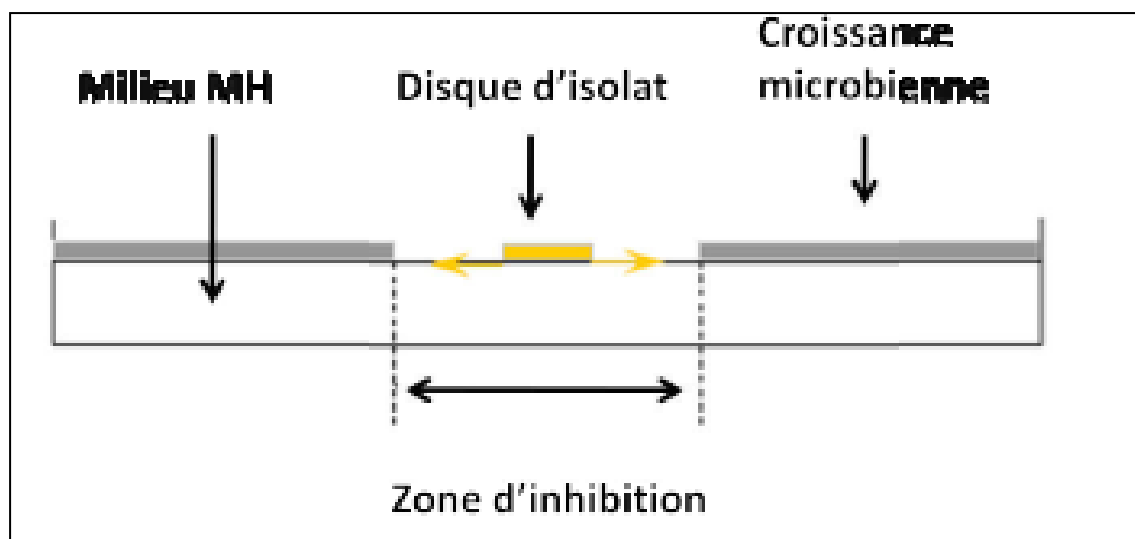


Figure 18: Boîte de Pétri présentant l'activité des isolats obtenus vis-à-vis les bactéries pathogènes.

I.5. Etude de l'activité enzymatique

I.5.1. Détermination de l'activité protéolytique

La mise en évidence de l'activité protéolytique chez divers microorganismes nécessite un milieu de culture protéiné, où les protéines jouent le rôle d'une source azotée et même d'une source du carbone. Parfois, elles constituent un inducteur de la synthèse de protéases par les microorganismes (Durand et Monson, 1988). Les différentes protéases peuvent présenter une spécificité vis-à-vis de certaines protéines natives ou dénaturées telles que l'albumine, la caséine, la globuline, l'élastine, l'insuline, etc. (Colwell et Grigorova, 1989 ; Richard, 2005).

La caséine étant la protéine du lait utilisée comme substrat pour la détermination des activités protéolytique. De ce fait, un test d'hydrolyse de caséine a été effectué sur gélose au lait (Annexe 06).

Les souches sélectionnées ont étéensemencées en un seul disque de moisissure (5 mm de diamètre) à l'aide d'un perforateur stérile et déposé le de manière renversée au centre de la boîte. L'incubation a été réalisée à 30°C. En faite, les résultats ont été appréciés quotidiennement durant 72 heures. La présence de cette activité à été détectée par un halo clair autour de la culture indiquant l'hydrolyse de la caséine, par contre un résultat négatif ne montre aucune zone d'hydrolyse autour de la culture (De Vos *et al.*, 2009).

Résultats Et Discussion

Ce travail, a pour objectif principal le criblage des microorganismes halophiles et halotolérants producteurs des substances antibactériennes secrétées par des moisissures isolées à partir de Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila vis-à-vis de trois souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus cereus* ATCC10987). En effet, l'isolement des microorganismes halophiles a été réalisé dans les différentes concentrations (1,5%, 5%, 10% de NaCl).

I. L'agent pathogène

Escherichia coli ATCC11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Bacillus cereus* ATCC10987. Ont été réactivées pour réaliser le test de l'activité anti-bactérienne.

II. Isolement de l'agent antagoniste

Les cultures du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes de Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila sur milieu PDA (Potato dextrose Agar) ont permis l'obtention vingt (20) isolats de moisissures. En effet, trois isolats de moisissures à concentration 10% de NaCl ; Par ailleurs, sept isolats à concentration 5% NaCl et dix à concentrations 1,5% de NaCl (Figure 19).

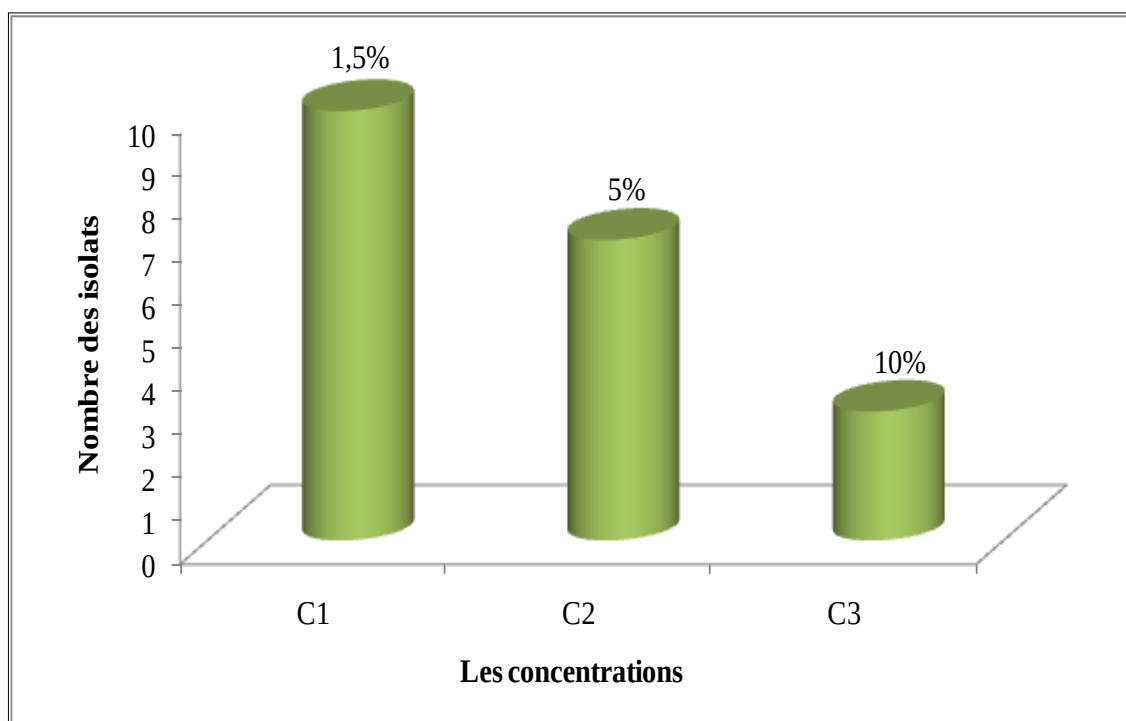


Figure 19: Isolats de moisissures du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes de Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila de différents pourcentages de NaCl.

A partir de la figure précédente nous avons constaté que :

- Dans la concentration faible de NaCl (C_1 ; 1,5%) : il ya l'apparition de la majorité des isolats (10 moisissures).
- Dans la concentration moyenne de NaCl (C_2 ; 5%) : il ya l'apparition de sept isolats de moisissures.
- Dans la concentration forte de NaCl (C_3 ; 10%) : les résultats donnent trois moisissures.

D'après cette analyse nous avons trouvé que ces moisissures sont halophiles et que l'augmentation de la concentration de NaCl cause la diminution de la croissance des moisissures.

Nos résultats sont accord avec les résultats des travaux pratiques de Cantrell *et al.*, (2006) qui ont trouvé que malgré la concentration élevée du sel dans des environnements hypersalés, les champignons font partie des microorganismes qui ont pu résister et se développer. Les moisissures contiennent un certain nombre de représentants halophiles faibles et modérés tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium* sp (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000).

Selon Tortora *et al.*, (2003), les souches halophiles résistent à la pression osmotique et surtout elles ont la capacité de se développer dans les milieux à concentration élevés en sel comme *Ulocladium*.

L'augmentation de la salinité s'accompagne d'une réduction de la diversité des communautés microbiennes (Oren, 2002).

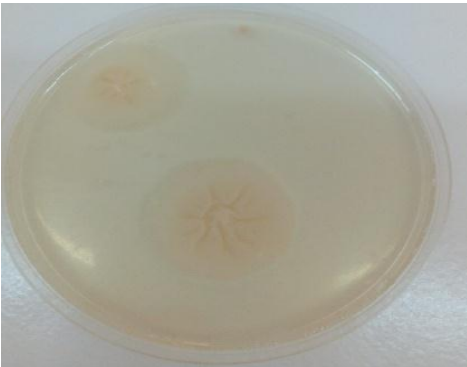
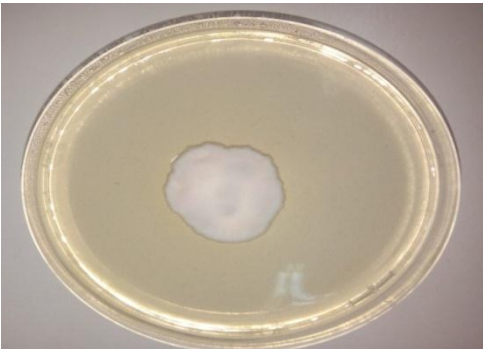
III. Identification des souches isolées

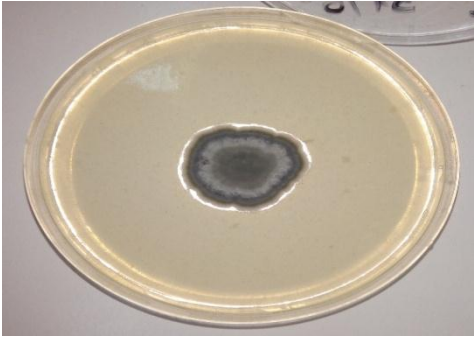
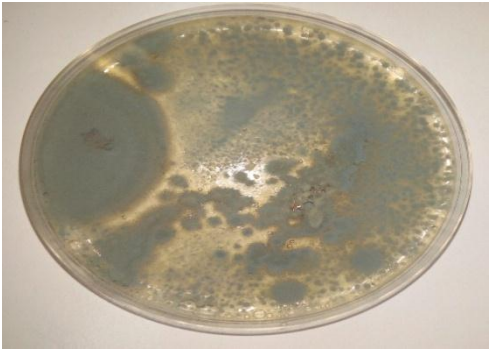
III.1. Etude macroscopique

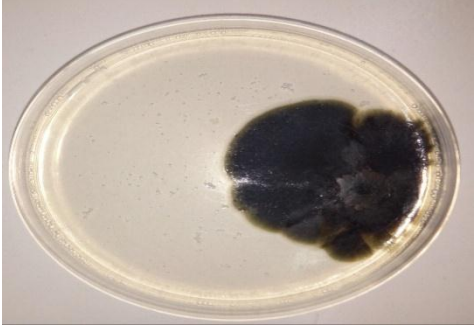
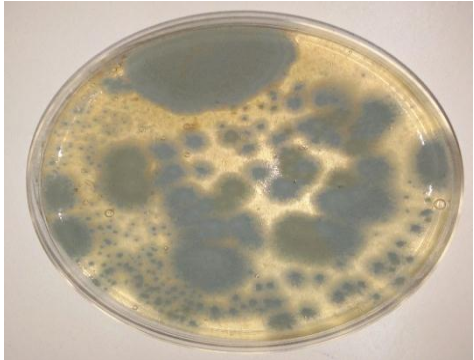
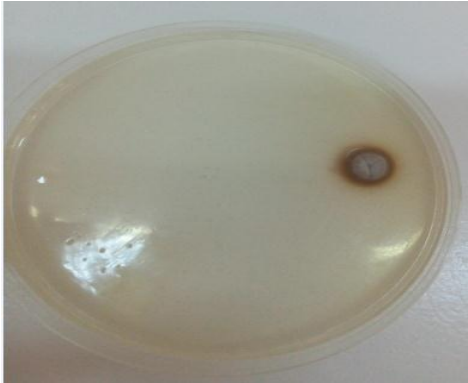
Selon Dufresne, (2014), l'identification macroscopique repose généralement sur l'observation de critères suivants (Tableau 05) :

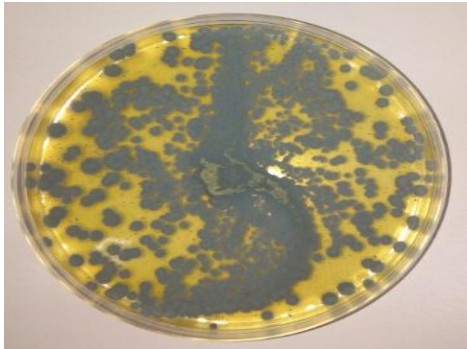
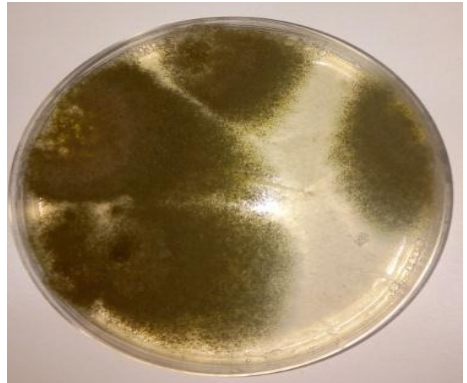
- La couleur de : surface, pigment diffusible.
- Texture : laineuse, duveteuse, poudreuse, glabre.
- Topographie : plat, surélevé, cérébriforme, avec stries radiales.
- Vitesse de croissance (diamètre de colonie) :
 - Rapide : diamètre > 3 cm
 - Modérée : entre 1 et 3 cm
 - Lente : diamètre < 1 cm

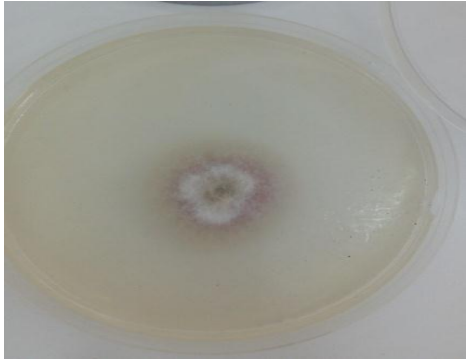
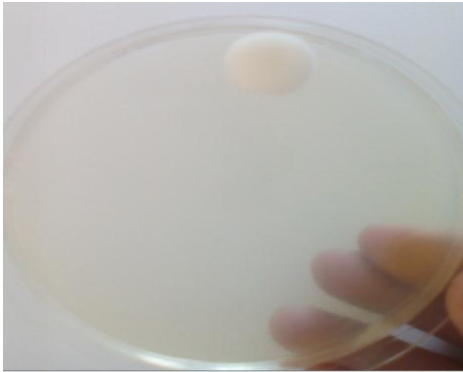
Tableau 05 : Etude macroscopique des isolats fongique isolés à partir de la Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.

S1	PDA 5% NaCl	Couleur : blanche Aspect : Cotonneux et de relief bombé. La vitesse de croissance : modérée (3 cm)	
S2	PDA 1,5% NaCl	Couleur : varie du blanche au rose claire. Aspect : poudreux plus souvent humide et de reliefs plans. La vitesse de croissance : modérée (3 cm)	
S3	PDA 1,5% NaCl	Couleur : mélange blanche et noire. Aspect : Duveteux et de reliefs surélevés. La vitesse de croissance : rapide (des colonies dispersées)	
S4	PDA 1,5% NaCl	Couleur : blanche Aspect : Cotonneux et de relief bombé. La vitesse de croissance : modérée (3cm).	

S5	PDA 1,5% NaCl	Aspect : duveteux à poudreux et de reliefs plans. Couleur : d'abord noire puis grise claire devient grise foncée. La vitesse de croissance : modérée (2cm)	
S6	PDA 5% NaCl	Couleur : vert pétrole. Aspect : poudreux et de reliefs plans. La vitesse de croissance : diffusée.	
S7	PDA 1,5% NaCl	Couleur : marron foncé à centre blanc. Aspect : laineux, reliefs plans. La vitesse de croissance : diffusée.	
S8	PDA 5% NaCl	Couleur : blanche à centre noir devient rose. Aspect : laineux et de reliefs plans. La vitesse de croissance : rapide (4cm).	

S9	PDA 10% NaCl	Couleur : noire. Aspect : duveteux et de reliefs plans. La vitesse de croissance : rapide (4cm).	
S10	PDA 5% NaCl	Couleur : beige à orange clair et centre blanc cassé, contour blanc. Aspect : cérébriforme (duveteuse) La vitesse de croissance : rapide (3,5cm).	
S11	PDA 5% NaCl	Couleur : vert pétrole. Aspect : poudreux et de reliefs plans. La vitesse de croissance : diffusée.	
S12	PDA 1,5% NaCl	Couleur : grise tournée par un cercle marron foncé. Aspect : duveteux (flocconeux) surélevé. La vitesse de croissance : lente (0.7cm)	

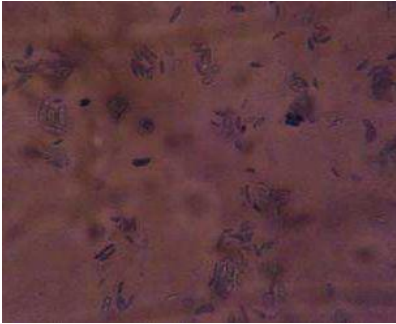
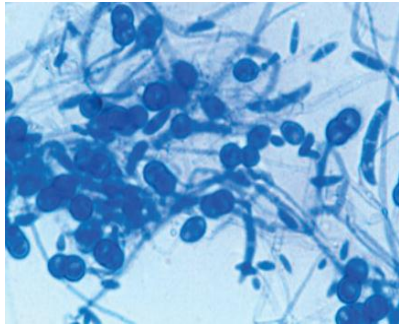
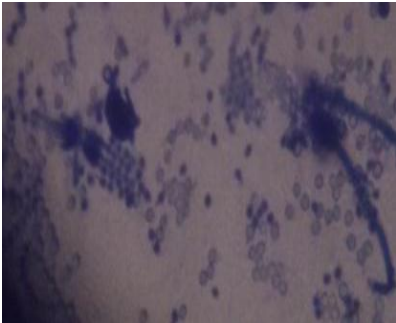
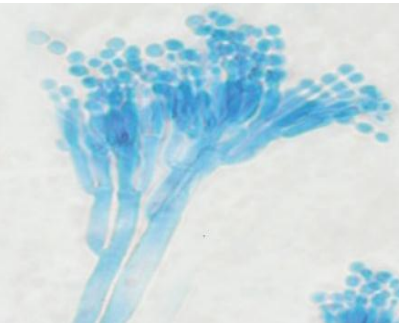
S13	PDA 5% NaCl	Couleur : grise foncée à centre gris clair Aspect : poudreux et de reliefs plans avec une pigmentation jaunâtre diffusible dans le milieu. La vitesse de croissance : diffusée.	
S14	PDA 1,5% NaCl	Couleur : verte tournée par des cercles blancs. Aspect : Poudreux et de relief surélevé. La vitesse de croissance : modérée (1.5cm)	
S15	PDA 5% NaCl	Couleur : verte olive au brun très foncé. Aspect : laineux poudreuse. La vitesse de croissance : rapide (5cm)	
S16	PDA 1,5% NaCl	Couleur : marron foncé de centre blanc. Aspect : laineux La vitesse de croissance : rapide	

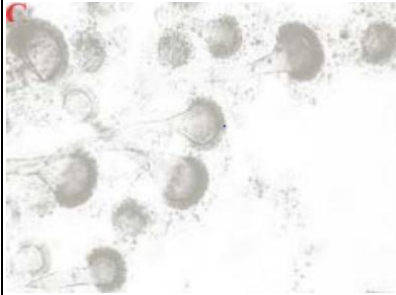
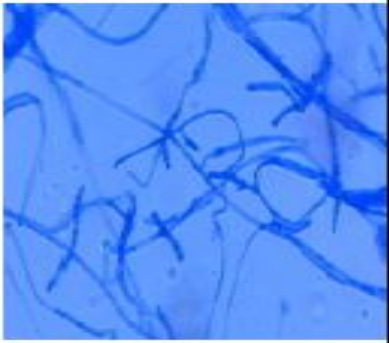
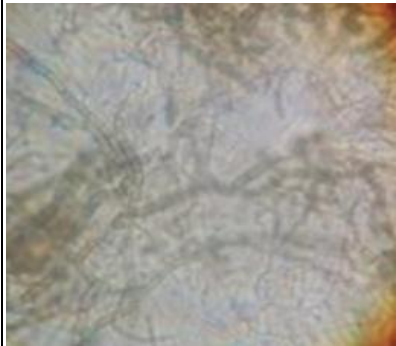
S17	PDA 1,5% NaCl	Couleur : rose de centre blanc devient marron clair. Aspect : cotonneux de reliefs plans. La vitesse de croissance : modérée (3cm)	
S18	PDA 1.5% NaCl	Couleur : noire Aspect : velouté et de relief surélevé La vitesse de croissance : Lente (1cm).	
S19	PDA 10% NaCl	Couleur : grise entourée par un cercle marron. Aspect : Duveteux surélevé. La vitesse de croissance : modérée (1,2 cm)	
S20	PDA 10% NaCl	Couleur : blanche Aspect : Cotonneux bombé. La vitesse de croissance : modérée (1,5 cm)	

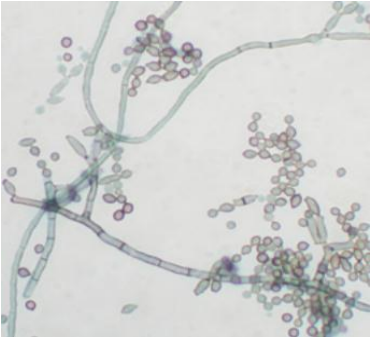
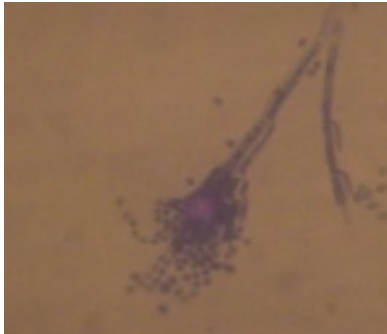
III.2. Etude microscopique

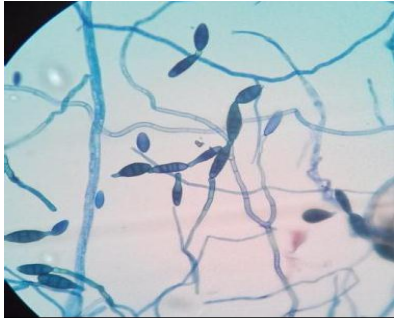
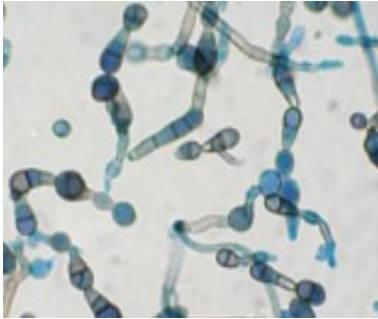
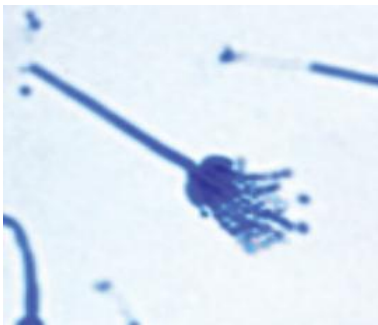
L'identification microscopique (tableau 06) repose essentiellement sur l'observation de formes végétatives tel que les hyphes (septés ou non septés), les structures de reproduction comme les conidiophores, les cellules conidogènes, et les conidies (dufresene, 2014).

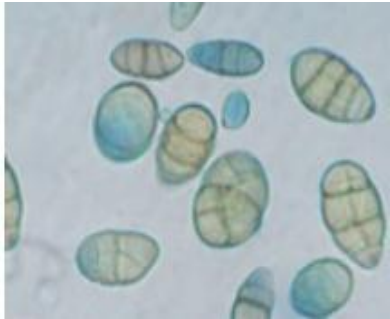
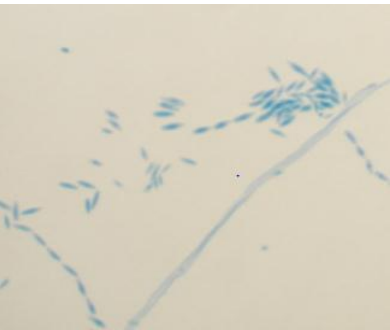
Tableau 06: Etude microscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.

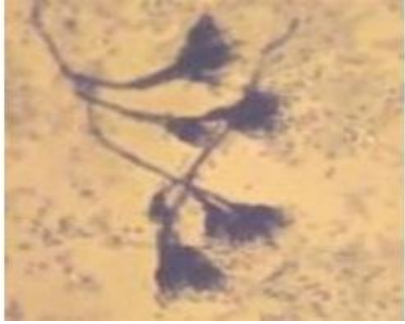
Les espèces	Description	Aspect microscopique	Photode référence
S1 Fusarium sp1	•Hyphe : Septé. •Conidiophores : courtes, simples, portent de longues monophialides d'aspect cylindrique. •Conidies : des macroconidies cloisonnées en forme de banane, microconidies uni ou bicellulaires ovales disposées en fausses têtes, et des chlamydospores isolées en courtes chaînes.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S2 Penicillium sp1	•Hyphe : Septé. •Conidiophores : Simples peu ramifiés, cylindriques, cloisonnées. •Phialides : biverticillés, disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérés par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores. •Conidies : Rondes à ovoïdes, lisses.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

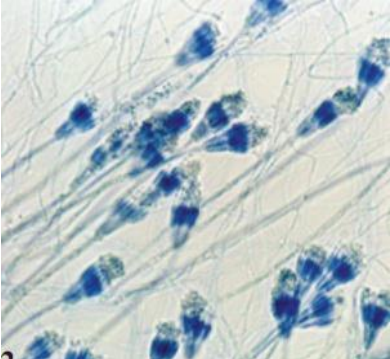
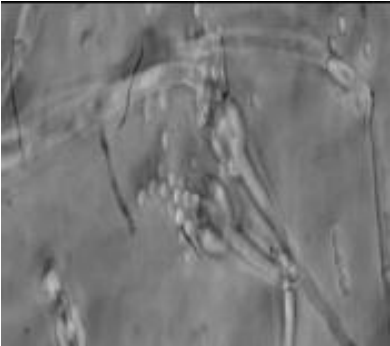
S3 Aspergillus sp1	•Hyphe : Septé •Conidiophore : Très long et non cloisonné. •Fialides : Portées par des métules insérées sur la vésicule. •Conidies : Globulaires. •Tête aspergillaire : Bisériée, radiée.		 (Ramirez, 1982)
S4 Geotricum sp1	•Hyphe : septé •Conidiophore : rugueux •Fialides : formées le plus souvent sur des métules, groupées sur les trois quarts supérieurs de la surface de la vésicule. •Conidies : cylindriques.		 (Botton <i>et al.</i>, 1990)

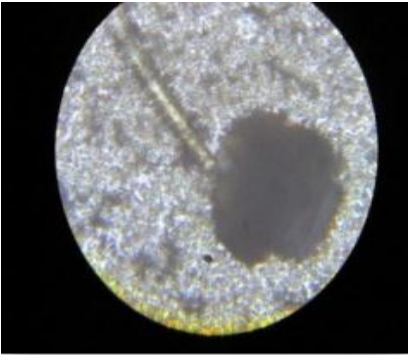
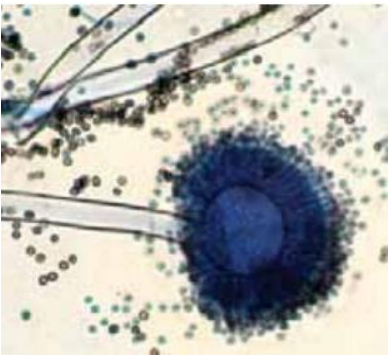
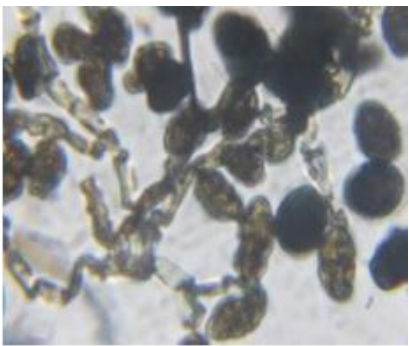
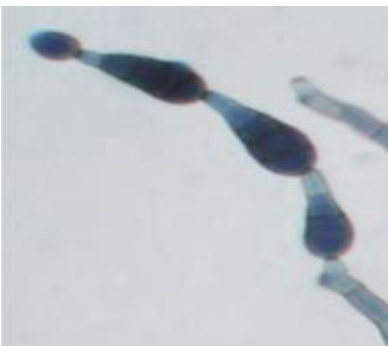
S5 Cladosporium sp1	Hyphe : septés et pigmentés. •Conidiophore : de longueurs variables,ramifiés et allongés •Conidies : en chaîne acropétale, septées avec plusieurs sites conidiogènes.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S6 Penicillium sp2	•Hyphe : Septés •Conidiophore : ramifiés, cylindrique, cloisonnées. •Phialides : disposées en verticilles à l'extrémité de conidiophores.elle sont insérés directement (monoverticillés). •Conidies : Rondes, lisses.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

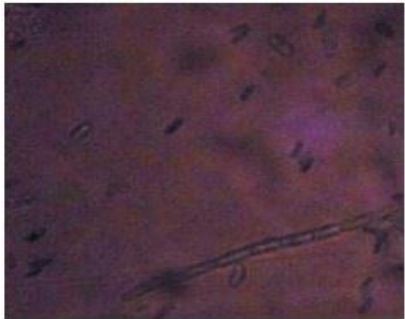
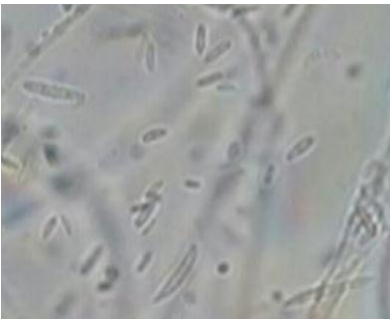
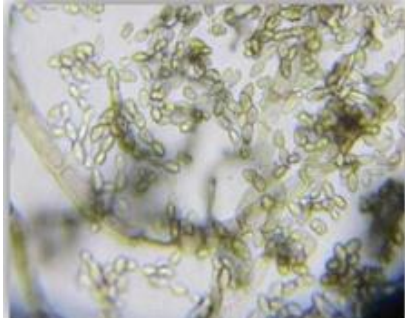
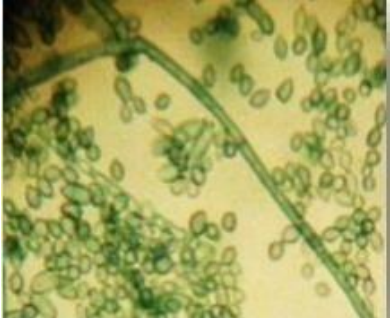
S7 Alternaria sp1	Hyphe : Septés, peu ramifié, pigmentés en brun. •Conidiophore : Cloisonnés, bruns, septés, simples, plus ou moins droites (généculés). •Conidies : Brunnes, ovoïdes, pluricellulaires, de partie basale arrondie, présentent des cloisonnements obliques transversales.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S8 Penicillium sp	•Hyphe : septé. •Conidiophores : isolés et dressés. •Pénicilles : constitués de phialides branchés directement à l'extrémité des conidiophores cloisonnés (monoverticillés). •Conidies : rondes.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

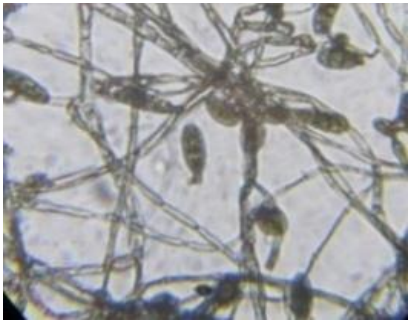
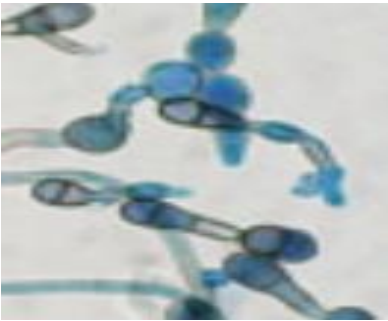
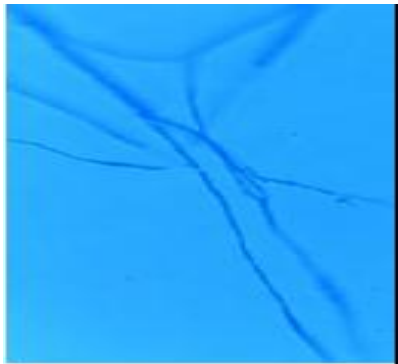
S9 Ulocladium sp	•Hyphe : Septés. •Conidiophores : bruns érigés, simples ou ramifiés. •Conidies : Bruns, ovoïdes, à paroi lisse ou rugueuse. Produites isolément (rarement en chaîne).		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S10 Fusarium sp2	•Hyphe : septés •Conidiophores : simple, verticillés, courts. •Phialides : monophialide, longues et fines. •Conidies : macroconidies rares, microconidies nombreuses, ovoïdes, disposées en pseudo-têtes.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

S11 Penicillium sp3	•Hyphe : septés •Conidiophores : fins et cloisonnés. •Phialides : triverticillés, à col peut développés en pinceaux serrés. •Conidies : les conidies sont produites par des phialides biverticillés à l'extrémité non dilatée.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S12 Absidia sp	•Hyphe : peu ou pas septés. •Sporocystophores : Isolés ou groupés. •Sporocystes : Aspect piriforme avec une columelle hémisphérique. •Spores : Cylindrique lisses, jaunâtres.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

S13 Penicillium sp4	•Hyphe : septés. •Conidiophores : fins, cloisonnés et cylindriques. Phialides : biverticillés, disposées à l'extrémité des conidiophores. •Conidies : rondes à ovoïdes.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S14 Penicillium sp5	•Hyphe : septés et hyalins. •Conidiophores : ramifiés, terminés par un pénicille. •Phialides : biverticillés, disposées en pinceaux serrés. •Conidies : rondes.		 (Compaore <i>et al.</i>, 2016)

S15 Aspergillus niger	•Hyphe : Septés. •Conidiophore : Lisse, hyalin ou brunâtre dans sa moitié supérieure. •Phialides : insérées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout de porteur de la vésicule. •Conidies : globuleuse, brunes. •Tête aspergillaire : bisériée radiée, noire à maturité.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S16 Alternaria sp2	•Hyphe : septés, fin et régulier bruns foncé à noirs. •Conidiophore : Cloisonnés, simples, plus ou moins droites (généculés). •Conidies : Conidies pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

S17 Fusarium sp3	•Hyphe : septés. •Conidiophores : ramifiés, multiples, courts. •Conidies : Des microconidies oblongues, en fausses têtes, des macroconidies en forme de fuseau asymétrique.		 (Botton <i>et al.</i>, 1990)
S18 Cladosporium sp	•Hyphe : Foncé, septés, pigmentés. •Conidiosphores : Longueur variable. •Conidies : Elliptique à cylindrique, lisse formées à l'extrémité des conidiophores, les premières sont de grande taille, et les suivantes sont de petite taille		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)

S19 Alternaria sp3	•Hyphe :septés, fin et régulier bruns foncé à noirs. •Condiosphores : cloisonnés, bruns, ramifiés. •Conidies : pluricellulaires en chaînes brunes irrégulières ; souvent en forme de massue, cloisonnées longitudinalement et transversalement.		 (Chabasse <i>et al.</i>, 2002)
S20 Geotricum sp2	•Hyphe :septés. •Condiosphores : sont rugueux. •Conidies : cylindriques, en forme de tonneau à ellipsoïdales,formées par désarticulation des hyphes fertiles.		 (Botton <i>et al.</i>, 1990)

Nous avons obtenu 20 isolats fongiques représentant 8 genres : *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotricum*, *Ulocladium*, *Absidia*, *Cladosporium*.

Le genre majoritaire est *Penicillium* avec une fréquence de 30% regroupant 6 espèces : *Penicillium sp*, *Penicillium sp1*, *Penicillium sp2*, *Penicillium sp3*, *Penicillium sp4* et *Penicillium sp5*. Suivie par le genre *Fusarium* avec un pourcentage de 15 % (*Fusarium sp1*, *Fusarium sp2* et *Fusarium sp3*), puis les genres *Alternaria* qui représentent 15 % (*Alternaria sp1*, *Alternaria sp2*, *Alternaria sp3*), *Aspergillus* 10% (*Aspergillus niger* et *Aspergillus sp1*), *Geotricum* 10% (*Geotricum sp1*, *Geotricum sp2*), *Cladosporium* 10% (*Cladosporium sp*, *Cladosporium sp1*), *Ulocladium* 5% (*Ulocladium sp*), *Absidia* 5 % (*Absidia sp*) (figure 20).

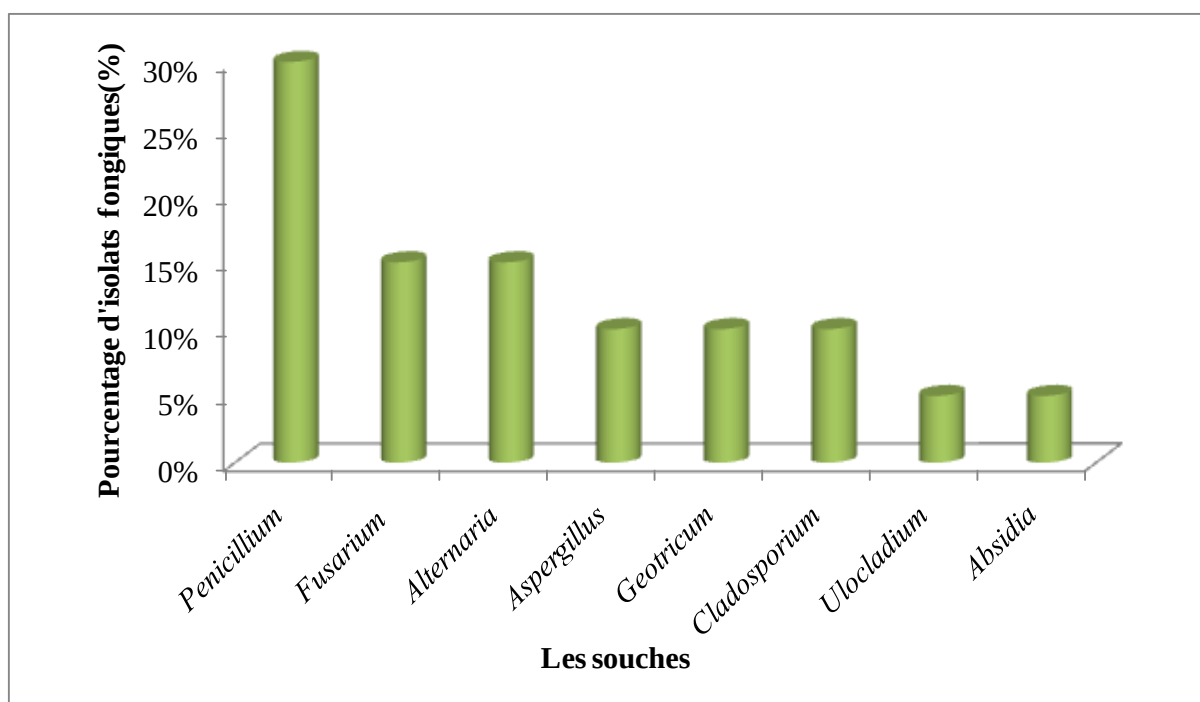


Figure 20 : La flore fongique isolée sur le milieu PDA à partir de Sebkh Ezzmoul d'Ain-mlila.

IV. Etude de l'activité anti-bactérienne

La production des substances antibactériennes par les souches de moisissures est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar.

Le test d'activité antibactérienne des isolats a révélé que dix isolats présentent une activité antibactérienne sur, au moins, une des bactéries tests (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*). Après incubation, la présence des zones d'inhibition indique

un résultat positif. Cette zone a été observée autour des disques de moisissures ce qui signifie que ces isolats fongiques produisent des molécules antibactériennes capables de stopper la croissance des bactéries tests (Figure 21).

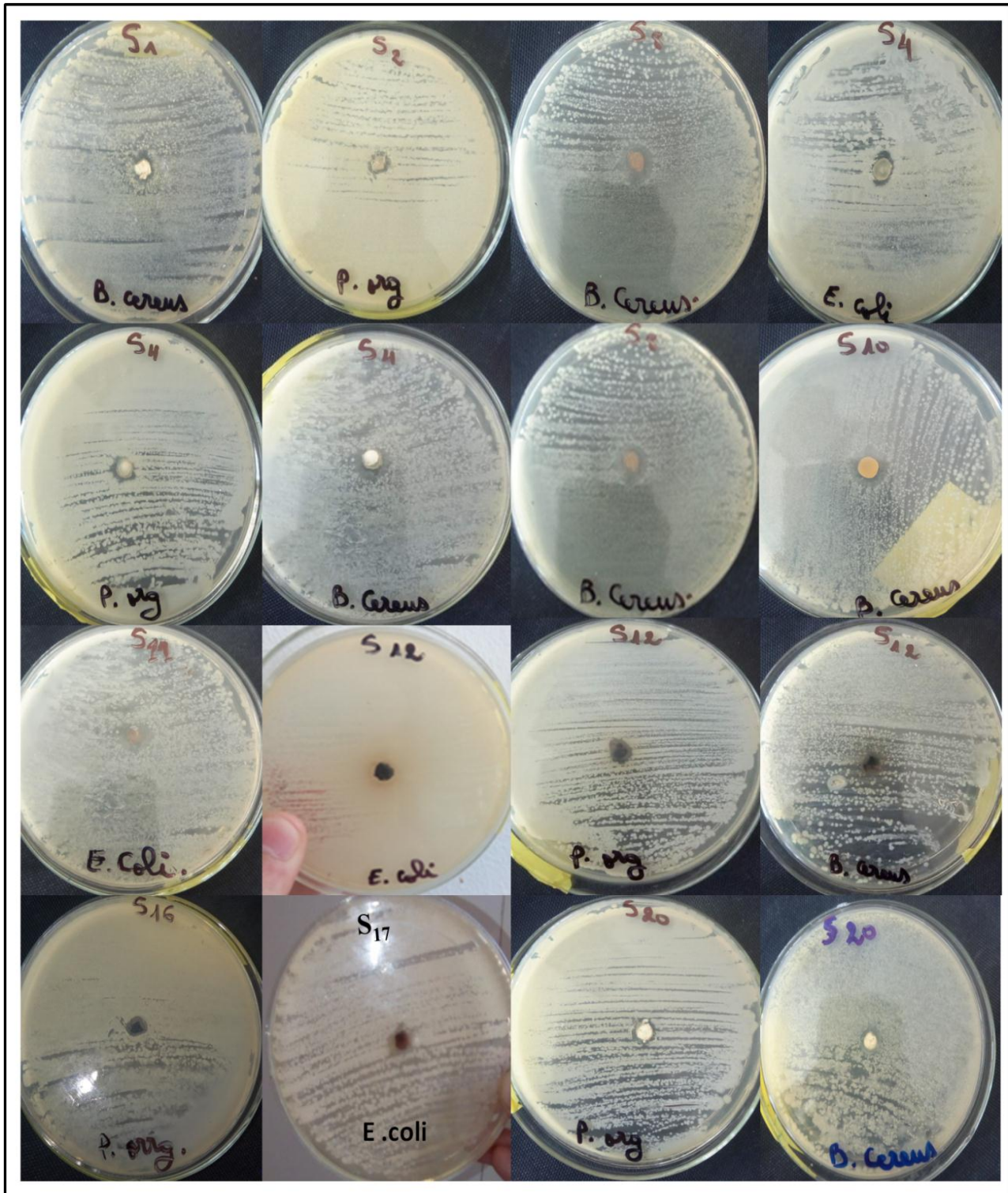


Figure 21 : Différente zone de lyses obtenues par dix souches vis-à-vis les bactéries testées.

Les isolats fongiques peuvent être divisés en 3 groupes en fonction de diamètre de la zone d'inhibition qui varie entre 0.6 à 1.5 cm : Des isolats à fort, à moyen et à faible effet antibactérien (Annexe 5).

• Sur *Escherichia coli* (Gram-)

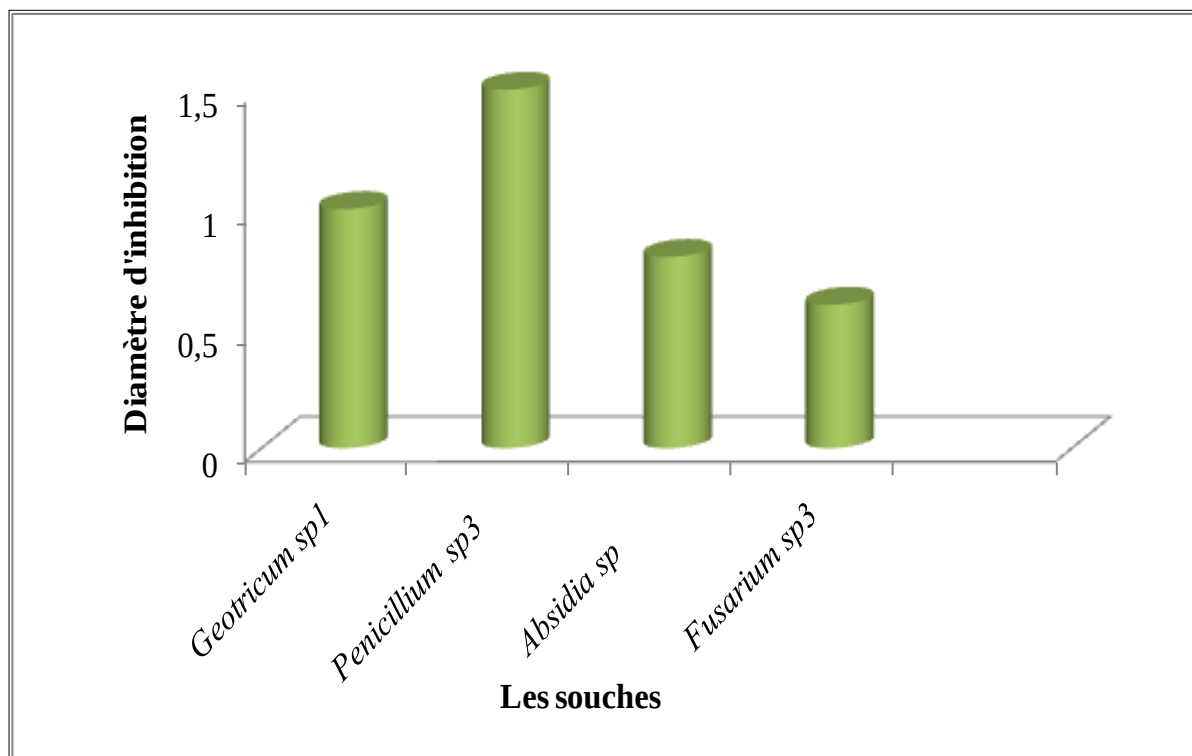


Figure 22: La variation de la zone d'inhibition entre différentes souches et *E.coli*.

Parmi les 20 espèces de moisissures testées, seulement quatre ont montré un effet antibactérien vis-à-vis d' *Escherichia coli* (Gram⁻), à savoir : l'espèce à fort effet anti bactérien *Penicillium sp3*, avec une zone de lyse égale à 1,5 cm. *Geotricum sp1*, *Absidia sp* sont considérés comme des espèces à moyen effet antibactérien, avec une zone de lyse égale à 1 cm et 0,8 cm. Alors que *Fusarium sp3* à un faible effet anti bactérien avec une zone d'inhibition égale à 0,6 cm.

•Sur *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-)

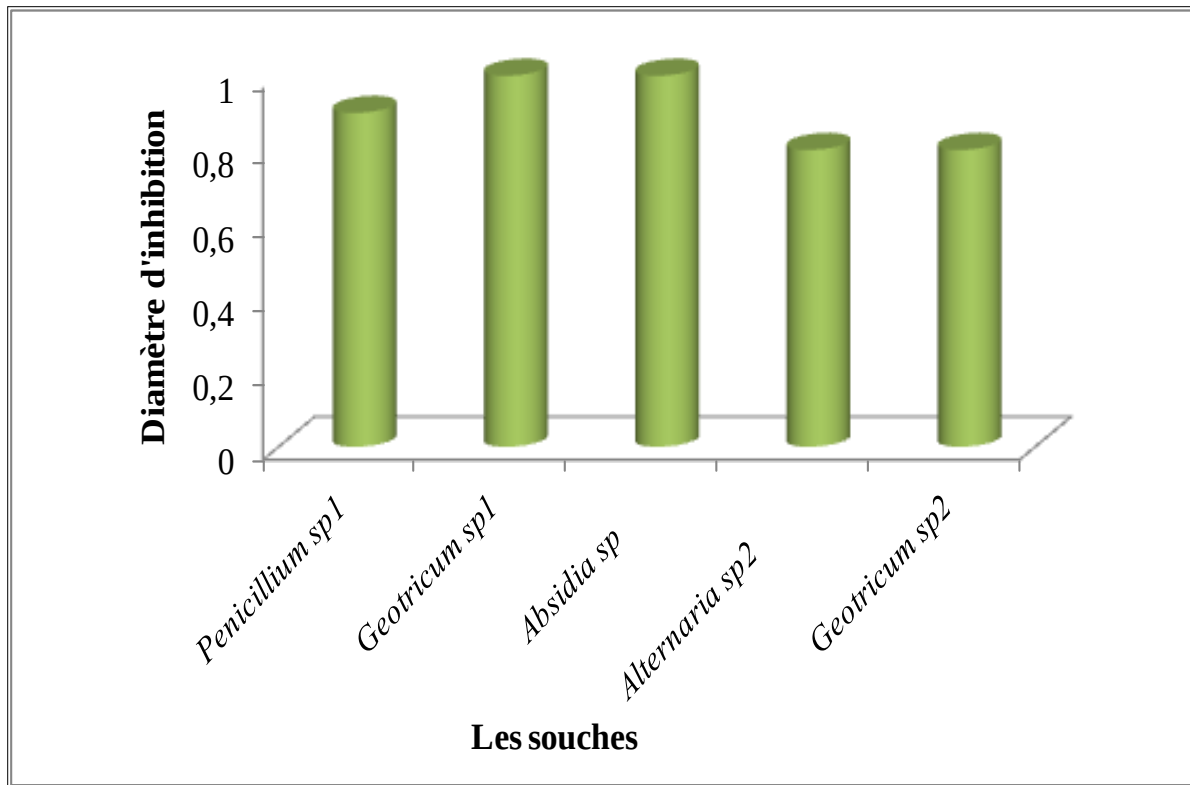


Figure 23 : Variation de la zone d'inhibition en fonction des espèces de moisissures isolées contre *P.aeruginosa*.

Les espèces *Penicillium sp1*, *Geotricum sp1*, *Absidia sp*, *Alternaria sp2* et *Geotricum sp2* ont donné un moyen effet antibactérien vis-à-vis *P.aeruginosa* avec une zone de lyse égale à 0,9 cm ; 1 cm ; 1 cm ; 0,8 cm et 0,8 cm en ordre.

•Sur *Bacillus cereus*(Gram+)

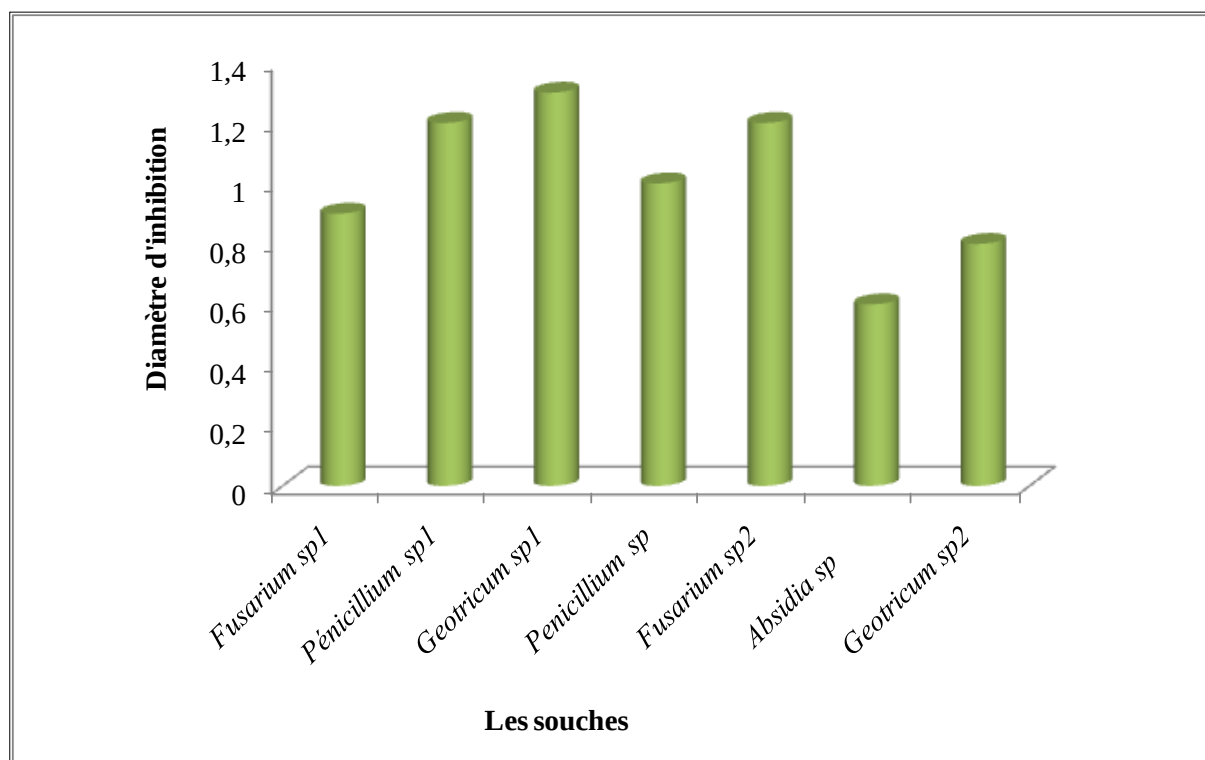


Figure 24 : La variation de la zone d'inhibition entre des différentes souches et *B.cereus*

7/20 espèces de moisissures appartenant à 4 genres : *Fusarium*, *Penicillium*, *Geotricum* et *Absidia* ont montré une activité antibactérienne significative, contre *B.cereus* à savoir les espèces à fort effet antibactérien : *Penicillium sp1*, *Geotricum sp1* et *Fusarium sp2* avec une zone d'inhibition égale à 1,2 cm ; 1,3 cm et 1,2 cm en ordre. *Fusarium sp1*, *Penicillium sp* et *Geotricum sp2*, représentent les isolats à effet antibactérien moyen avec une zone d'inhibition entre 0,8 à 1 cm respectivement. *Absidia sp* a donné un faible effet antibactérien contre *B.cereus* avec une zone de lyse égale à 0,6 cm.

L'histoire des antibiotiques a commencé en 1877, Pasteur et Joubert observent qu'une bactérie se développe moins dans un bouillon envahi de moisissures. Cette remarque entraîne progressivement l'utilisation des moisissures pour lutter contre les infections microbiennes (Moroh, 2013). En 1897, Ernest Duchesne, médecin militaire français indique dans sa thèse intitulée « contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les micro-organismes » l'existence d'un antagonisme entre les moisissures (*Penicillium glaucum*) et les bactéries (Brezinski, 2006). En effet, 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 anti bactériennes. Les champignons filamenteux sont des grands producteurs d'antibiotiques tel que la pénicilline produite par le genre *Penicillium* et la céphalosporine produite par *Cephalosporium* (Larpend-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Botton *et al.*, 1999).

Nos résultats diffèrent de ceux obtenus par Benghrieb et Gerboua en 2017 qui malgré la même souche de *Penicillium* sp isolé à partir du même endroit de Sebkhia Ezzemoul Ain-mlila testée sur les mêmes bactéries test (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) donne des résultats différents. Dans leurs travaux ils ont trouvé un effet antibactérien de *Penicillium* sp vis-à-vis de deux bactéries Gram (-) *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Alors que nos résultats montrent qu'il n'y a aucun effet antibactérien vis-à-vis de deux bactéries Gram (-). Même remarque sur les travaux de Abdelaziz en 2006 dans son mémoire intitulé « Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens » là que les souches : *Aspergillus niger*, *Aspergillus* sp1, *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp1, *Fusarium* sp3, *Penicillium* sp1, *Penicillium* sp2, *Alternaria* sp possèdent des effets antibactériens vis-à-vis sur *Escherichia coli*, mais même ces souches sur même bactérie ne donnent aucun effet antibactérien dans nos résultats. Tout cela permet de confirmer que la différence des espèces du même genre et la différence dans la nature des sols (sols salins, sols sahariens) rendent chacune de ces moisissures posséder des propriétés différentes par rapport à l'autre.

V. Etude de l'activité enzymatique

V.1. Détermination de l'activité protéolytique

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. Les protéases catalysent le clivage des liaisons peptidiques de toute molécule protéique, elles scindent les protéines en fragments polypeptidiques, qui seront par la suite transformés sous l'influence des peptidases en leurs sous-unités constitutives, les acides aminés, offrant une multitude de structures (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999).

L'observation d'une zone claire autour de la colonie microbienne prouve la production de protéase (Colwell et Grigorova, 1989 ; Richard, 2005).

Les résultats obtenus après incubation sur gélose caséinée ont permis la sélection de quatre souches ayant une activité protéolytique parmi les dix souches testées (annexe 7). Les souches protéolytiques sont reconnues par l'halo transparent résultant de la dégradation de la gélose

caséinée par l'exoprotéase produite et qui entoure les colonies (figure 25) ; plus le halo est grand, plus la quantité d'enzyme est importante.

Deux souches (S1, S11) sont caractérisées par des zones d'hydrolyse faibles ($\leq 1,5\text{cm}$). Alors que les deux autres souches (S12, S16) ayant des zones d'hydrolyse plus importantes ($>1,5\text{cm}$).

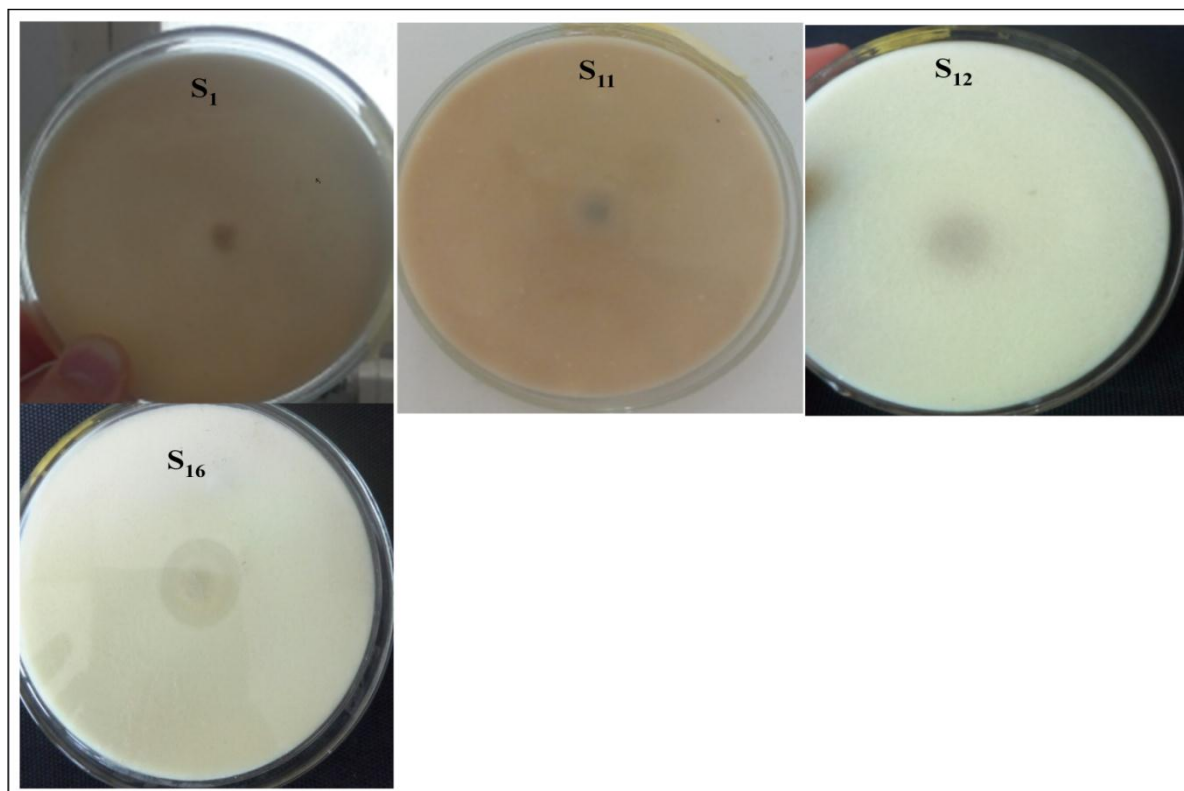


Figure 25 : Résultat de la croissance des souches protéolytique sur gélose au lait.

Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc (Frazier, 1967 ; Ul-haq *et al.*, 2003).

Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases exocellulaires (Smith *et al.*, 1952).

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

L'objectif principal de ce mémoire est la recherche de l'activité antibactérienne élaborée par les moisissures halophiles isolées du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes de Sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila vis-à-vis de trois souches bactériennes ; une à coloration Gram⁺ (*Bacillus cereus* ATCC10987) et deux à coloration Gram⁻ (*Escherichia coli* ATCC11303, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853). En effet, l'isolement des microorganismes halophiles a été réalisé dans les différentes concentrations (1,5%, 5%, 10%) de Na Cl.

Les cultures des prélèvements sur PDA ont permis l'isolement du vingt moisissures différentes. Le pouvoir inhibiteur de la Ampiline au cours de l'isolement ont permis de réduire l'apparition des bactéries. Parmi les vingt espèces de moisissures, dix ont montré un effet antibactérien contre les bactéries testées.

Pour l'identification des moisissures halophiles isolées, une étude macroscopique est effectuée. Cette dernière a permis de déterminer les caractéristiques morphologiques telles que la couleur, texture, topographie et vitesse de croissance. Cette étape est complétée par une étude microscopique permis d'identifier les genres : 6 *Penicillium*, 3 *Fusarium*, 3 *Alternaria*, 2 *Aspergillus*, 2 *Geotricum*, 2 *Cladosporium*, 1 *Ulocladium*, 1 *Absidia* sp.

Dans le cadre de la recherche des enzymes protéolytiques élaborées par des moisissures halophiles sur gélose caséinée, quatre souches possèdent l'activité protéolytique.

Tous ces résultats montrent la richesse de nos milieux extrêmes en moisissures et les possibilités offertes pour la recherche de nouvelles espèces hyperproductrices d'enzymes ayant un intérêt industriel.

Nous comptons dans l'avenir optimiser les paramètres de culture des souches afin d'améliorer leur production de biomolécules à potentiel biotechnologique important.

Une piste très intéressante à suivre serait la recherche de la production des souches de substances antibactériennes (antibiotiques) sur ce cadre de recherche une étude est en cours, et ce modeste travail de caractérisations phénotypiques constitue un début d'investigation.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

A

- Abdelaziz W., (2006).** Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. mémoire de magister, université Mentouri de Constantine faculté des sciences de la nature et de la vie département des sciences de la nature et de la vie, Algérie.75p
- Adams. T.H., Wieser. J.K., et Yu. J.K. (1998).** Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 35-54
- Afssa, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (2009).** Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale Rapport final. Maisons-Alfort. 308p.
- Alspaugh. J.A., Perfect. J.R., et Hatmanj.H. (1997).** *Cryptococcus neoformans* mating and virulence are regulated by the G- protein Alpha subunit GPAI and Camp. *Genes.Dev.*,11,3206-3217
- Aurélié L., (2013).** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, Ecole doctorale sciences technologie sante, France . 194p.

B

- Bagré. T.S., Samandoulougou .S., Traoré. M., Illy. D., Tchamba. G.B., Bawa .H.I., Bouda. SC., Traoré. A.S., Barro. N. (2015).** Détection biologique des résidus d'antibiotiques dans le lait et produits laitiers de vache consommés à Ouagadougou, Burkina Faso. Journal of Applied Biosciences., 87, 8105- 8112
- Barkat. S. (2004).** ATLAS ^{IV} des zones humides Algériennes d'importance internationale: 1- 107.
- Barnett, H.L., et Hunter. B.B. (1998).** Illustrated Genera of Imperfect Fungi, 4th ed. APS Press, St. Paul, MN.
- Bartnicki-Garcia. S. (2002).** Hyphal tip growth. Outstanding questions. Osiewacz, Heinz D. (Ed.), Molecular Biology of Fungal Development. Marcel Dekker, New York, 1-25.
- Bauer. A.W., Kirby. W.M., Sherris. J.C., et Turck. M. (1966)** .Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. AM. J. Clin. Pathol., 45,493-496

- Benghrieb ,A.et 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
- Bérdy. J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. A personal view. The Journal of Antibiotics, 58, 1-26.
- Bhatnagar, D., Payne, G.A., Cleveland, T.E., et Robens, J.F. (2004).** Mycotoxins: current issue in USA. In H. Barug, H.P. van Egmond, R. Lopez-Garcia, W.A. van Osenbruggen and A. Visconti (eds). Meeting the mycotoxin menace. Wageningen, the Netherlands, Wageningen Academic Publisher.17–47.
- biosynthesis gene effects conidial development and UV tolerance in the japeneses
- Blatt H., Middleton G., et Murray R. (1980).** Evaporites and native sulphur. In origin of Sedimentary Rocks. Ed. H. Blatt, G. Middleton R. Murray. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. 782p.
- Botton .B., Breton. A., Fevre. M., Gauthier. S., Guy .P., Larpent. J.P., Reymond. P., Sanglier. J.J., Vayssier. Y. et Veau. P. (1999).** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. 12-426.
- Botton. B., Breton. A., Fevre. M., Gauthier. S., Guy .P.H., Larpen. J.P., Reymond. P., Sanglier. J.J., Vayssier. Y.,et Veau.P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies., 34-428
- Bouaguel L., (2013).** Structure et écologie des Phoenicoptéridés dans l'éco-complexe de zones humides de l'Est algérien. Thèse de Doctorat. Biologie Animal. Univ. Annaba, Algérie, 134p.
- Bouali N., et Brahimi S. E. H., (2011).** Essais d'identification et activité anti-archéenne de souches d'archées halophiles extrêmes isolées à partir du Chott el Beida au Sud d'El Eulma (Sétif). Mémoire de master, Université Abderrahmane Mira de Bejaïa faculté des sciences de la nature et de la vie, Algérie. 43p.
- Boughachiche. F., Reghioua. S., Zerizer. H., et Boulahrouf. A. (2011).** Activité antibactérienne d'espèces rares de Streptomyces contre des isolats cliniques multirésistants. Ann. Biol. Clin., 70(2), 167-174
- Brezinski. C (2006).** Histoires de sciences : Inventions, découvertes et savants. Editions Le Harmattan. 186p
- Bush, R.K. et Prochnau, J.J. (2004).** Alternaria-induced asthma. Allergy clin immunol., 113(2), 227-234

C

- Calvo. A.M., Gardner. H., W et Keller. N.P. (2001).** Genitic connection between fatty acid metabolism and sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J.biol.Chem.*, 276 , 20766-20774
- Cantrell .S.A., Casillas-Martinez. L., Molina .M. (2006).** Characterization of fungi from
- Carlile. M.J. et Watkinson .S.C. (1994).** The Fungi. (Academic Press eds). Caron D. 2000. Fusarioses des épis, Sait-on prévoir leur développement., 56-62
- Carson, M. J. et Hartwell, L. (1985).** CDC17: An essential gene that prevents telomere elongation in yeast. *Cell.*, 42: 249-257
- Caumette. P. (1998).** Les bactéries halophiles : la vie dans les conditions extrêmes de salinité. *CR Acad Agric Fr.*, 84, 11-21.
- Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L., Brun S et Penn P. (2002).** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, France. Laboratoire d'analyses de biologie médicale. 159p.
- Champ, S.P. et El-Zayat, A.A.E. (1989).** Isolation of sexual sporulation hormone
- Champ. S.P., Raw. P., et Chang. A. (1987).** An endogenous inducer of sexual developement in *Aspergillus nidulans* . *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1383- 1388
- Cho. B.C. (2005).** Heterotrophic flagellates in hypersaline waters. In: *Adaptation to life at high salt concentrations in Archaea, Bacteria and Eukarya*. Springer, Dordrecht., 543–549.
- Clark. H. E., Geldriche. E.F.B., Kabler. P.W., et Huff. C.B. (1985).** Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process Biochem.*, 30, 723-727
- Colwell ,R.R. et Grigorova, R. (1989).** *Methods in microbiology*. (Ed) STE dimundsburt press limited. Great Britain., 133-138
- Commun .*, 20, 1486- 1487
- Compaore. H., Sawadogo-lingani. H., Savadogo. A., Dianou. D., et Traore.A.S. (2016).** Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes à partir d'aliments locaux au Burkina Faso. *International journal of biological and chemical sciences.*, 10(1), 198-210
- Crespy. A. (2005).** A propos de la norme ochratoxine A à 2 µg/L de vin : quelles conséquences sur la filière ? *Revue des œnologues.*, 111, 7-9.

D

- Das-Sarma, S. et Arora, P. (2001).** Halophiles, encyclopedia of life sciences. Nat. Publ. Group., 8, 458-466
- Davet P. (1996).** Vie microbienne du sol et production végétales, (edn) Institut National de la recherche Agronomique. Paris.

- Davidson. F.A., Sleeman .B.D., Rayner. A.D.M., Crawford. J.W., et Ritz. K. (1996).** Context dependent macroscopic patterns in growing and interacting mycelial networks. *Proc. R. Soc. London Ser.*, 263,873–80
- De Vos. P., Garrity .G. M., Jones .D., Krieg .N. R., Ludwig .W., Rainey. F. A., Schleifer .K. H. et Whitman. W. B. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., The Firmicute. Springer. New York., 3, 63-67
- Deleu. M., Paquot. M., Jacques. P., Thonart. P., Adriaensen. Y., et Dufrene .Y.F. (1999).** Nanometer scale organization of mixed surfactin / phosphatidylcholine monolayers. *Biophys.*, 77, 2304-2310
- Delphine M., (2012).** Exposition aux moisissures en environnement intérieur : méthodes de mesure et impacts sur la santé. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, France.182p.
- Demain. A. et Fang. A.(2000).**The natural functions of secondary metabolites. *Adv.biochem.eng.Biotechnol.*,69,1,39
- Demdoun A., (2010).** Etude hydrogéochimique et impact de la pollution sur les eaux de la région d'El Eulma. Thèse de Doctorat . Université Mentouri Constantine, Faculté des Sciences de la Terre, de la Géographie et de l'Aménagement du Territoire, Département des Sciences de la Terre, Université de Constantine, Algérie, 231p.
- DeterminativeBacteriology.**Williams&Wilkins,USA:611-703.
- Diande S. (2010).** Evaluation de la résistance de Mycobacterium tuberculosis aux antibiotiques et exploration des facteurs de risque associés à la multirésistance au Burkina Faso. Thèse de Doctora Université d'Ouagadougou, Ouagadougou. 117p.
- Dufresne P. (2014).** Identification des champignons d'importance médicale. Stage de laboratoire. Institut National de Santé Publique, Québec (Canada).
- Dulmage, H.T. et 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
- Durand, G. et Monson, P. (198).** Les enzymes: production et utilisations industrielles. Bordas. Paris., 36-153

F

- Falb. M., Pfeiffer. F., Palm. P., Rodewald. K., Hickmann. V., Tittor. J., et Oesterheld. D. (2005).** Living with two extremes: Conclusions from the genome sequence of *Natronomonas pharaonis*. *Genome Research.*, 15, 1336-1343
- Filtenborg. O., Frisvad. J.C., et Thrane. U. (1996).** Moulds in food spoilage.*Int.J.Food microbiol.*, 33(1), 85-102

- Florent.J.(1993).**Microbiologieindustrielle,Lesmicroorganismed'intérêtindustriels.
- Frazier. W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. 3-429
- Fréalle. E., Bex. V., Rebox. G., Roussel. S., et Bretagne. S. (2017).** Méthodes d'identification et de quantification des moisissures de l'habitat : Méthodes classique, méthodes moléculaires. Revue des maladies respiratoires., 34,1124-1137

G

- Gerday C. et Glansdorff N. (2007).** Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM press, Washington, DC. 450p.
- Gertz. J., Siggia. E.D., et Cohen. B.A. (2009).** Analysis of combinatorial cis-regulation in synthetic and genomic promoters. Nature., 457,215-218
- Ghorri S., (2015).** Isolement des microorganismes possédant une activité anti-Fusarium.Thèse de doctorat, Université frères Mentouri faculté des sciences de la nature et de la vie département de microbiologie, Algérie. 116p.
- Girbardt. M. (1957).** Der Spitzenkorper von Polystictus versicolor (L.). Planta., 50, 47-59
- Trinci. A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. Microbiology, 57, 11-24.
- Grant. W.D. (2004).** Life at low water activity. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci., 359, 1249–1267.
- Gregory. P.H. (1984).** The fungal mycelium: an historical perspective. In: Jennings, D.H., Rayner, A.D.M. (Eds.), The Ecology and Physiology of the Fungal Mycelium. Cambridge University Press, 1-22.
- Guiraud J.P. (1998).**Microbiologie alimentaire. Donod/RIA. Paris. 696p.
- Gunde-Cimerman. N., Zalar. P., de Hoog. S., et Plemenitas. A. (2000).** Hypersaline waters in salterns e natural ecological niches for halophilic black yeasts. FEMS Microbiol Ecol., 32, 235–240

H

- Halewyn. M.A.,Lercterc. J.M.,King. N.,Belonger. M.et Frenett .Y. (2001).**Les risqué à la santé associés à la présencede moisissure en milieu intérieure.(end) Quebec Canada
- Hapwood. D.A. (1988).** Towards and understanding of gene switching in *Streptomyces*, the basis of sporulation and antibiotic production. *Proc. R. Soc.Land.*, 235, 121-138.
- Hawksworth D.L., Kirk P.M., Sutton B. et Pegler D.N. (1995).** Dictionnaire of the fungi , 8th ed. CAB.International Walling Ford. UnitedKingdom.
- HawksworthDL.,SuttonB.C.,Ainsworthgc(1995).**AinswoethandBisby'sdictionariofthe
- HoltJ. G., KriegN. R., SneathP.H.A.,StaleyJ. et Williams. S.T. (1994).** Bergey'sManualof

-Ikasari. L. et Mitchell. D.A. (1994). Proteases production by *Rhizopus oligosporus* in solid- state fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 320-324

J

-Jason T. (2017). Apport de l'antibiofilmogramme et de la mesure de la capacité de formation du biofilm dans la prise en charge des infections osteo-articulaires a staphylocoques. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1. Lyon. 243P.

K

-Kachour L., (2004). Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité. Mémoire de Magister en Microbiologie, Université Badji Mokhtar Annaba, Algérie. 259p.

-Kawamura .C., Tsujimoto. T. et Tsug .T. (1999). Targeted dissuption of melanin biosynthesis gene effects condial development and UV tolerance in the japaneses pear pathotype of *Alternaria alternate*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.*, 12,59- 63.

-Kharroub K., (2007). Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mentouri Constantine, Algérie. 194p.

-Kumar. N., Singh. R.K., Mishra. S.K.,Singh. A.K., et 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-chungK.J. et. BennetJ.E.(1992). *Medicalmycology*. LeaandFebiger, Philadelphia.

L

-Larpant J.P.et Larpant–gourguand M.(1996). *Mémento technique de microbiologie* ,2 éme édition .Technique et documentation .lavoisier

-Larpent-Gourgaud ,M. et Sanglier, J. J. (1992). *Biotechnologies. Principes et méthodes*. Doin. Paris. 574-587.

-Lin. M.D., MORASSIN. B., et RECCO. P. (1998). Actualités sur *Alternaria*: Ecologie. *Revue francaise d'allergologie et d'immunologie clinique.*, 38 (4), 349-355

-Litchfield, C.D., et Gillevet, P.M. (2002). Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J Ind Microbiol et Biotechnol.*, 28 (1), 48-55

-Litchfield. C.D. (1998). Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritical Society. Meteoritics and Planetary Science.*, 33, 813-819

- Locquin, M. (1984).** Mycologie générale et structurale. Ed. Masson. p551.
- Loyer. J.Y. (1991).** Classification des sols salés : les sols salit. cah. orstom, sér. pédol, 26 (1), 51-61
- Lutzoni. F., Kauff. F., Cox. C.J., McLaughlin. D., Celio. G., Dentinger. B., Padamsee. M., Hibbett. D., James. T.Y., Baloch. E., Grube. M., Reeb. V., Hofstetter. V., Schoch. C., Arnold. A.E., Miadlikowska. J., Spatafora. J., Johnson. D., Hambleton. S., Crockett. M., Shoemaker. R., Sung. G.H., Lücking. R., Lumbsch. T., O'Donnell. K., Binder. M., Diederich. P., Ertz. D., Gueidan. C., Hansen. K., Harris. R.C., Hosaka. K., Lim. Y.W., Matheny. B., Nishida. H., Pfister. D., Rogers. J., Rossman. A., Schmitt. I., Sipman. H., Stone. J., Sugiyama. J., Yahr. R., et Vilgalys. R. (2004).** Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. American Journal of Botany., 91 1446–1480

M

- Mazure. P., Nakanishi. K., El-Zayat. A.A.E. et Champ. S.P. (1991).** Structure and synthesis of sporogenic psifactors from aspergillus nidulans. J. Chem. Soc. Chem. Commun., 20, 1486-1487
- Mcgenity. T.J., Gemmell. R.T., Grant. W.D., et Stan-Lotter. H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. Environ Microbiol., 2, 243-250
- Messai N., (2016).** Étude de la bioécologie et de la structure du peuplement des moustiques (diptera : culicidae) dans les zones humides des hautes plaines du sud constantinois. Thèse de doctorat, Université des Frères Mentouri Constantine Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de biologie animale, Algérie. 126p.
- Messai. N., Aoutai. A., et Berchi. S. (2016).** Impact of the surface water physicochemical parameters on Culicidae (Diptera: Nematocera) of lakeside Ecosystem "Sebkhet Ezzemoul" (Oum El Bouaghi -Algeria). Journal of Entomology and Zoology Studies., 4(3), 391-398
- Moali A. et Remichi Z. (2009).** Sebkhet Ezzemoul (Wilaya d'Oum El Bouaghi). Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar (FDR). 12p.
- Moroh, J. L. A. (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides (Doctoral dissertation, Brest).
- Muylaert. A., et Mainil. J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». Service de bactériologie, département des maladies infectieuses et parasitaires, faculté de médecine vétérinaire, université de Liège, 20 Boulevard de Colonster, bâtiment 43a, 4000 Liège. Ann. Méd. Vét., 156, 109-123

N

-Nasirian. H., Taghi Sadeghi. S.M., Vazirianzadeh. B., Moosa-Kazemi. S.H. (2014). New record of *Aedes vittatus* and *Culiseta subochrea* (Diptera: Culicidae) and their distribution from Shadegan Wetland, South Western Iran. *Journal of Entomology and Zoology studies.*, 2 (5), 271-275

-Nasraoui B. (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées. Tunisie. Institut National Agronomique de Tunisie. 180p.

-Nwe. N., Stevens. W. F., Tokura. S., et Tamura.H. (2008). Characterization of chitin and chitosan-glucan complex extracted from cell wall of fungus *Gongronella butleri* USDB 0201 by enzymatic method. *Enzyme and Microbial Technology.*, 42, 242- 251

O

-Olaitan. A.O., Morand. S., et Rolain. J.M., (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: **acquired and intrinsic resistance in bacteria.** *Frontiers in Microbiology.*, 26(5),643-650

-Oren. A. (2002). Diversity of halophilic microorganisms: environments phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 28, 56-63.

-Oren. A. (2006) . Life at high salt concentrations. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.H., Stackebrandt E (eds) *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology and Biochemistry.* Springer, New York, 2, 263-282

-Oren. A. (2008). Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems*, 4(2), 1-13

-Oren. A. (2011). Diversity of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer, 309-329

-Ounadjela A.Z., (2016). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures)

P

-Pamel. E.V., Vlaemynck. G., Heyndrickx. M., Herman. L., Verbeken. A., et Daeseleire E. (2011). Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates. *Mycotox. Res.*, 27(1), 37-47

-Pochon . J. et Tardieux . P. (1962). Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tournelle. St. Mandé., 110 - 111

Producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema). Thèse de doctorat, Université de Tlemcen, Algérie. 81p.

R

-Rachel Sarah G., (1998) . Physiology of Halophilic Archaea Isolated from Ancient Salt Deposits. Thèse de doctorat, Université de Leicester, Angleterre. 287p.

- Ramirez. C. (1982).** Manual and atlas of the Penicillium. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Reboux. G. (2006).** Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique., 208–212.
- Reboux. G., Bellanger. A-P., Roussel. S., Grenouillet. F., et Million. L. (2010).** Moisissures et habitat : Risque pour la santé et espèces impliquées. Revue française d'allergologie., 50, 611-620
- Riccardi. J.L. (2008).** Discovery of aflatoxins and significant historical features. Toxin Reviews, 27,171– 201.
- Richard. K. F. (2005).** Génomique fonctionnelle in vivo de l'oxydoréductase PA3498 chez *Pseudomonas aeruginosa*. Université Laval, Québec. Paris. . 36-153
- Rodriguez-Valera. F., Ventosa. A., Juez. G., et Imhoff. J.F. (1985).** Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multi-ponds saltern. Microbial Ecology.,11, 107-115
- Roquebert M-F. (1997).** Les moisissures : nature, biologie et contamination. Muséum national d'histoire naturelle., 1-13.
- Roussel. E.G., Cambon Bonavita. M-A., Querellou. J., Cragg. B.A., Webster. G., Prieur. D., et Parkes. R.G. (2008).** Extending the subsea-floor biosphere. Science., 320 (5879), 1-3
- Ruppel. P., Delfosse. P.H., et Hornick. J.L. (2004).** La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. Ann. Méd. Vét., 148, 141-146

S

- Samraoui. B., Chakri . K., et Samraoui .F.(2006).** Large branchiopods (Branchiopoda: Anostraca, Notostraca and Spinicaudata) from the salt lakes of Algeria. Journal of Limnology., 65, 83-88.
- Samson, R.A. et Hoekstra, E.S. (1988).** Introduction to food –born fungi , 3rd edn .Centraalbureau Voor .Schimmelcultures. Baane. The Netherlands. ISBN., 90,70351-16-1
- Sapin. J. (2009).** L'archéologie de la mer Morte, géographie et climat de la mer Morte. Revue d'archéologie et d'histoire, 1-63
- Sarah B., (2011).** Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales

respiratoires in vitro. thèse de doctorat, l'Université Paris EST, Ecole doctorale : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé, France. 185p.

-Savado, A. et Traoré, A.S. (2011). La flore microbienne et les propriétés fonctionnelles des yaourts et laits fermentés. *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 5(5), 1-19

-Schmit, J.P. et Mueller, G.M. (2007). An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodiversity and Conservation.*, 16, 99-111

-Scriban. R. (1999). Biotechnologie. 5ème édition. Technique et Documentation. Lavoisier. Paris. 149-159.

-Smith. N. R., Gordon. R. E. et Clark. F.E. (1952). Aerobic spores-forming bacteria. *J. Appl. Bact.*, 27, 78-99.

-Sutton D.A., Fothergill A.W., et Rinaldi M G.(1998). GUIDETO clinically Significant fungi. synthesis of sporogenic psifactors from *Aspergillus nidulans* .*J. Chem.Soc. Chem.*

T

-Tchamba. G.B., Bawa. H.I., Nzouankeu. A., Bagré. T.S., Dembélé. R., Bonkougou. I.J.O., Zongo. C., Savado. A., Traoré. A.S., et Barro. N. (2014). Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. isolated from “zoom-koom” beverage and ice in Ouagadougou, Burkina Faso. *African Journal of Microbiology Research.*, 8, 3243-3249

-Tortora. G.J., Funke. B.R., et Case. C.L. (2003). Le métabolisme microbien. Introduction à la Microbiologie., 7, 124-168.

-Trail.f.,Mahinti.N.,etLinz.J.(1994). Molecular biology of aflatoxine biosynthesis. *Microbiology.*,141,775-765

Trinci. A.P.J. (1969). A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. *Microbiology.*, 57, 11-24

U

-Ulacio. D., Perez. C., et Pineda. Y.J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in Portuguesa state, Venezuela. *Bioagro.*, 9 (1), 3-11

-Ul-Haq. I., Mukhtar. H., Daudi. S., Sikander. A. et Quadeer. M. A. (2003). Production of proteases by a locally isolated mould culture under lab conditions.*Biotechnology.*, 2 (1),30-36.

V

-Vachel, J. P. et Février, R. (1952). Les antibiotiques dans l'alimentation animale. *Annales de zootechnie, INRA/EDP Sciences.*, 1(4), 53-91

Y

-Yiannikouris, A. et JOUANY, J.P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Production Animale., 15(1), 3-16

-Youcef A.M., (2014). Etude de l'activité anti-Candida albicans des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. Thèse de Doctorat. Université Constantine 1 Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie Département de Microbiologie, Algerie. 112p.

Annexe

Annexe 1

Milieu Potato dextrose agar (PDA)

Pomme de terre	200 g
Glucose	20 g
Agar	20 g

Eau distillée.....compléter jusqu'à 1000 ml

- 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 de glucose.
- Ajouter d'agar.
- Compléter le volume à 1000 ml.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 20 min.

Annexe 2

Eau physiologique

Eau distillée.....45 ml

- 05 tubes en verre, dans chaque flacon, placez 9 ml d'eau physiologique.
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

Annexe 3

Préparation du Bouillon nutritif (BN)

Le bouillon nutritif a été préparé pour le but de la réactivation et l'entretien des souches bactériennes.

Bouillon nutritif..... 30 g

L'eau distillée..... 1 L

Une agitation pendant quelques minutes, la solution sera divisée dans des tubes en verre.

Annexe 4

Milieu Mueller-Hinton

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

Agar..... 17g

Infusion de bœuf..... 300g

Hydrolysatacide de caséine17,5g

Hydrolysate acide de caséine17,5g
 Amidon1,5 g
 Eau distillée.....1000ml
 pH = 7,3

Annexe 5

Inhibition de la croissance des bactéries pathogènes : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*

Les souches	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>
S1	/	/	+++
S2	/	+++	++++
S4	+++	+++	++++
S8	/	/	+++
S10	/	/	++++
S11	++++	/	/
S12	+++	+++	++
S16	/	+++	/
S17	++	/	/
S20	/	+++	+++

Inhibition : (++) (Inhibition faible), (+++) inhibition moyen, (+++++) inhibition fort.

Annexe 6

Activité enzymatique (Gélose au lait)

Ce milieu (la gélose au lait) présente plusieurs avantages tels que la simplicité de préparation, la variété et la richesse en protéines et le faible coût.

Préparation 1

Lait écrémé poudre 05g
 Eau distillée 50ml
 Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

Préparation 2

Agar 01g

Eau distillée 50ml

Stérilisation par autoclave à 121°C / 20min

N.B : La stérilisation des deux préparations se fait séparément, ensuite et au moment de l'utilisation les deux préparations sont mises en surfusion (45°C) et mélangées puis coulées sur boîte pétri. Après séchage, le milieu est ensemencé.

Annexe 7

Résultats de la mise en évidence de l'activité enzymatique

Souches	Caséinase	Diamètre
S1 <i>Fusarium sp1</i>	+	1,4 cm
S2 <i>Penicillium sp1</i>	–	/
S4 <i>Geotricum sp1</i>	–	/
S8 <i>Penicillium sp</i>	–	/
S10 <i>Fusarium sp2</i>	–	/
S11 <i>Penicillium sp3</i>	+	1,2 cm
S12 <i>Absidia sp</i>	+	1,6 cm
S16 <i>Alternaria sp2</i>	+	2,1 cm
S17 <i>Fusarium sp3</i>	–	/
S20 <i>Geotricum sp2</i>	–	/

Résumé

Abstract

Our work is launched in early March 2019 in order to study the antibacterial activity of isolated molds from Sebkha Ezzemoul which is a salt lake located in the region of Ain M'Lila (wilaya of Oum El Bouaghi). The sample was taken from the soil of the rhizosphere of adjacent plants, the isolation and the purification of the molds were carried out on a PDA culture medium with 3 concentrations of NaCl (1.5%, 5% and 10%) and resulted in 20 mold isolates. Microscopic identification revealed molds of the genus *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Geotricum*, *Cladosporium*, *Ulocladium* and *Absidia*, which are selected by the technique of Agar cylinders for the demonstration of the antibacterial activity with respect to three bacterial strains; *Escherichia coli* Gram⁻, *Pseudomonas aeruginosa* Gram⁻, *Bacillus cereus* Gram⁺. The results obtained show that ten isolates have more or less considerable antibacterial activity in which the averages of the zones of inhibition reach 1.5 cm in diameter. In addition, the selected molds are capable of secreting important metabolites such as the protease enzyme.

Keywords: Sebkha, mold, halophil, bacteria, antibacterial activity, enzymatic activity.

ملخص

تم بدأ عملنا في أوائل مارس 2019 لدراسة النشاط المضاد للبكتيريا من الفطريات المعزولة من سبخة الزيمول وهي بحيرة مالحة تقع في منطقة عين مليلة (ولاية أم البواقي). تم أخذ العينة من تربة جذر المحيط للنباتات المتجاورة ، وتم تنفيذ عزل وتنقية الفطريات على وسط غذائي PDA مع 3 تراكيز مختلفة من ملح كلور الصوديوم (1.5% ، 5% و 10%) وسمحت الحصول على 20 عزلة من الفطريات . كشف الفحص المجهرى عن الفطريات من جنس *Penicillium*, *Fusarium* خلال تقنية اسطوانات آجار لعرض النشاط المضاد للبكتيريا فيما يتعلق بثلاث سلالات بكتيرية *Alternaria* , *Aspergillus*, *Geotricum*, *Cladosporium*, *Ulocladium*, *Absidia*, *Escherichia* Gram⁻ حيث أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن عشر عزلات لها نشاط مضاد للجراثيم بشكل أو بآخر حيث يصل متوسط قطر التنشيط إلى 1.5 سم. بالإضافة إلى ذلك ، القوالب المختارة قادرة على إفراز الأيضات الهامة مثل إنزيم البروتياز.

الكلمات المفتاحية : سبخة ؛ فطر ، halophilic ، بكتيريا ، النشاط المضاد للبكتيريا ، النشاط الأنزيمي.

Résumé

Notre travail est lancé au début du mois Mars 2019 dans le but d'étudier l'activité antibactérienne des moisissures isolées à partir de Sebkha Ezzemoul qui est un lac salé localisée dans la région d' Ain M'Lila (wilaya d'Oum El Bouaghi). L'échantillon a été prélevé à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes, l'isolement et la purification des moisissures ont été réalisés sur milieu de culture PDA avec 3 concentrations en NaCl (1.5%, 5% et 10%) et permis l'obtention de 20 isolats de moisissures. L'identification microscopique a révélé des moisissures de genre *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Geotricum*, *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Absidia*, qui sont sélectionnées par la technique des cylindres d'Agar pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne vis-à-vis de trois souches bactériennes; *Escherichia coli* Gram⁻, *Pseudomonas aeruginosa* Gram⁻, *Bacillus cereus* Gram⁺. Les résultats obtenus montrent que dix isolats présentent une activité antibactérienne plus au moins considérable où les moyennes des zones d'inhibition atteignent 1.5 cm de diamètres. De plus, les moisissures sélectionnées sont capables de sécréter des métabolites importants comme l'enzyme de protéase.

Mots clés : Sebkha, moisissures, halophile, bactéries, activité antibactérienne.