



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : **Microbiologie**

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes : Fermentation et Production de
substance Fongique.

Intitulé :

Etude de l'activité antibactérienne de moisissures isolées à partir
des milieux salins

Présenté par :

BENGHRIB Amira

&

GERBOUA Wissam

Soutenu le : 27/06/2018

Jury d'évaluation :

Présidente : BENSERRADJ Ouafa

MCB. Université de Mila

Encadrante : MILET Asma

MAB. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Examinatrice : BATAICHE Insaf

MCB. Université des Frères Mentouri Constantine 1.

Année universitaire
2017 - 2018

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَالْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ

Remerciement

Tout d'abord, on rend grâce à Allah, le tout puissant, qui nous a donné la Force, le courage, la santé et la patience pour accomplir ce travail.

En préambule à ce mémoire, nous souhaitons adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui, de près ou de loin, nous ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire.

En second lieu, on remercie chaleureusement notre encadreur Mme. Milet Asma, de nous avoir données la possibilité de réaliser ce travail sous sa suivie et pour le temps qu'elle nous a consacré, sa patience, ses précieux conseils, son soutien tout le long de la réalisation de notre mémoire ainsi que pour sa gentillesse, sa bienveillance et ses qualités profondément humaines qui ont été remarquables.

Nos vifs remerciements vont également aux membres de jury de ce mémoire qui ont accepté de juger ce travail :

Un merci particulier à notre présidente de jury Mme. ARABET Dallel de nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de notre mémoire.

Un merci particulier à l'examinatrice de ce mémoire Mme. BATAICHE Insafe, pour avoir accepté d'examiner et évaluer notre travail.

Nous tenons à remercier aussi les ingénieures des laboratoires de Microbiologie de l'Université des Frères Mentouri (Constantine), qui ont contribué au bon déroulement des travaux pratiques de ce mémoire.

Un grand remerciement pour tous nos enseignants pour leurs contributions dans notre cursus universitaire au département de Microbiologie, faculté des science de la nature et de la vie Frères Mentouri Constantine.

Enfin, Un grand merci est adressé aussi à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

« La réussite ne se trouve pas dans la meilleure des places, la plus haute ou la plus payante mais dans le maximum qu'on peut tirer de soi-même ».

RENAUD TREMBLAY

Je dédie ce travail :

En termes d'amour et de fidélité, je dédie ce mémoire,

À ma mère Mareim son ventre Allah et sa concubine spacieuse, c'était sa volonté et lui m'aiment une forte incitation à compléter les titres de l'école.

A mon très cher père Mohammed, qui m'a toujours aidé et guidé vers le chemin de la réussite.

Quoique je fasse, je ne pourrai vous rendre ce que vous avez fait pour moi, je dois toute ma vie et tous mes succès pour vous, puisque si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous. Que vous garde et vous protège pour nous.

Dieu

À mes très chers et meilleur frères : Ahmed et Fadi

À mon adorable sœur : Intissare faite mieux que moi dans tes études.

La personne plus proche de mon cœur Mohammed Amin pour leur aide et leurs encouragements.

A toute ma famille et mes ami surtout Nadjela, Cherifa, Noor el houda , Khadidja, youssra, Houda, Insafe, Warda et mon binôme Amira.

A tous mes camarades de promotion pour ces années mémorables

Wissam

Je dédie ce travail :

Â mes chers parents

Mon cher Papa Riad, Signe de fierté et d'honneur, ce travail est le votre, Inchallah tu trouveras ici toute mon affection et ma profonde gratitude pour toutes ces années de sacrifice pour moi.

Ma chère Maman Amel, Nul mot ne parviendra jamais à exprimer l'amour que je te porte. Ton amour, ta patience, ton encouragement et tes prières ont été pour moi le gage de la réussite. J'espère que ce travail soit à tes yeux le fruit de tes efforts et n témoignage de ma profonde affection.

Â mes chers frères Oussama, Mehdi, Mouataz Billah et nabil Essadat

Â ma chère sœur Nour Eldjanet

Â ma chère grand-mère Fatima

Â tous ceux qui s'intéressent à ma réussite.

Et Â mon binôme Wissem

Amira

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations	
Liste de tableaux	
Liste de figures	
1- Introduction	3
2- Revue bibliographique	4
2.1- Environnements salins et hypersalins	5
2.1.1- Environnements thalassohalins	6
2.1.2- Environnements athalassohalins	7
2.2- Sols salés	9
2.3- Classification des sols salés	9
2.3.1- Sols à complexe sodique ou sols alcalins	9
2.3.2- Sols salins (solontchaks)	9
2.4- L'interaction microbe-plante	10
2.4.1- La symbiose	10
2.4.2- Les champignons micorhizienne	11
2.4.3- La rhizosphère	12
2.5- Antagonisme dans le sol	12
2.6- Microorganismes halotolérants et halophiles	12
2.6.1- Diversité phylogénétique des halophiles	13
2.6.1.1- Eucaryotes halophiles	14
2.6.1.2- Archaea halophiles	14
2.6.1.3- Bactéries halophiles	15
2.6.2- Diversité métabolique des halophiles	16
2.7- Généralités sur les moisissures	17
2.7.1- Position systématique	17
2.7.2- Les moisissures halotolérants	18
2.7.3- Applications biotechnologique des moisissures halophiles	19
2.8- <i>Aspergillus</i>	19

2.8.1- Généralités	20
2.8.2- Caractères cultureux	20
2.8.3- Caractères morphologiques	20
2.8.3.1- Caractères macroscopiques	20
2.8.3.2- Aspect microscopique	21
2.8.4- Taxonomie	21
2.8.5- Production des métabolites secondaires	22
2.9- <i>Penicillium</i>	23
2.9.1- Généralités	23
2.9.2- Caractères cultureux	23
2.9.3- Caractères morphologiques	23
2.9.3.1- Caractères macroscopiques	24
2.9.3.2- Aspect microscopique	24
2.9.4- Taxonomie	24
2.9.5- Production des métabolites secondaires	25
2.10- <i>Paecilomyces</i>	25
2.10.1- Généralité	25
2.10.2- Caractères cultureux	26
2.10.2.1- Morphologie microscopique	26
2.10.3- Taxonomie	27
2.10.4- Métabolites secondaires	27
2.11- <i>Geotrichum</i>	27
2.11.1- Habitat	27
2.11.2- Caractères cultureux	27
2.11.2.1- Caractères macroscopiques	27
2.11.2.2- Caractères microscopiques	28
2.11.3- Taxonomie	28
2.11.4- Métabolites secondaires	28
2.12- <i>Colletotrichum</i>	28
2.12.1- Caractères microscopiques	28

2.12.2- Taxonomie	29
2.12.3- Métabolites secondaires	29
2.13- <i>Humicola</i>	29
2.13.1- Taxonomie	29
2.13.2- Métabolites secondaires	30
2.14- Microorganismes pathogènes	30
2.14.1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.14.1.1- Habitat	30
2.14.1.2- Caractéristique microbiologique	30
2.14.1.2.1- Caractères morphologiques	30
2.14.1.2.2- Caractères Cultureux	31
2.14.1.2.3- Caractères biochimiques	32
2.14.1.3- Pouvoir pathogène	32
2.14.1.4- Résistance aux antibiotiques	32
2.14.2- <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.14.2.1- Habitat	33
2.14.2.2- Caractères microbiologiques	33
2.14.2.2.1- Caractères morphologiques	33
2.14.2.2.2- Caractère cultureux	34
2.14.2.2.3- Caractères biochimiques	34
2.14.2.3- Pouvoir pathogène	34
2.14.2.4- Résistance aux antibiotiques	35
2.14.3- <i>Bacillus subtilis</i>	35
2.14.3.1- Habitat	35
2.14.3.2- Caractères Microbiologique	
2.14.3.2.1- Caractères morphologiques	35
2.14.3.2.2- Caractères cultureux	36
2.14.3.2.3- Caractères biochimiques	36
2.14.3.3- Pouvoir pathogène	36
2.14.3.4- Résistance aux antibiotiques	36

2.14.4- <i>Escherichia coli</i>	37
2.14.4.1- Habitat	37
2.14.4.2- Caractères microbiologiques	37
2.14.4.2.1- Caractères morphologiques	37
2.14.4.2.2- Caractères cultureux	37
2.14.4.2.3- Caractères biochimiques	38
2.14.4.3- Pouvoir pathogène	38
2.14.4.4- Résistance aux antibiotiques	38
2.14.4.4.1- Résistance naturelle	38
2.14.4.4.2- Résistance acquise	39
3- Matériel et méthodes	40
3.1- L'agent pathogène	40
3.2- Isolement de l'agent antagoniste	40
3.2.1- Echantillonnage	40
3.2.2- Isolement et purification	46
3.2.3- Conservation de moisissures	46
3.3- Etude de l'activité anti- bactérienne	47
3.4- Identification des isolats sélectionnés	47
3.4.1- Observation macroscopique	47
3.4.2- Observation microscopique	48
3.5- Etude de l'activité enzymatique	48
3.5.1- Détermination de l'activité protéolytique	48
3.5.2- Détermination de l'activité lipolytique	50
4- Résultats et Discussion	51
4.1- L'agent pathogène	51
4.2- Isolement de l'agent antagoniste	52
4.3- Sélection d'isolats halophiles à effet antibactérien	53
4.4- Identification des souches	53

4.4.1- Etude macroscopique	59
4.4.2 - Etude microscopique	64
4.5 - Etude de l'activité anti-bactérienne	68
4.6- Activités enzymatiques	73
5- Conclusion	75
6- Références bibliographique	
7-Résumé	
8-Summary	
9- الملخص	
10- Annexe	

Liste des abréviations

% : Pourcent.

CO₂ : Dioxide de carbone.

°C : Degré Celsius.

µm : Micromètre.

ADN : Acide désoxyribonucléique.

pH : Potentiel hydrogène.

H₂S: Sulfure d'hydrogène.

R : Résistant.

S : Sensible.

- : Négative

+ : Positif.

OX : Oxydase.

CAT : Catalase.

COAG : Coagulasse.

DNase : Désoxyribonucléase.

MAN : Mannose.

PYRA : Pyrrolidonyl arylamidase.

VP : Réaction de Voges- Proskauer.

ARNr 16S: Acide ribonucléique codant pour la petite sous-unité 16S de l'ARN ribosomal

ATP : Adénosine Tri-Phosphate

C: Cytosine

CaCl₂: Chlorure de calcium

DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

EC: Enzyme Commission numbers

FeCl_3 : Tri-chlorure de fer

G: Guanine

GMP: Guanosine monophosphate

KCl: Chlorure de potassium

kDa: kilodalton

KH_2PO_4 : Dihydrogénophosphate de potassium

LDC: Lysine Décarboxylase

M: Molarité

MgCl_2 : Chlorure de magnésium

Na_2CO_3 : Carbonate de sodium

Na_2HPO_4 : Di-sodium hydrogénophosphate

NaBr: Bromure de sodium

NaCl: Chlorure de sodium

NaH_2PO_4 : Dihydrogénophosphate de sodium

NaHCO_3 : Hydrogénocarbonate de sodium

NaOH: Hydroxyle de sodium

NH_4Cl : Chlorure d'ammonium

Liste de tableaux

Tableau 1. Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

Tableau 2. Principales caractéristiques de classification des moisissures.

Tableau 3 La classification des *Penicillium sp*

Tableau 4 Principaux caractères morphologiques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 5 Principaux caractères cultureux de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 6 Principaux caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tableau 7 Principaux caractères morphologiques de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 8 Principaux caractères cultureux de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 9 Principaux caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus*.

Tableau 10 Caractères biochimiques de *Bacillus*.

Tableau 11 Isolats microbiens obtenus à partir du Sebkh Ezzmoul d'Ain-mlila de différents sites prospectés.

Tableau 12 Inhibition de la croissance des bactéries pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sous l'effet des isolats fongiques obtenus.

Tableau 13 Etude macroscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkh Ezzmoul d'Ain-mlila.

Tableau 14 Etude microscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkh Ezzmoul d'Ain-mlila.

Tableau 15 Effet des moisissures halophiles sur les bactéries testées.

Tableau 16 Résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

Liste de figures

- Figure 1. Environnements thalassohalins A, Marais salants à Formentera en Espagne (Gerdey et Glansdorff, 2007) et B, Marais salants de l'île de Ré en France.
- Figure 2. Environnement athalassohalins. A, la Mer Morte et B, le Lac Rose Salé au Sénégal.
- Figure 3. Arbre phylogénétique universel issu d'une analyse comparative des séquences de gènes ribosomiaux. Les groupes phylogénétiques contenant des membres halotolérants et halophiles (Croissent bien à 100 g/l) sont indiquées en lignes gras.
- Figure 4 Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*.
- Figure 5 Schéma d'une tête *Aspergillaire*
- Figure 6 Localisation de la sebkha Ezzemoul
- Figure 7 Localisation géographique de la zone d'échantillonnage (sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila).
- Figure 8 Site (1) d'échantillonnage à partir de l'eau
- Figure 9 Sites d'échantillonnages (S2, S4) à partir de la rhizosphère de plantules de sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila
- Figure 10 Sites d'échantillonnage (S3) à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.
- Figure 11 Sites d'échantillonnage (S5) à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.
- Figure 12 Méthode de dilution
- Figure 13 Boîte de Pétri présentant l'activité des isolats obtenus vis-à-vis les bactéries pathogènes.
- Figure 14 Résultat de la croissance des souches protéolytique sur gélose au lait.
- Figure 15 Résultat de la croissance des souches lipolytiques sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile
- Figure 16 Résultat de la croissance des souches lipolytiques sur milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80
- Figure 17 Différentes zones de lyses obtenues par dix neuf souches vis à vis les bactéries testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633).

Introduction

1- Introduction

Les bactéries pathogènes sont responsables de plusieurs maladies épidémiques et pandémiques (Moroh, 2013). Ils sont des organismes unicellulaires microscopiques. Il en existe des milliers de types différents, et elles vivent dans tous les environnements possibles, partout dans le monde (Larry et Bush)

Dans certains cas, l'agent causal d'une maladie est hautement spécifique : telle maladie ne peut être causée que par l'espèce appropriée, ou seulement par des souches particulières de cette espèce (Paul *et al.*, 2004). *Pseudomonas aeruginosa* est un pathogène opportuniste peuvent provoquée des infections endogènes ou exogène (Grosjean *et al.*, 2011). *Bacillus subtilis* est un germe saprophyte, rarement pathogène pour l'homme, plus signalées des infections graves (endocardite, septicémie, pneumonie) (Carip, 2008). De nombreuses infections provoquées par *Escherichia coli* peuvent se rencontrer, certaines localisées aux voies digestives et autre aux voies urinaires (Berche *et al.*, 1989). *Staphylococcus aureus*, est une bactérie ubiquitaire, flore résidente de la peau de l'homme et des animaux (Grosjean *et al.*, 2011) elle provoque des Infection suppuratives de la : peau, tissu mou, muscle, os, tractus respiratoire, valve cardiaque et tractus urinaire.

A partir d'une succession d'observation et de travaux de nombreux chercheurs dont Pasteur, Joubert, Duchesne, la quête a abouti à la découverte des antibiotiques, depuis cette découverte, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et contribué à l'essor de la médecine moderne (Moroh, 2013).

Si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, surtout bactériennes, il n'en a nullement modifié la morbidité. Cet usage fréquemment abusif, est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec, pour conséquence, une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques. Face à cette augmentation, le besoin de nouveaux traitements antibactériens efficaces est de plus en plus impérieux (Berger Savin, 2014). Ces antibiotiques ou métabolites secondaires sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. La grande découverte de Fleming qui a remarqué un phénomène inhabituel sur une ancienne plaque de culture de *Staphylococcus aureus* (Fleming, 1929). Un champignon contaminant, *Penicillium notatum*, avait inhibé la croissance bactérienne des staphylocoques en libérant un agent antibactérien dans la zone

adjacente à sa croissance, Il a ainsi attribué le nom «pénicilline» à ce composé inhibiteur en raison de sa provenance.

En 1940, White a signalé qu'une souche d'*Aspergillus flavus*, cultivée sur certains milieux liquides, ont donné des filtrats qui ont montré une activité antibactérienne contre certaines bactéries gram-négatives et gram-positives (Edwin *et al.*, 1942). Glister (1941) a également rapporté avoir obtenu un puissant concentré antibactérien d'un *Aspergillus flavus*, mais apparemment pas sous forme cristalline pure.

La connaissance des champignons a fait de large progrès ces dernières années, l'extraordinaire potentialité des champignons appliqués aux grands secteurs industriels, est illustré par la biotechnologie fongique (Bouchet, 2005). Ils ont une capacité de sécréter différents métabolites secondaires. Ces substances ont été identifiées comme étant importantes au processus d'assimilation fongique de substances nutritives, incluant des enzymes fongiques (Pasqualatto, 2008). Malgré le progrès continu de la science, la connaissance de la biologie des moisissures reste partielle.

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 (Frisvad, 2005).

De ce fait l'objectif principal du présent travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne d'isolats fongiques du genre *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Colletotrichum* et *Humicola* sélectionnés à partir de sebkha d'Ezzemoul, Ain M'Lilla.

Pour ce faire, ce travail comporte les parties suivantes: Une synthèse bibliographique approfondie contenant des informations relatives aux sols salés, microorganisme halophile, microorganismes pathogènes testés, les genres antagonistes précédemment citées (*Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Colletotrichum* et *Humicola*). Une étude expérimentale scindée en quatre parties ; la première partie repose sur l'isolement, la purification et l'identification de l'agent antagoniste halophile à partir des échantillons du sol, d'eau et de plantes prélevés de différents endroits de la sebkha d'Ezzemoul «Ain Mlilla» vis-à-vis des bactéries pathogènes, en l'occurrence, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Colletotrichum* et *Humicola*. La deuxième partie de l'étude expérimentale est concentrée sur la caractérisation des souches les plus performantes et ses capacités à produire des enzymes hydrolytiques (protéase et lipase); alors que la quatrième partie porte sur l'évaluation de l'effet antagoniste des souches les plus performantes.

Le mémoire se termine par des résultats qui ont fait l'objet d'une discussion approfondie et enfin, une conclusion qui ouvre des perspectives de recherche sur le thème étudié.

Revue
Bibliographique

2- Revue bibliographique

Les données actuelles se résument dans le bassin méditerranéen en 16 millions d'hectares de sol salés dont 3.2 millions en Algérie (Hamdy, 1999). Ainsi. Ces surfaces affectées sont passées de 48 millions à 265 millions d'ha de terres agricoles touchées par la salinité et les surfaces agricoles affectées dans le monde seraient de 340 millions d'ha. soit 23% des terres cultivées dans le monde (Cheverry, 1994).

2.1- Environnements salins et hypersalins

Deux types majeurs d'environnements hypersalins biologiquement importants où le facteur sel agit sur les populations microbiennes sont le sol et l'eau. Les sols contenant une concentration en sels solubles supérieure à 0,2 % (p/v), sont considérés comme salins (Kaurichev, 1980). Ils sont fréquents en régions arides et de nombreuses plantes halophytes se sont adaptées à de telles conditions.

Les eaux sont considérées salées lorsque la salinité dépasse 0,3 % (p/v) et on définit les eaux hypersalées comme celles présentant des concentrations en sels minéraux supérieures à celle de l'eau de mer (3,3 % (p/v)) (Edgerton & Brimblecome, 1981).

La vie microbienne peut être trouvée sur un éventail extrême de concentrations en sel; passant de l'eau douce (contenant moins de 0,5 g/l de sel dissous), à l'eau de mer et enfin aux environnements hypersalins (Oren, 1999).

Selon Aubert (1976). La salinisation est le processus pédologique suivant lequel le sol s'enrichit anormalement en sels solubles. Acquéant ainsi les caractères salins. Les eaux marines constituent le plus grand biome sur notre planète avec une concentration en sel autour de 35g/l, et les environnements hypersalins ont été définis comme ceux ayant des concentrations salines au-dessus de celle-ci (Oren, 1999; Gerday et Glansdorff, 2007). 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. Selon les estimations, ces sols salins représenteraient sur la planète une superficie de l'ordre de 260 millions (Dudal, 1990) à 340 millions d'hectares (Szabolcs, 1989).

La diversité des propriétés des habitats salins et hypersalins sur terre est reflétée par la grande diversité au sein des communautés microbiennes adaptées à la vie sous les

conditions dominantes (Oren, 2002a; 2002b; 2006). les sols contenus dans l'eau ou le sol réduisent l'eau disponible pour les plantes au point de nuit à leurs rendement. Ces sels sont représentés en grande partie par des cations (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , et le K^+), et des anions (Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- , CO_3^{2-} et NO_3^-) (Kenfaoui, 1997). Ces propriétés sont principalement définies selon la concentration totale en sel et la composition ionique (Rodriguez-Valera, 1993; McGenity *et al.*, 2000; Oren, 2002a; 2006).

Les environnements hypersalins sont divisés en deux types d'environnements : thalassohalins et athalassohalins (Gerday et Glansdorff, 2007).

2.1.1- Environnements thalassohalins

Beaucoup d'environnements hypersalins proviennent de l'évaporation de l'eau de mer, favorisée par un écoulement restreint, une température élevée, de basses précipitations, etc. De tels environnements aquatiques sont désignés sous le nom de thalassohalins (du grec *thalasso*, la mer) (McGenity *et al.*, 2000; Oren, 2002a; 2006) Cependant, cette définition n'est pas spécifique, on doit également tenir compte de l'origine et des types de sels et de leur proportion. La majorité des milieux hypersalés ont pour origine les eaux de mer et sont dites thalassohalines (Figure 1).



Figure 1. environnements thalassohalins **A**, Marais salants à Formentera en Espagne (Gerday et Glansdorff, 2007) et **B**, Marais salants de l'île de Ré en France (poitevin *et al.*, 2004).

Leurs sels minéraux sont dans les proportions semblables à celles de sels contenues dans l'eau de mer, tant que les seuils de précipitation ne sont pas atteints. Des exemples de thalassohalines sont de marais salants créés dans le nombreux pays afin de produire du sel, les lacs hypersalés de l'antarctique, la sebkha Gavish près de la mer rouge, etc (kharroub ,2007). Les premiers sels à précipiter sont la calcite (CaCO_3), le gypse ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), la halite (NaCl), la sylvite (KCl), et enfin la carnallite ($\text{KMgCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Litchfield et Gillevet, 2002; Grant, 2004; Gerday et Glansdorff, 2007).

La concentration finale des plans thalassohalins est dominée par le magnésium et les ions de chlorure mais durant l'évaporation, certains changements peuvent survenir dans la composition ionique des gypses ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ou des autres minéraux (Oren, 2002).

Des exemples d'environnements thalassohalins sont représentés par le Grand Lac Salé, Utah(USA), les marais salants en France et en Espagne, etc. (Litchfield et Gillevet, 2002). Les marais salants ou salines sont formés d'une série d'étangs reliés par des pipes et des canaux dans lesquels l'eau de mer est progressivement concentrée jusqu'à précipitation du chlorure de sodium qui est ensuite récolté et commercialement exploité (MacDonald *et al.*, 1990 ; Anton *et al.*, 2000).

2.1.2- Environnements athalassohalins

Les eaux athalassohalines proviennent de la dissolution d'évaporites par l'eau, comme la Mer Morte, Le Grand lac Salé Utah, le Lac Rose Salé au Sénégal et certaines sebkhas situées en zones semi-arides et arides. Ces environnements ont une composition ionique saline différente de celle de l'eau de mer (Rodrigues Valera, 1993 ; Litchfield et Gillevet, 2002; Oren, 2002a; Roussel *et al.*, 2008) (Figure 2).



Figure 2. Environnement athalassohalins. **A**, la Mer Morte (**sapin, 2009**) et **B**, le Lac Rose Salé au Sénégal (**Brechot, 2007**).

Il existe également des lacs hypersalés alcalins tels que le lac Magadi au Kenya (Figure 2), le lac Wadi Natrun en Egypte (Tableau 1), le lac Mono et le lac Owens aux Etats-Unis, ayant une composition ionique différente caractérisée par une absence de cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+}). (Litchfield et Gillevet, 2002; Oren, 2002a).

D'autres types de lacs hypersalins sont présents dans des sites exceptionnels au fond de certaines mers comme la Mer Noire, la Mer Rouge, la Méditerranée ou le golfe du Mexique.

Les compositions en sels de certains de ces lacs peuvent être exceptionnelles, comme celles de Discovery ou de Kryos au fond de la Méditerranée (sud de la Grèce) où les concentrations en magnésium atteignent 4 M (Roussel et *al.*, 2008).

Tableau 1. Composition ionique d'environnements thalassohalins et athalassohalins.

Ions	Environnements					
	Mer Morte ^a	Mer ^a	Grand lac salé ^a (USA)	Lac Natrun ^b (Egypte)	Lac Magadi ^b (Kenya)	Lac salé El Goléa ^c (Algérie)
Na ⁺	40,10	10,60	105	142	46	107
K ⁺	7,70	0,38	6,70	2,30	0,06	nd
Mg ²⁺	44	1,27	11	<1	<1	0,30
Ca ²⁺	17,20	0,40	0,30	<1	<1	0,40
Cl ⁻	225	18,90	181	155	14	198
Br ⁻	5,30	0,065	0,20	nd	nd	nd
SO ₄ ²⁻	0,50	2,65	27	22,60	nd	nd
HCO ₃ ⁻ ou CO ₃ ²⁻	0,20	0,14	0,70	67,00	34,90	nd
pH	6,10	8,10	7,70	>11,50	>11,50	9,00

Les concentrations des ions sont en g/l; nd, non déterminé. a, Gerday et Glansdorff (2007); b, Madigan et Martinko (2006); c, Boutaiba *et al.* (2011).

2.2- Sols salés

La salinité des sols correspond à une teneur en sels soluble préjudiciable à la production végétale. C'est le processus pédologique par lequel le sol s'enrichit anormalement en sels solubles en acquiert le caractère salin (MICHEL, 2005).

Selon Kaurichev (1980), les sols salés ou sols halomorphes sont caractérisés par une concentration en sels solubles supérieure à 0,2 % (p/v) (Kharroub, 2007).

Les sols sont salés lorsqu'ils contiennent une certaine quantité d'éléments minéraux, dont notamment le sodium, sous forme dissoute, échangeable ou précipité (MUNNS *et al.*, 2006).

La salinité et l'aridité ont pour principales conséquences une augmentation de la pression osmotique, une toxicité pour les végétaux due à l'accumulation de certains ions, dont Na⁺ et une dégradation du sol. Elles conduisent toutes les deux à une déshydratation cellulaire. Toutefois, l'intensité du stress de la salinité varie d'un endroit à l'autre. En général, la salinité des terres arides a été classée en trois types : faible salinité (CE 2 – 4 dS/m), la salinité modérée (CE = 4 – 8 dS/m) et une salinité élevée (CE > 8 dS / m) (Rogers *et al.*, 2005).

En Algérie, il n'y a aucune étude cartographique fiable et précise permettant de délimiter les zones touchées par la salinité ni une quantification de la teneur des sels des sols. Néanmoins il existe quelques données fragmentaires qui donnent une idée générale sur le phénomène de salinité des terres. Ainsi d'après Szablocs (1989) 3,2 millions d'hectares subissent à des degrés de sévérité variables, le phénomène de salinisation dont une bonne partie se trouve localisée dans les régions steppiques où ce processus est plus marqué du fait des températures élevées durant presque toute l'année, du manque d'exutoire et de l'absence de drainage efficient. ce phénomène de salinisation prend de l'importance d'année en année et Algérie comme partout dans l'Afrique du nord réunit des conditions favorables à ce phénomène. Comme le climat aride et agressif. Une géologie riche en sels solubles et une géomorphologie modelée (GASMI, 1989).

Ce phénomène est observé dans les plaines et vallées de l'Ouest du pays (Mina, Cheliff, Habra Sig, Maghnia) dans les hautes plaines de l'Est (Constantine, Sétif, Bordj Bou Arreridj, Oum El Bouagui), aux abords des Chotts et de Sebkhass (Chott Ech Chergui, Chott Gharbi, Chott Hodna, Chott Melghir, Sebkhass d'Oran, de Benziane, Zemmoul, Zazhrez Gharbi et Chergui, etc.) et dans le grand Sud (Oasis, le long des oueds, etc.) (INSID, 2008).

2.3- Classification de sol salé

Selon Duchauffour (1983) il existe deux sous classes des sols halomorphes :

2.3.1- Sols à complexe sodique ou sols alcalins

Ces sols caractérisés par une saturation marquée en Na^+ et une accumulation des seules en profondeur. La conductivité électrique (C.E) ne dépasse pas 4ds/m à 25°C, et le PH est supérieur à 8,5.

2.3.2- Sols salins (solontchaks)

Ces sols sont soumis à l'influence d'une nappe peu profonde riche en sels sodiques neutres (NaCl , Na_2SO_4), ce supérieure à 8ds/m, $\text{pH} \leq 8.5$, (Duchauffour, 1983).

2.4- L'interaction microbe-plante

Les microorganismes ne sont pas isolés dans le sol et sont structurés en communautés complexes au sein desquelles diverses interactions microbiennes existent (Whipps, 2001). Les microorganismes du sol sont essentiels à la nutrition et la santé des plantes (Bever *et al.*, 2012 ; Whipps, 2004).

Les interactions entre les plantes et les microbes font partie intégrante de notre écosystème terrestre. Il existe plusieurs types d'interactions plantes-microbes.

Les plus courantes sont le commensalisme et le mutualisme où les deux bénéficient de leur relation (Campbell, 1995).

Il est intéressant de noter qu'il existe aussi des interactions entre les microorganismes symbiotiques et non symbiotiques. En effet, dans certains cas les microorganismes non symbiotiques vont faciliter l'implantation des microorganismes symbiotiques au niveau de la plante hôte. L'étude de Pivato *et al.* (2009)

2.4.1- La symbiose

De nombreux microorganismes vivent en relation écologique particulière: une partie importante de leur environnement est un membre d'une autre espèce. Tout organisme passant toute une partie de sa vie associé à un autre organisme d'une espèce différente est appelé un symbiote et la relation est désignée comme une symbiose (Prescott *et al.*, 2007).

2.4.2- Les champignons micorhizienne

Les champignons mycorhiziens sont des microorganismes ubiquistes du sol qui ont la capacité de former une association symbiotique avec les racines de la plupart des plantes. Ce type d'association est une des plus répandues dans l'environnement (Linderman, 1988 ; Peterson *et al.*, 2004 ; Procel *et al.*, 2011). Cette association symbiotique est de type mutualiste, et est à la base d'échange bidirectionnel de nutriments. (Smith & Read, 2008). Les champignons mycorhiziens sont hétérotrophes pour le carbone, ils ont donc besoin des ressources carbonées qui sont produites par l'activité photosynthétique de la plante. En échange, le champignon prélève et transporte des nutriments minéraux et de l'eau à la plante (Honrubia, 2009). Biologiquement et écologiquement, les champignons mycorhiziens sont considérés comme essentiels. Ils améliorent la croissance des plantes et augmentent

leurs résistances aux stress biotiques et abiotiques. Par ailleurs, ils améliorent la qualité et la structure des sols (Bonfante, 2001, Smith & Read, 2008).

2.4.3- La rhizosphère, un environnement particulier propice à la rencontre du végétal et de la microflore du sol

La rhizosphère est un terme qui est apparu pour la première fois au début du xxe siècle et qui caractérise la zone du sol entourant la racine. On distingue en général le rhizoplan qui est l'interface racine/sol et le sol rhizosphérique qui est situé au voisinage immédiat de la racine et soumis à son influence. La rhizosphère est donc un environnement particulier où les flux de matière et d'énergie entre le sol et la plante sont particulièrement intenses. La plante y mobilise l'eau et les éléments minéraux nécessaires à son développement et à sa croissance, induisant ainsi des modifications importantes du potentiel de l'eau et des concentrations ioniques du sol rhizosphérique (Hinsinger, 1998) Enfin et surtout, la racine libère dans la rhizosphère des quantités considérables de composés carbonés qui vont enrichir la fraction organique du sol (Lambers *et al.*, 1996) De nombreux micro-organismes du sol sont des hétérotrophes pour le carbone et l'azote et toute une fraction de la microflore est stimulée au voisinage des racines des plantes, du fait de ce flux considérable de composés carbonés exsudés par la racine. Cet « effet rhizosphère » est désormais reconnu comme un processus majeur pour la vie microbienne du sol. L'enrichissement de la rhizosphère en micro-organismes est à la fois le résultat de leur multiplication et de leur mobilité propre qui leur permet de se déplacer et de se concentrer dans les zones riches en nutriments. Les modifications observées au niveau des populations de micro-organismes sont non pas seulement quantitatives mais également qualitatives car la plante exerce une sélectivité qui tend généralement à réduire la diversité microbienne et à favoriser des espèces ou des souches. Cette sélectivité est particulièrement poussée dans le cas de la symbiose fixatrice d'azote entre les légumineuses et les rhizobium où chaque légumineuse ne peut s'associer qu'avec un nombre réduit de souches bactériennes. La spécificité de cette reconnaissance est fondée sur l'échange de signaux moléculaires entre la plante et la bactérie. Des flavonoïdes particuliers excrétés par la racine sont reconnus par la bactérie qui, en réaction, synthétise des molécules complexes qui vont initier des

réactions de la plante conduisant à la morphogenèse des nodosités, siège de la réduction de l'azote atmosphérique en ammonium (Bertrand *et al.*, 2000)

2.5- Antagonisme dans le sol

En écologie, le terme d'antagonisme désigne une inhibition ou une action défavorable d'un organisme vis-à-vis d'un autre à l'intérieur d'une population microbienne mixte. (Duchaufour, 2001).

L'antagonisme repose essentiellement sur l'émission d'antibiotiques solubles ou volatils, facile à mettre en évidence chez un grand nombre de bactéries et de champignons du sol (Romero *et al.*, 2007).

Les rapports entre les microorganismes telluriques ne se traduisent pas seulement par des interactions de nature synergique ; ils peuvent au contraire aboutir à l'apparition de processus antagoniste (Youcef, 2014).

2.6- Microorganismes halotolérants et halophiles

Les halophiles sont un groupe de microorganismes qui vivent dans les environnements hypersalins et exigent dans beaucoup de cas la salinité pour survivre. Ils incluent une grande diversité d'organismes, comme les bactéries aérobies modérément halophiles, les cyanobactéries, les bactéries sulfo-oxydantes, les bactéries hétérotrophes, les bactéries anaérobies, les archaea, les protozoaires, les mycètes, les algues et les eucaryotes multicellulaires. Les microorganismes qui peuvent se développer en absence aussi bien qu'en présence du sel sont qualifiés d'halotolérants et ceux qui sont capables de se développer approximativement au-dessus de 15% (p/v) (2.5M) de NaCl sont considérés comme extrêmement halotolérants (DasSarma, 2001).

Les halophiles appartiennent aux trois domaines des microorganismes, ils sont classés en plusieurs catégories selon leur comportement vis-à-vis du NaCl (Das Sarma et Arora, 2001) :

- **Non halophiles** : ne tolérant pas plus de 0,2 M de NaCl.
- **Halotolérants** : tolèrent de 0,2 à 0,85 M de NaCl (2 – 5 %).
- **Halophiles** : supportent des concentrations en NaCl allant de 0,85 jusqu'à 3,4

2.6.1.1- Eucaryotes halophiles

Dans le domaine des Eucarya, les halophiles sont plus rares. Le principal représentant des halophiles est l'algue verte *Dunaliella* qui comprend des espèces halophiles modérées (*Dunaliella viridis*, *Dunaliella parva* ...) et une espèce halophile extrême (*Dunaliella salina*). Cette algue produit le β -carotène responsable de la couleur orange des saumures et dont ses propriétés sont exploitées en biotechnologie (Oren, 2002b).

Les moisissures, longtemps négligées dans la recherche des halophiles, contiennent un certain nombre de représentants halophiles faibles et modérés tels que *Cladosporium*, *Aspergillus* et *Penicillium* spp. (Gunde-Cimerman *et al.*, 2000; 2005; Kis-Papo *et al.*, 2003).

On peut aussi citer le crustacé *Artemia*. Enfin, parmi les eucaryotes, des levures osmotolérantes (*Rhodotorula mucilaginosa* et *Pichia guilliermondii*), isolées de bassins d'évaporation croissent à 15 % de sel (Buchalo *et al.*, 1998).

2.6.1.2- Archaea halophiles

Les halophiles du domaine *Archaea* appartiennent à trois familles: *Halobacteriaceae*, *Methanospirillaceae* et *Methanosarcinaceae*. Les deux dernières familles contiennent également des membres non halophiles (Yachai, 2009).

Au sein des *Archaea*, la famille des *Halobacteriaceae* comprend les halophiles extrêmes aérobies. On les trouve dans la Mer Morte, les marais salants et les lacs alcalins hypersalins. Aux fortes salinités, les halobactéries dominantes colorent les lacs hypersalés en rouge. Cette couleur est due à un pigment de type caroténoïde (β -bactériorubérine C50), localisé au niveau de la membrane cellulaire. Ce pigment protège la cellule de la photooxydation (Wu *et al.*, 1983 ; Litchfield, 1998).

Une caractéristique physiologique intéressante est la présence, chez certaines espèces d'halobactéries, d'un photopigment membranaire (la bactériorubérine) qui permet la production d'ATP, quand la teneur en oxygène dans le milieu extérieur est trop faible. Ce composé formé d'une protéine (bactériorhodopsine) associée à un photopigment semblable à un caroténoïde (rétinal) est responsable de la couleur rouge des saumures (Oren, 2002a).

Egalement, la branche méthanogène des Euryarchaeota contient des halophiles dont

l'activité méthanogène est possible à des seuils proches de la saturation en NaCl : *Methanohalophilus*, *Methanohalobium* et *Methanospirillum* (Kamekura, 1998 ; DasSarma, 2001).

2.6.1.3- Bactéries halophiles

Le domaine des Bacteria regroupe la plus grande diversité des halophiles, la plupart étant halophiles modérées plutôt qu'extrêmes. Elles sont ubiquistes et présentes dans un grand nombre de groupes phylogénétiques. Les bactéries les plus isolées et étudiées sont les bactéries fermentatives strictes. Elles appartiennent à deux familles *Halobacteroidaceae* et *Haloanaerobiaceae* (Oren et al., 1984 ; Rainey et al., 1995).

Les microorganismes aérobies, hétérotrophes, halophiles et halotolérants du domaine *Bacteria* forment un groupe phylogénétique très hétérogène. Ils sont inclus dans 5 phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes* et *Bacteroidetes*(Ayad,2011).

Enfin, des bactéries photosynthétiques halophiles (cyanobactéries et bactéries phototrophes anoxygéniques) ont été quelquefois isolées de la surface des sédiments de milieux hypersalés où elles forment un tapis microbien. Les cyanobactéries unicellulaires forment une couche brune à la surface des sédiments (DasSarma, 2001).

2.6.2- Diversité métabolique des halophiles

La diversité phylogénétique dans les environnements hypersalins s'accompagne d'une diversité métabolique. De nombreux processus métaboliques ayant lieu dans les niches écologiques à faible teneur en sel ne se produisent pas au-dessus de 100 à 150 g/l. Des exemples à cela sont donnés par la nitrification autotrophe, la méthanogénèse et l'oxydation aérobie du méthane (Oren, 2011).

La plupart des microorganismes halophiles et halotolérants décrits sont des hétérotrophes aérobies, trouvés dans les trois domaines de la vie. Dans les environnements avec des concentrations en sel jusqu'à 200-250 g/l, les représentants de bactéries sont responsables de la majeure partie de l'activité hétérotrophe. Aux fortes salinités, les groupes comme les *Halomonadaceae* ne fonctionnent plus et la dégradation aérobie des composés organiques est assurée par deux groupes de

procaryotes: *Halobacteriaceae* (*Archaea*) et *Salinibacter* (*Bacteria*) (Oren, 2006). D'autres modes métaboliques existent aussi tels que la respiration anaérobie dont les accepteurs finaux d'électrons utilisés incluent non seulement le nitrate et le sulfate, mais aussi des composés non communs comme l'arséniate et le séléniate. Ce mode est utilisé par plusieurs membres modérément halophiles de la famille des *Halomonadaceae* (Ventosa *et al.*, 1998). Certaines *Archaea* halophiles (*Haloarcula marismortui*, *Haloarcula vallismortis*, *Haloferax mediterranei*) peuvent croître également de façon anaérobie sur le nitrate s'il est présent, en formant le nitrogène gazeux et/ou le protoxyde d'azote (Mancinelli et Hochstein, 1986).

Des halophiles fermentatifs sont inclus dans des groupes disparates. Les *Archaea* de la famille *Halobacteriaceae* sont fondamentalement des aérobies en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons. Cependant, quelques espèces peuvent se développer en anaérobiose par la dénitrification ou en utilisant l'énergie lumineuse absorbée par la bactériorhodopsine. Les espèces du genre *Halobacterium* peuvent se développer dans des conditions anaérobies à l'obscurité tout en puisant leur énergie par fermentation de l'arginine avec la production de l'ornithine, de l'ammoniaque et du dioxyde de carbone (Hartmann *et al.*, 1980). Un autre représentant des *Halobacteriaceae* qui se développe probablement par la fermentation est *Halorhabdus tiamatea*, isolé d'un bassin anoxique hypersalin profond de la Mer Rouge. Il se développe seulement sur des substrats complexes mais aucun mode de fermentation n'a été constaté (Antunes *et al.*, 2008).

La fermentation est utilisée par des halophiles fermentatifs classés principalement dans les deux familles, *Halanaerobiaceae* et *Halobacteroidaceae* (Rainey *et al.*, 1995), en plus de quelques procaryotes fermentatifs du phylum *Firmicutes* (*Clostridium halophilum*) (Antunes *et al.*, 2009).

2.7- Généralités sur les moisissures

Les moisissures ou micromycètes sont des organismes filamenteux eucaryotes ; l'hyphe en est l'élément structural. La paroi des hyphes contient souvent de la chitine et la croissance apicale du filament est suivie d'une ramification qui conduit à la formation d'un mycélium ou thalle. (Larpen, 1997).

Les mycètes sont principalement des organismes terrestres, bien que certains soient marins ou d'eau douce (Prescott, 2010).

Le mycélium est dit « septé » lorsque des cloisons transversales s'y forment et donne une apparence subdivisée en éléments uni- ou plurinucléés ; les moisissures sont ainsi qualifiées de septomycètes. Les siphomycètes sont ceux dépourvus de cloisons et présentent un appareil végétatif formé d'une série de boyaux (Lanier, 1978).

Les champignons en générale, possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative) et la reproduction sexuée (parfaite) (Senal *et al.*, 1993).

Le mode de vie des moisissures est généralement saprophytique, celles-ci se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition (Bourgeois, 1996).

2.7.1- Position systématique

Selon Mc Neill *et al.* (2006) les moisissures sont classées en 3 grands Phylum :

- *Zygomycotina*.
- *Ascomycotyna*.
- *Basidiomycotyna*.

Leurs principales caractéristiques sont regroupées dans le (tableau 2) (Boiron, 1996 ; Botton, 1985).

Phylum	<i>Zygomycotina</i>	<i>Ascomycotyna</i>	<i>Basidiomycotyna</i>
Vitesse de croissance	Rapide	moyenne	Lente
Type de thalle	Septé	cloisonné	Cloisonné
Spores sexuées	Spongiospores	Ascospores	Basidiospores

Tableau 2. Principales caractéristiques de classification des moisissures.

2.7.2- Les moisissures halotolérants

Les moisissures isolées des milieux naturels où la salinité excède les 10 % et qui peuvent croître *in vitro* à 17 % de NaCl, sont considérées halophiles (Gunde-Cimerman *et al.*, 2005).

Malgré la concentration élevée du sel dans des environnements hypersalés, les champignons font partie des microorganismes qui ont pu résister et se développer (Gunde-Cimerman *et al.*, 2004). Cantrell *et al* (2006).

La flore fongique des environnements hypersalins naturels comprend principalement les ascomycètes et les basidiomycètes (Gunde-Cimerman *et al.*, 2009).

- **Les ascomycètes** dont les ordres les plus importants sont
 - Capnodiales.
 - Dothideales.
 - Eurothiales.
- **Les basidiomycètes** avec leurs 3 principaux ordres
 - Trichosporales.
 - Sporidiales.
 - Wallemiales.

Parmi les espèces halotolérantes, seulement quelques espèces appartenant aux genres *Penicillium* et *Aspergillus* sont connus pour leur capacité de produire des métabolites (Frisvad, 2005)

2.7.3- Applications biotechnologique des moisissures halophiles

L'utilisation des halophiles en biotechnologie peut être divisée en trois catégories (Oren, 2002).

- **1ère catégorie** : l'halo-tolérance de plusieurs enzymes extraites de microorganismes

halophiles peut être exploitée chaque fois que les transformations enzymatiques requièrent une faible activité d'eau. C'est le cas d'un milieu à concentration élevée en sel.

- **2ème catégorie** : certains stabilisateurs osmotiques organiques présentent des applications intéressantes lors de l'utilisation de certaines enzymes thermolabiles.
- **3ème catégorie** : certains microorganismes halophiles peuvent produire des composés de valeur le plus souvent sans aucune relation directe avec leurs propriétés

halophiles. Ces composés sont également produits par des micro-organismes non halophiles mais les halophiles peuvent présenter des avantages distinctifs pour le développement de processus biotechnologiques de production.

2.8- *Aspergillus*

2.8.1- Généralités

Ce genre appartient à la classe des Ascomycètes. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés qui se terminent en vésicule (Figure 4) (Raper *et* Fennell, 1965).

Les *Aspergillus* sont des champignons cosmopolites, très répandus dans le milieu extérieur. Ce sont des champignons ubiquistes: on les trouve en milieu rural (silos à grains, foin, paille tassée et humide, céréales ou fruits moisissés, matières organiques en décomposition), ainsi qu'en milieu urbain (Biofarma, 2002).

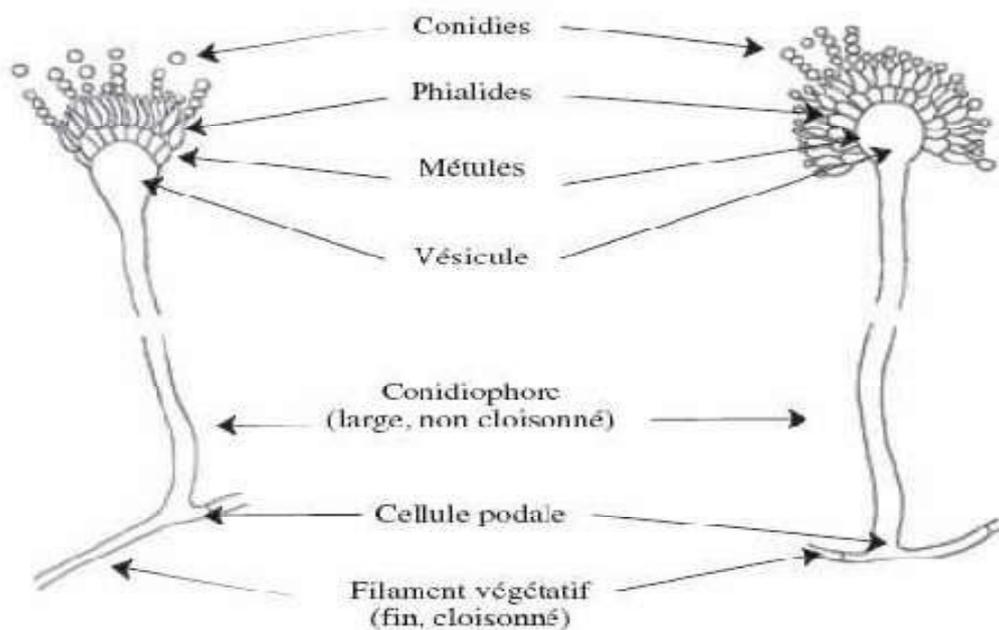


Figure 4 Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Raper *et* Fennell, 1965).

Cependant, d'autres souches représentent un intérêt industriel pour la préparation d'aliments fermentés et pour la production d'enzymes et d'acides organiques. Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Roquebert, 2002).

Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Pfohl-Leszkowicz, 1999).

2.8.2- Caractères culturels

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (Gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques, pour inhiber toute croissance bactérienne.

Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens, blancs ; après 96 heures d'incubation, les colonies vont prendre leur teinte caractéristique de chaque espèce, brune, verte, jaune ou noire (Tabuc, 2007).

2.8.3- Caractères morphologiques

2.8.3.1- Caractères macroscopiques

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques additionnés d'antibiotiques. Ils sont cependant, pour la plupart, inhibés par le cycloheximide. Après 24 à 48 heures de culture, on observe des colonies plates, formées de courts filaments aériens blancs. C'est en effet avec la maturation des structures conidiogènes (48 à 96 h selon les espèces) que ces colonies vont prendre teinte caractéristique : brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. (Botton *et al.*, 1990).

2.8.3.2- Aspect microscopique

Les *Aspergillus* appartiennent à la classe des Ascomycètes, et sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous jacentes appelées métules (structure bisériée). Les phialides et les métules sont également dénommées stérigmates. Les conidies produites en grand nombre par les phialides, donnent, à la tête conidienne, un aspect radié si les stérigmates couvrent l'ensemble de la vésicule, ou une apparence en colonne si seule la partie supérieure de celle-ci est fertile

(Figure 5) (Raper *et* Fennell, 1965).

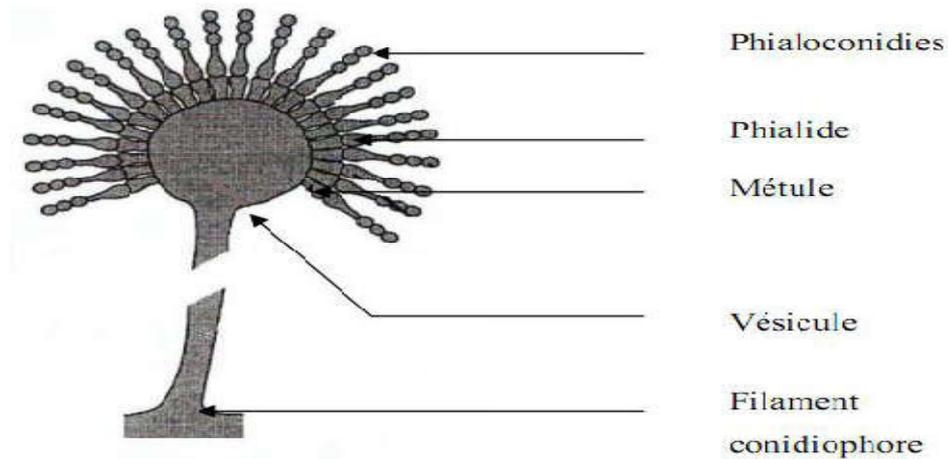


Figure 5 Schéma d'une tête aspergillaire (modifié d'après Chermette et Bussi ras, 1993)

2.8.4- Taxonomie

Les espèces du genre *Aspergillus* appartiennent au règne des *Fungi*, à l'embranchement des *Ascomycota* qui regroupe des champignons à mycelium cloisonné (champignons septomycetes) présentant une reproduction sexuée avec formation d'asques contenant des ascospores. Les *Aspergillus* sont inclus dans le sous-embranchement des *Pezizomycotina*, la classe des *Eurotiomycetes*, la sous-classe des *Eurotiomycetidae*, et l'ordre des *Eurotiales* qui est caractérisé par des asques contenus dans des ascocarpes de type cleistothecae ou plus rarement gymnothecae, et par une multiplication asexuée par phialides produisant des phialoconidies (Hibbett *et al.* 2007 ; Bennett, 2010).

En effet, selon Botton *et al.* (1990) et Guiraud (1998), la classification des *Aspergillus* est comme suit :

Règne : **Fungi**
 Division : **Eumycota**
 Classe : **Deuteromycetes**
 Ordre : **Moniliales**
 Famille : **Moniliaceae**
 Genre : ***Aspergillus***

2.8.5- Production des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres (Gaitatzis *et al.*, 2002).

Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du micro-organisme, qu'ils sont de structure et d'activité biologique des plus diverses, qu'ils possèdent des voies de synthèse qui leurs sont propres à partir de produits du métabolisme primaire et qu'ils sont généralement produits en faible quantité (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992 ; Tortora *et al.*, 2003).

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Turner, (1971) a enregistré presque 1000 produits fongiques en 1971.

Parmi les métabolites secondaires nous pouvons citer :

les antibiotiques sont des substances chimiques et/ou organiques produites par un petit nombre de microorganismes et exerçant une action toxiques envers d'autres microorganismes dont principalement les bactéries. Parmi un total de quelques 10700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent des champignons. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des Monilliales constituent les réservoirs les plus importants (Botton et al, 1990) par exemple *Aspergillus flavus* fabrique comme antibiotique l'acide aspergillique, *Aspergillus fumigatus* fabrique la fumagilline.

La gliotoxine, par exemple, peut aussi bien être produite par *Aspergillus fumigatus* que par *Trichoderma viridae*. De même, une moisissure donnée peut produire plusieurs toxines ; *Aspergillus fumigatus*, agent étiologique de certaines atteintes pulmonaires, fabrique plus de huit toxines différentes (Maheux, 1998) : fumigaclavine, fumigatoxine, fumitremorgéne, gliotoxine, acide helveolique, etc. *A.niger* fabrique l'acide oxalique, *A.versicolor* fabrique l'aspercolorine, la sterigmatocystine, la versicolorine. (Halewyn et al, 2001).

2.9- *Penicillium*

2.9.1- Généralité

Il y a plus de 200 espèces reconnues de *Penicillium*. Plusieurs espèces s'adaptent facilement aux conditions de croissance présentes à l'intérieur et se développent bien sur des matériaux de construction humides. Plus de vingt espèces sont régulièrement trouvées dans l'environnement intérieur (Samson et al., 2004 ; Texas Tech University & Health Sciences Center, 2006 ; Bpc insertion, 2008). Par conséquent, il serait impossible de les énumérer toutes dans le contexte de ce compendium. La majorité de cette rubrique sera donc consacrée au genre *Penicillium* dans son ensemble, et certaines espèces seront mentionnées au besoin.

Les *Penicillium* sont très généralement retrouvés dans le sol, sur les végétaux en décomposition et le compost de même que sur le bois, les produits alimentaires secs, les épices, les céréales, les fruits frais et les légumes ((Al-Doory & domson, 1984 ; Foundation for Allergy Research in Europe, 1984) ; on les trouve également poussant sur des matériaux de construction dans des environnements endommagés par l'eau (Story et al., 2004). ainsi que dans l'air intérieur et la poussière domestique.

2.9.2- Caractères cultureux

Les *Penicillium* sont des mycètes mésophiles pouvant croître entre 5 et 37 °C (température optimale de 20-30 °C) à un pH de 3-4,5. La croissance est optimale *in vitro* à 23 °C, à un pH de 3-4,5.

Activité de l'eau : $A_w = 0,78-0,88$ (Al-doory & Domson, 1984).

2.9.3- Caractères morphologiques

2.9.3.1- Caractères macroscopiques

La taxonomie du genre *Penicillium* est particulièrement complexe et difficile à maîtriser. L'identification précise basée seulement sur les critères macromorphologiques et micromorphologiques demeure difficile, bien qu'elle soit possible. Cependant, quelques traits communs sont partagés par les espèces les plus répandues en milieu intérieur (Samson et al., 2004). Les colonies de ces espèces sont habituellement à croissance rapide; elles peuvent être de différentes teintes de vert ou

occasionnellement de teintes de blanc ou d'autres couleurs. Elles se composent la plupart du temps d'une masse feutrée de conidiophores. La surface de la colonie présente souvent quelques exsudats et le revers peut être de blanc à jaunâtre.

2.9.3.2- Aspect microscopique

Les hyphes hyalins septés (1,5-5 µm de diamètre) portent des conidiophores ramifiés ou non ramifiés. La première cellule du conidiophore est appelée *cellule pied*; les branches secondaires sont connues sous le nom de *métules*. Les métules sont plus ou moins cylindriques, à parois lisses, portant de trois à six phialides en forme de bouteille (Samson et al., 1984 ; Larone , 1987 ; Patterson et al., 2009). Les phialides produisent de longues chaînes sèches de petites spores rondes à ovales (2,5-5 µm). Les souches peuvent être classées en quatre catégories selon le type de ramification des conidiophores.

2.9.4- Taxonomie

Tableau 3 La classification des *Penicillium sp*

Règne	Fungi	Famille	Trichomaceae
Phylum	Ascomycota	Genre	<i>Penicillium</i>
Classe	Euascomycetes	Espèce	Ssp.
Ordre	Eurotiales		

Plusieurs *Penicillium* sont des formes imparfaites (anamorphes) d'hyphomycètes hyalins : quelques espèces de *Penicillium* possèdent des formes parfaites (télémorphes) incluses dans les genres *Eupenicillium*, *Talaromyces*, *Hamigera* et *Trichocomma* (Samson et Pitt, 1992).

2.9.5- Production des métabolites secondaires

Les espèces de *Penicillium* produisent divers hydrocarbures, des alcools, des cétones, des esters et des terpènes, aussi bien dans la nature que sur des matériaux de construction (Claeson et al., 2002 ; Claeson et al., 2007). Les métabolites les plus courants comprennent certains alcools tels que le 2-méthyl-1-propanol, le 3-méthyl-1-butanol et le 1-hexanol de même que le 2-heptanone, le 2-pentanone et le 2,5-diméthyl-furane (Sunesson et al.,1996). quelques *Penicillium* produisent du 2-méthyl-isobornéol qui donne une forte odeur de moisi. La production de composés

organiques volatils microbiens (MCOV) dépend à la fois de l'espèce en cause et du milieu où pousse la moisissure.

Un certain nombre de composés organiques, y compris les composés organiques volatils (COV), ont été identifiés dans l'air intérieur de bâtiments humides. Ces métabolites contribueraient à différents problèmes de santé associés à la qualité de l'air intérieur. La plupart des métabolites identifiés sont toutefois non réactifs et sont trouvés en faibles concentrations dans l'air intérieur (Claeson *et al.*, 2002).

Plusieurs espèces de *Penicillium* sont des contaminants communs sur divers matériaux organiques et sont des productrices potentielles reconnues de mycotoxines. Parmi les mycotoxines les mieux étudiées produites par les *Penicillium*, il faut mentionner les composés suivants : l'acide kojique, l'acide mycophénolique, l'acide pénicillique, l'aflatoxine, la citréoviridine, la citrinine, la citromycétine, l'érythroscyrine, la fréquentine, la gibbérelline, la griséofulvine, l'hadacidine, la luteoscyrine, des mycotoxines trémorgènes (le pénitrem, le territrem, le verruculogène), les ochratoxines A et B, l'oxaline, la paruline, la patuline, les pénitrems A à F, la riboflavine, la roquefortine, la rubratoxine, la rugulosine, la rugulovasine, les thomitrems A et E, la verrucosidine, la viomelleine, la viridicatine, la xanthocilline et la xanthomegnine (Subramanian, 1983 ; Rundberget *et al.*, 2004 ; Centre de recherche sur la conservation des documents graphiques, 2007 ; Krska *et al.*, 2008).

2.10- *Paecilomyces*

2.10.1- Généralité

Les organismes du genre *Paecilomyces* sont des moisissures saprophytes apparentées à *Penicillium* et *Aspergillus*, omniprésentes dans le sol et les matières en décomposition. Les paecilomyces ont des hyphes ramifiés cloisonnés portant de longues chaînes de conidies provenant des extrémités des conidiaphores. (Fleischman et McCracken, 1977).

2.10.2- Caractères cultureux

Ces champignons ont une croissance rapide sur milieu de Sabouraud sans cycloheximide qui inhibe la croissance de la plupart des souches .ils se developpent bien à 25°C, mais peuvent pousser jusqu'à 50°C.les colonies rapidement poudreuses, sont de couleur brun pale à brun rouille(*Penicilium variotii*), parfois lilas(*P.lilacinus*).le verso est incolore(Chabasse, 2002).

2.10.2.1- Morphologie microscopique

- Multiplication végétative

Les hyphes septés, hyalins, portent des conidiophores qui se ramifient en verticilles. Les phialides à extrémité allongée et éfilée sont regroupées en pinceau à l'extrémité du conidiophore. elle sont divergentes les unes par rapport aux autres. certaines restent solitaires, disposées le long des hyphes.

Les conidies (3.2 à 5 um de long sur 2 à 4 um de large) sont hyalines à jaunes, cylindriques ou fusiforme, disposées en longues chaînes à l'extrémité des phialides.

Des chlamydozoospores sont parfois présentes.

- Pas de reproduction sexuée connue (Chabasse, 2002)

2.10.3- Taxonomie

Le genre *Paecilomyces* contient plusieurs espèces. Les plus communs sont *Paecilomyces lilacinus* et *Paecilomyces variotii*. La couleur de la colonie et certaines caractéristiques microscopiques aident à différencier les espèces de *Paecilomyces* les unes des autres (De Hoog *et al.*, 2000). Une autre caractéristique qui aide à l'identification des espèces est la thermophilie. *Paecilomyces crustaceus* et *Paecilomyces variotii* sont thermophiles et peuvent bien pousser à des températures aussi élevées que 50 ° et éventuellement 60 ° C (Sutton *et al.*, 1998, De Hoog *et al.*, 2000).

Kingdom:Fungi

Phylum:Ascomycota

Class:Euscomycetes

Order:Eurotiales

Family: Trichocomaceae

Genus: *Paecilomyces* (site 3).

2.10.5- Métabolites secondaires

Le genre *Paecilomyces* comprend de nombreuses espèces capables de produire des métabolites secondaires qui appartiennent à différents groupes chimiques ayant une large activité biologique comme la paecilosétine (Lang *et al.*, 2005), le paecilaminol (Ui *et al.*, 2006), le paecilodepsipeptide A (Isaka *et al.*, 2007), paecilin A et B (Guo *et al.*, 2007).

2.11- *Geotrichum*

2.11.1- Habitat

Assez répandu : sol, eau, air, maïs et autres céréales, riz, papier pourrissant, textiles, raisin, citrus, bananes, tomates, concombres, fruits confits, jus de fruit, pain, lait et produits laitiers (affinage de certains fromages)(Site 1).

2.11.2- Caractères cultureux

2.11.2.1- Caractères macroscopiques

Les souches de *Geotrichum* produisent des colonies blanches, sèches, poudreuses à cotonneuses, à croissance rapide, ressemblant à du «verre dépoli». Lorsqu'elles sont dérangées à la surface, la colonie devient semblable à de la levure ou visqueuse. La température de croissance optimale est de 25 ° C. La plupart des souches ne poussent pas du tout ou croissent faiblement à 37 ° C (Site 1)

2.11.2.2- Caractères microscopiques

Des arthroconidies et des hyphes vrais grossiers sont observés. Les blastoconidies, les conidiophores et les pseudohyphae sont absents. Les arthroconidies (6-12 × 3-6 µm) sont unicellulaires, en chaîne, hyalines, et résultent de la fragmentation d'hyphes indifférenciés par fission à travers des cloisons doubles. Ils sont de forme rectangulaire ou arrondis aux extrémités ressemblant à la forme du canon. La formation consécutive d'arthroconidies et l'absence de cellules vides qui se

fragmentent pour libérer les arthroconidies («cellules disjonctrices») sont typiques (Site 1).

2.11.3- Taxonomie

Kingdom: **Fungi**

Phylum: **Ascomycota**

Subphylum: **Ascomycotina**

Order: **Saccharomycetales**

Family: **Endomycetaceae**

Genus: *Geotrichum (Endomyces)*

Température optimum de croissance : 25°C-27°C (isolé de plantes), 30-31°C (Site 2)

2.11.4- Métabolites secondaires

Deux composés antimicrobiens produits par *G. candidum* sont l'acide phényllactique (PLA) et l'acide indoleacétique (ILA). Il a été rapporté que le PLA et l'ILA inhibaient spécifiquement la croissance de *Listeria monocytogenes* dans le milieu complexe TSBYE en induisant des changements comportementaux et structuraux dans cet agent pathogène d'origine alimentaire (Dieuleveux et al., 1998, Dieuleveux et al., 1998). L'acide phénylpyruvique (PPA), un composé intermédiaire du métabolisme du PLA, était capable d'induire non seulement le PLA mais aussi la production d'alcool phényléthylque (PEA) lorsqu'il est utilisé séparément comme substrat initial. Sous les limites de pH, de température et de sel utilisées pour la fabrication du fromage, la phénylalanine s'est révélée être le substrat le plus efficace pour la production de métabolites antimicrobiens.

2.12- *Colletotrichum*

2.12.1- Caractères microscopique du genre

Des conidiophores courts, simples et incolores produisent des conidies abondantes. Longues soies noires ou peut ne pas être produit chez les conidiophores. Les conidies sont incolores lorsqu'elles sont vues seules, mais peuvent apparaître roses ou colorées en masse. Les spores sont courtes, ovoïdes à cylindriques et unicellulaires. Chez certaines espèces, les conidies sont légèrement incurvées et peuvent être confondues avec les spores de *Fusarium*. (Site 3)

2.12.2- Taxonomie

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Class: Sordariomycetes

Order: Incertae sedis

Family: Glomerellaceae

Genus: *Colletotrichum* (Site 3)

2.12.3- Métabolites secondaires

Le métabolite de *Colletotrichum gloeosporioides* était identifié comme des hydrocarbures volatils. Jusqu'à présent, des études ont rapporté un grand nombre de composés antimicrobiens isolés des endophytes, appartenant à plusieurs classes structurales telles que les alcaloïdes, les peptides, les stéroïdes, les terpénoïdes, les phénols, les quinine et les flavonoïdes (Yu *et al*, 2010).

2.13- *Humicola*

2.13.1- Taxonomie

Subdivision: Deuteromycotina

Class: Hyphomycetes

Order: Bactridiales

Family: Sepedoniaceae

Genus: *Humicola* (Smith ,2004).

2.13.2- Métabolites secondaires

La description des caractéristiques de *Humicola insolens* a été publiée pour la première fois par Cooney & Emerson (1986). La souche de production a été obtenue grâce à un processus de sélection conduisant à des isolats avec une production d'enzymes améliorée. L'enzyme mixte β -glucanase et xylanase produite par *Humicola insolens* est utilisée pour hydrolyser les β -glucanes, les pentosanes et

d'autres gommages. Cette souche de *Humicola insolens* est non pathogène et non toxique chez l'homme ou chez les autres animaux (Smith, 2004).

2.14- Microorganismes pathogènes

Les bactéries sont des organismes procaryotes unicellulaires (Roquebert, 2002), qui ne possèdent pas d'organite ni de noyau. La cellule bactérienne est entourée par une membrane plasmique et une enveloppe rigide, la paroi, qui lui donne sa forme. On distingue les bactéries à Gram positif et à Gram négatif sur une différence de composition pariétale. La paroi des bactéries Gram positif est riche en acide teichoïque et en acide diaminopimélique qui sont absents ou moins abondants chez les Gram négatif, lesquelles ont une paroi plus riche en lipides (Vidic, 2013).

2.14.1- *Pseudomonas aeruginosa*

2.14.1.1- Habitat

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, est une Bactérie ubiquitaire. Capable de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air, aliments), particulièrement en milieu humide. En milieu hospitalier *Pseudomonas aeruginosa* peut être rencontré dans l'environnement proche du malade. Peut faire partie de la flore transitoire de l'homme : flore digestive, cutanée, pharyngée ; il est montré que le portage augmente avec la durée d'hospitalisation (Grosjean et al, 2011).

2.14.1.2- Caractéristique microbiologique

2.14.1.2.1- Caractères morphologiques

Les principaux caractères sont mentionnés dans le tableau 3 :

Tableau 4 Principaux caractères morphologiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Grosjean et al, 2011).

Aspect gram	Capsule ou spore	Mobilité	Gram
Bacilles fins	Parfois capsulés, non sporulés	+ (plutôt en ligne droite)	-

2.14.1.2.2- Caractères Cultureux

Les principaux caractères sont mentionnés dans le tableau 4 :

Tableau 5 Principaux caractères Cultureux de *Pseudomonas aeruginosa* (Grosjean et al, 2011).

Type respiratoire	Géloses permettant la pousse	Aspect colonie
Aérobie	Gélose nutritives, BCP, Au sang. Gélose cétrimide. Pas d'exigence particulière.	Colonie plates, bord irregulier, aspect irisé métallique pigment vert brillant diffusible : pyoverdine (commun au groupe) et pyocyanine spécifique de cette espèce odeur de type seringa.

Certaines souches peuvent présenter des caractères différents :

- Colonies non pigmentées ou colorées en brun ou en rouge (par production de pyomélanine ou pyorubrine).
- Colonie d'aspect mucoïde (souche isolées dans certaines pathologie chroniques : mucoviscidose, dilatation des bronches).
- Colonie naines plus difficiles à cultiver (Grosjean et al, 2011).

2.14.1.2.3- Caractères biochimiques

Les principaux caractères sont mentionnés dans le tableau 5 :

Tableau 6 Principaux caractères biochimiques de *Pseudomonas aeruginosa* (Grosjean et al, 2011).

2.14.2- *Staphylococcus aureus*

2.14.2.1- Habitat

Staphylococcus aureus, est un bactérie ubiquitaire. Flore résidente de la peau de l'homme et des animaux. Transitoire dans les autres flores (Grosjean et al, 2011).

2.14.2.2- Caractères microbiologiques

2.14.2.2.1- Caractères morphologiques

Les principaux caractères sont mentionnés dans le tableau 5 :

Tableau 7 Principaux caractères morphologiques de *Staphylococcus aureus* (Grosjean et al, 2011).

Aspect Gram	Capsule ou spore	Mobilité	Gram
Coques en amas	-	-	+

2.14.2.2.2- Caractère culturaux

Les principaux caractères sont mentionnés dans le tableau 7 :

Tableau 8 Principaux caractères culturaux de *Staphylococcus aureus* (Grosjean et al., 2011).

Type respiratoire	Gélose permettant la pousse	Aspect colonie
Aéro-Anaérobie	Gélose nutritive, au sang, à l'acide nalidixique Gélose de chapman	Colonies souvent hémolytiques Pigment jaune orangé Mannitol +

Certaines souches isolées plus particulièrement dans des infections chroniques (pulmonaires au cours de la mucoviscidose, osseuses,...), ont des colonies plus petites «small colony variant» la croissance de ces bactéries est altérée, en raison d'une

déficience d'une voie de biosynthèse (chaîne respiratoire ou chaîne métabolique). La difficulté est de reconnaître ces colonies « naines », qui poussent plus lentement, qui ne sont pas hémolytiques, qui peuvent être exigeantes en CO₂ et mannitol négatives sur Chapman (Grosjean *et al*, 2011).

2.14.2.2.3- Caractères biochimiques

Les principales caractéristiques biochimiques qui différencient les espèces de *Staphylococcus aureus* sont mentionnées dans le tableau 8 :

Tableau 9 Principaux caractères biochimiques de *Staphylococcus aureus* (Grosjean *et al*, 2011).

OX	CAT	Fu- Ranes	Coag Libre	DNase	Coag liée	Poly- Myxine b	MAN	PYRA	VP
-	+	S	+	+	+	R	+	-	+

2.14.2.3- Pouvoir pathogène

- **Infection suppuratives** : peau, tissu mou, muscle, os, tractus respiratoire, valve cardiaque, tractus urinaire après manœuvre instrumentale, infection sur matériel étranger....
- **Toxi-infection** : dues à la synthèse de différentes toxines par certaines souches.
- TSST-1 (toxine du choc toxique staphylococcique)
- Exfoliatine responsable du syndrome de la peau ébouillantée
- Entérotoxines responsables de toxi-infections alimentaires ou d'entérolites après sélection d'une souche productrice d'entérotoxines par l'antibiothérapie (Grosjean *et al*, 2011).

2.14.2.4- Résistance aux antibiotiques

Le staphylocoque doré ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques. L'utilisation massive des pénicillines G et V a conduit dès 1941 à l'émergence de bactéries résistantes à ces molécules. *S. aureus* possède une très grande plasticité génétique. Sous la pression de sélection des antibiotiques, il a très rapidement acquis

des gènes portés par des plasmides codant pour des pénicillinases (Grundmann *et al.*, 2006).

Ces enzymes sont capables d'hydrolyser le cycle bêta-lactame des pénicillines G, V et A. Le traitement des infections causées par ces souches est simple. Il repose sur l'utilisation de pénicillines semi-synthétiques stables à l'action des pénicillinases type oxacilline ou alors d'amoxicilline additionnée d'un inhibiteur de bêta-lactamase type acide clavulanique. La détection de ce phénotype est aisée en laboratoire. Elle peut se faire soit à l'aide d'un test utilisant un réactif chromogène type Céfinase® (Biomérieux) ou indirectement par la détermination de la CMI à la pénicilline G (système automatisé, disque ou e-test). Actuellement, plus de 90% des souches isolées sont résistantes à la pénicilline G (Dumitrescu *et al.*, 2010)

2.14.3- *Bacillus subtilis*

2.14.3.1- Habitat

Le bacilli, classé dans le nouveau genre *bacillus* avec plus de 90 espèces. sont de bactérie ubiquitaires saprophytes.

Elle vivent naturellement dans les sols dans lesquels elle peuvent survivre très longtemps grâce à leurs spores résistants ; elles sont également présentes dans l'air et elles viennent parfois contaminer les cultures en boites de petri, en travaux pratiques de microbiologie, lorsque de consignes d'ensemencement ne sont pas parfaitement respectées (Delarras, 2007).

2.14.3.2- Caractères Microbiologique

2.14.3.2.1- Caractères morphologiques

Les *Bacilles* forment un genre de bactéries à Gram positif, appartenant à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*), qui sont des bâtonnets (souvent 0.5–1.5 x 2–6 µm de diamètre) sont habituellement mobiles (Paul singleton, 1999).

2.14.3.2.2- Caractères cultureux

Ces bactéries sont aérobies ou anaérobies facultatifs qui poussent sur les géloses ordinaires (Grosjean *et al.*, 2011). Selon les espèces, avec un métabolisme

respiratoire ou facultativement fermentatif. Ces bactéries sont capables de produire des endospores leur permettant de résister à des conditions environnementales défavorables. Celles-ci donneront naissance à de nouvelles bactéries en cas de conditions favorables. (Paul singleton, 1999).

2.14.3.2.3- Caractères biochimiques

Tableau 10 Caractères biochimiques de *Bacillus* (Denis *et al.*, 2011)

Chainettes	Mobilité	Culture	Anaérobiose	Réduction Des nitrates	Production D'indole
-	+	-	+	+	-

2.14.3.3- Pouvoir pathogène

Bacillus subtilis est germe saprophyte, rarement pathogène opportuniste pour l'homme. Il est sporulé et doté des spores extrêmement résistantes. Il est à l'origine de quelques cas de toxi-infections alimentaires lors de contaminations à très fortes doses de germe (>1 million de germes par gramme de produit alimentaire), à partir de viandes friodes, pâtes, farces... les signes cliniques sont dominés par la diarrhée et les vomissements qui peuvent apparaître très rapidement après ingestion (20 min à 6 h) mais sont rapidement résolutifs (moins de 8 h). plus rarement ont été signalées des infections graves (endocardite, septicémie, pneumonie) (Carip, 2008).

2.14.3.4- Résistance aux antibiotiques

Bacillus subtilis sont résistants au chloramphenicol, à la tetracycline, à la rifampicine et la streptomycine (David *et al.*, 2012).

2.14.4- *Escherichia coli*

2.14.4.1- Habitat

Escherichia coli est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique (Avril et *al.*, 2000). *E.coli* ou colibacille est habituellement une bactérie commensale qui peut devenir pathogène si les défenses de l'hôte se trouvent affaiblies ou si elle acquiert des facteurs de virulence particuliers (Nauciel, 2005).

2.14.4.2- Caractères microbiologiques

2.14.4.2.1- Caractères morphologiques

E. coli est un bacille, donc de forme cylindrique (bâtonnets) ou coccobacillaire, gram négatif uniformément coloré, non sporulé, de 2 µm à 3 µm de long sur 0.7 µm de large. Il présente soit seul ou groupé le plus souvent par deux (diplobacilles), très rarement ils sont rencontrés en amas (Garba, 2012). La plupart sont mobiles, à ciliature péritriche, ou dotées de pili où fimbriae et des adhèsines. d'autre sont immobile (Berche *et al.*, 1989) .

2.14.4.2.2- Caractères cultureux

E. coli est mésophile avec une température de croissance, comprise entre 15°C et 45°C avec un optimum à 37°C. Sa culture admet une grande tolérance de variation de pH et le pH optimum est de 7,5 (Anonyme, 2004). *E.coli* croit après 24 h a 37°C en donnant des colonies de 2 a 3 mm de diamètre (Berche *et al.*, 1989) . Se développent bien sur un bouillant ou sur une gélose (Ramoul, 2013).

2.14.4.2.3- Caractères biochimiques

Ces bactéries sont identifiées par les tests suivant : fermentation du mannitol et de Sorbitol, du lactose, présence de β-galactosidase, production d'indole. Les caractères négatifs sont :

l'absence d'uréase et désaminase, citrate de Simmons négatif, absence de production d'H₂S ou d'une désaminase du glucose (Berche *et al.*, 1989) .

2.14.4.3- Pouvoir pathogène

En outre, bien que la majorité des souches de *E. coli* soient commensales banales, certaines d'entre elles sont pathogènes et connues des médecins comme étant à l'origine de pathologies extra-intestinales (Pohl, 1993) ou intestinales (Levine, 1987).

Des nombreuses infections à *E.coli* peuvent se rencontrer , Certaines localisées aux voies digestives : on distingue 5 pathovars : *E. coli* entéro-pathogène (diarrhées infantiles), *E. coli* entérotoxigène (tourista), *E. coli* entéro-invasif (invasion des cellules intestinales), *E. coli* entéro-hémorragique (diarrhées sanglantes), *E. coli* entéro-adhérent (diarrhée du voyageur) qui provoquent des diarrhées aqueuses et parfois glaireuses ou hémorragiques avec fièvre et douleur abdominale ,et d'autre aux voies urinaires :Il s'agit de cystites traduisant par une dysurie, une pollakiurie et fièvre peu élevée (Berche *et al.*, 1989) .

2.14.4.4- Résistance aux antibiotiques

2.14.4.4.1- Résistance naturelle

Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible pour l'antibiotique, à sa faible affinité pour l'antibiotique ou encore à son absence (Lazoul, 2014).

Ces souches sensibles sont à toutes les bêta-lactamines, malgré la présence d'une céphalosporinase chromosomique d'espèce de classe C qui est exprimée à très bas niveau (présente mais non détectable) (Zahar et Moumile ,2007).

2.14.4.4.2- Résistance acquise

Sur le plan génétique, la résistance peut être acquise par deux voies totalement distinctes, soit des mutations affectant des gènes présents sur le chromosome, soit l'acquisition de gènes étrangers (Lozniewskai el Rabaud, 2010 ; Souna, 2011).

Cette souche est résistante à l'ensemble des pénicillines et céphalosporines en particulier aux C3G (CTX, CAZ) et aux monobactames (ATM) et à AMX mais les

carboxypénicillines (TIC) et les acyluréidopénicillines (PIP) restent actives (Zahar et Moumile ,2007).

Matériel et méthodes

3- Matériel et méthodes

Ce présent travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Microbiologie N° 11 de la faculté des sciences de la nature et de la vie, département Microbiologie Générale et Moléculaires, Université frères Mentouri Constantine 1, et ce porte sur l'étude de l'activité antibactérienne d'isolats fongiques isolées à partir de cinq sites différents de Sebkhia Ezzmoul d'Ain-mlila vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). Connus comme étant pathogènes, présentant un danger potentiel sur la santé humaine.

3.1- L'agent pathogène

L'agent pathogène utilisé dans ce travail est composé de quatre souches bactériennes: (*Escherichia coli* ATCC 25922(Gram-), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027(Gram -), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(Gram+) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633(Gram+)). Ces bactéries ont été fournies par le laboratoire de Mycologie, de Biotechnologies et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM), Université Frères Mentouri Constantine 1.

Les bactéries ont été réactivées sur Gélose Nutritive (Annexe 1) et incubées à 37°C pendant 24 h.

3.2- Isolement de l'agent antagoniste

3.2.1- Echantillonnage

Sebkhia Ezzemoul localisée dans la région d'Ain M' Lila (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, 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 6 et 7). Elle a une superficie de 4400 hectare et une profondeur de 0,6 mètre (Kharroub, 2007).

Cette sebkhia 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. Elle est entourée par de la végétation et 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 Ouled Zouai».

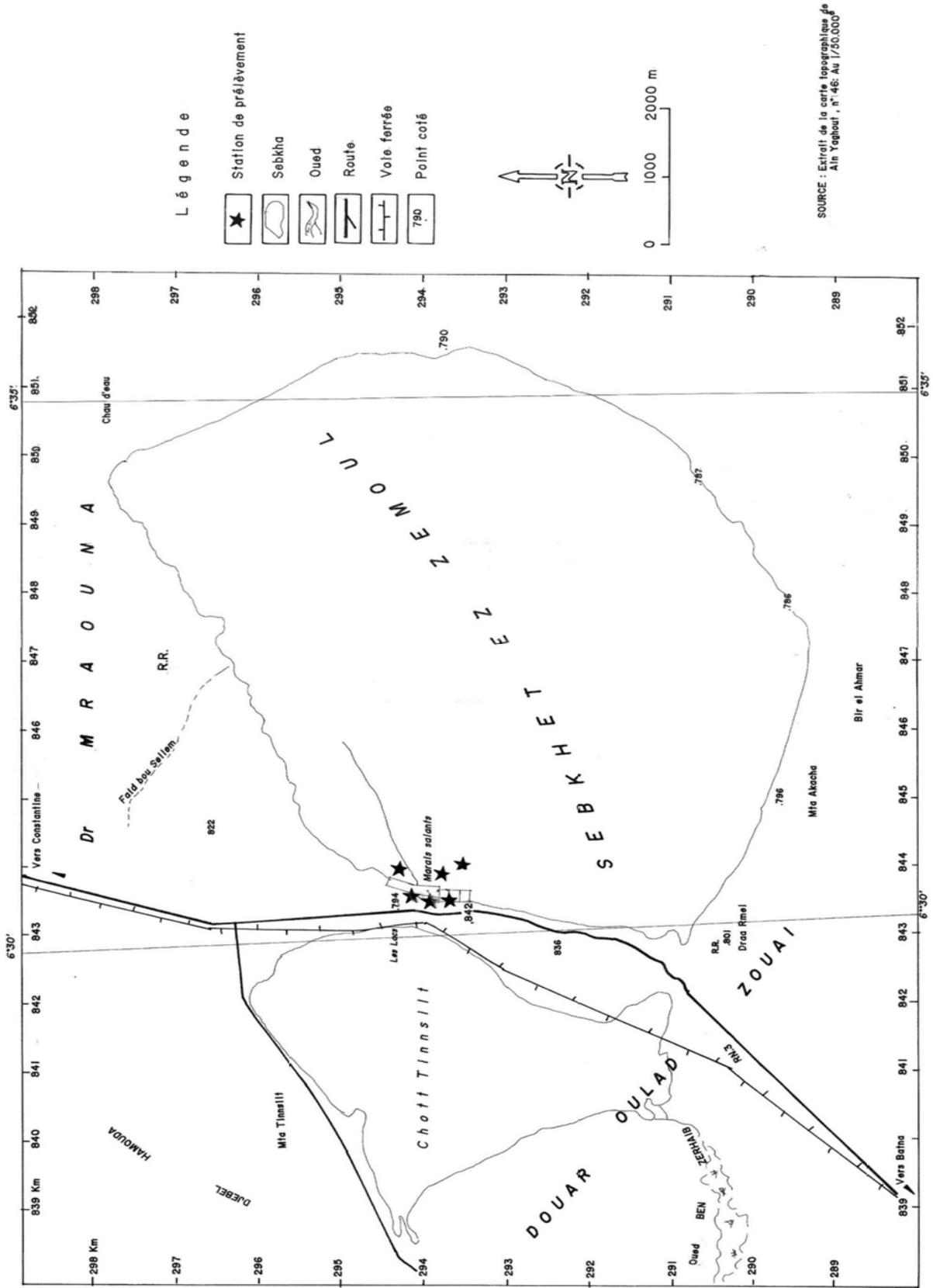


Figure 6 Localisation de la sebkhha Ezzemoul



Figure 7 Localisation géographique de la zone d'échantillonnage (sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila).

Les prélèvements des échantillons ont été réalisés le 18 février à partir de cinq sites différents de sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila (Figure 8, 9, 10, 11) selon Pochon et Tardieux (1962).

Les échantillons d'eau de bassin ont été collectés à partir du site (1) dans des flacons en verre stériles. En effet, des échantillons de la rhizosphère de plantes de sites (2, 4) ont été prélevés et placés dans des sacs en plastiques stériles. Le sol de la rhizosphère de plantes adjacentes, a été prélevé à une profondeur de 15 cm après avoir écarté les trois premiers centimètres à partir des sites (3, 5), puis déposée à l'aide d'une spatule stérile dans des flacons stérile. Finalement, les échantillons ont été transportés au laboratoire et conservés à 4° C jusqu'à l'analyse.

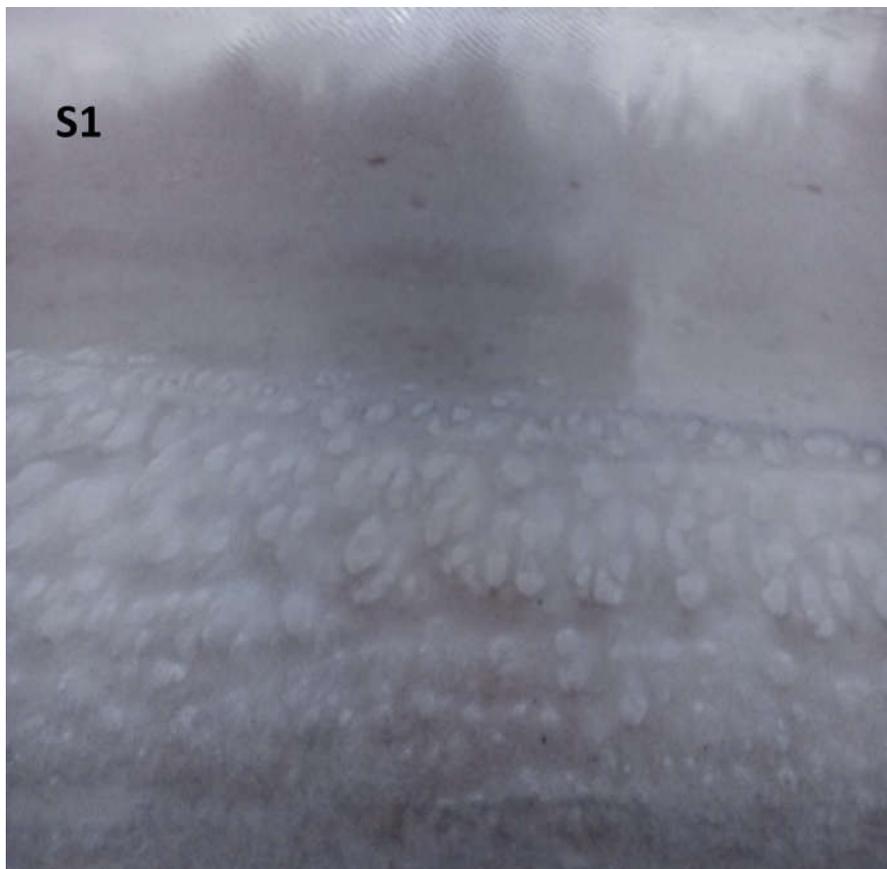


Figure8 Site (1) d'échantillonnage à partir de l'eau

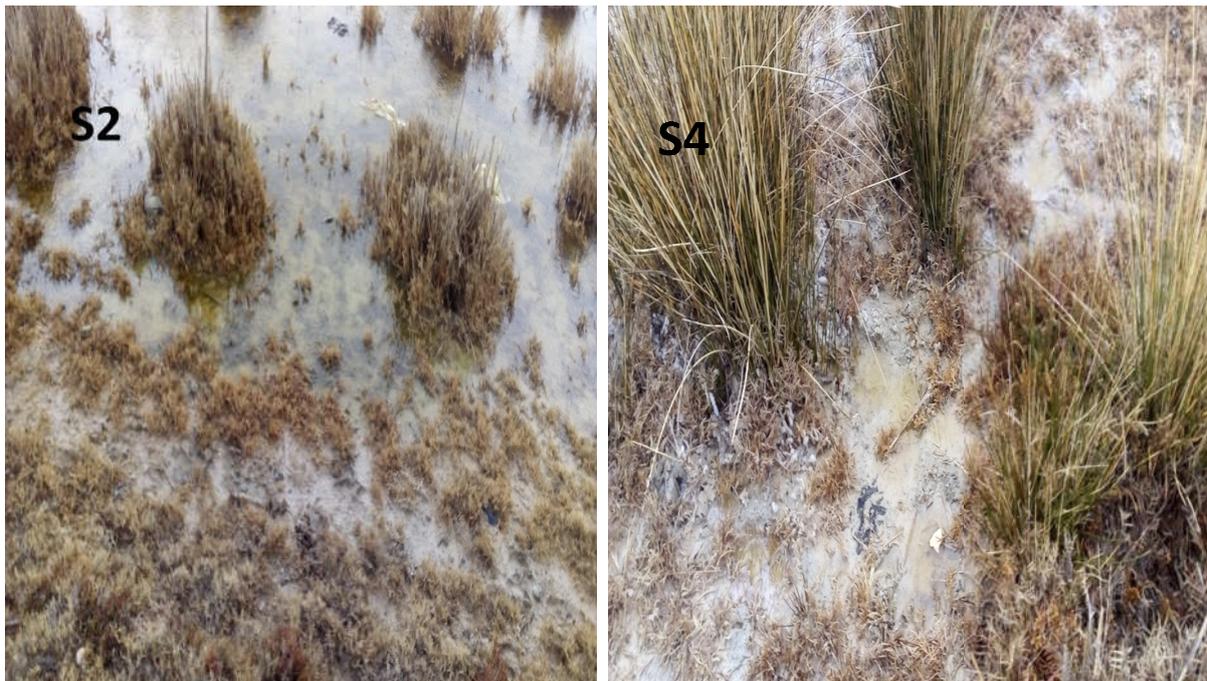


Figure 9 Sites d'échantillonnages (S2, S4) à partir de la rhizosphère de plantules de sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila



Figure 10 Sites d'échantillonnage (S3) à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.



Figure 11 Sites d'échantillonnage (S5) à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes.

3.2.2- Isolement et purification

L'isolement et la purification des moisissures ont été réalisés sur milieu PDA (Potato dextrose agar) (Annexe 1) avec 4 concentrations différentes en NaCl (5, 10, 20 et 30 %) (Tournas, 2005). Une solution-mère a été préparée avec 1 g de chaque échantillons (sites 2, 3, 4 et 5) ou 1 ml d'eau (sites 1) dans 9 ml d'eau physiologique stérile (Annexe 3), Des dilutions décimales de 10^{-1} à 10^{-6} ont été effectuées, chaque dilution subit une homogénéisation à l'aide du Vortex (Figure 12). Un volume de 0,1 ml de la solution mère et de ses dilutions (de 10^{-1} à 10^{-6}) de chaque échantillon est ensuite ensemencé dans des boîtes de Pétri sur milieu PDA puis incubé à 30° C pendant 7 jour. Les moisissures développées ont été repiquées au centre de boîte de Petri sur le même milieu dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention d'isolats purs (Gerhardt, 1994).

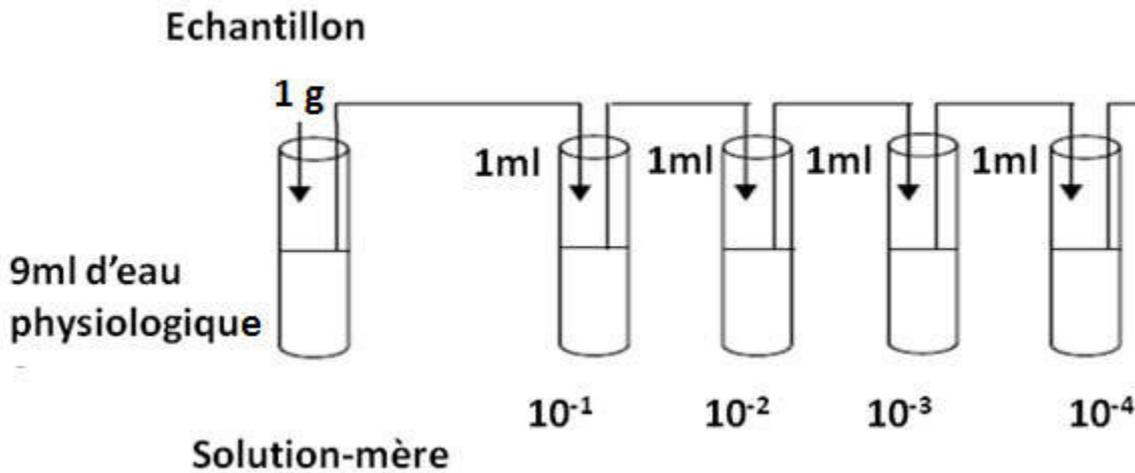


Figure 12 Méthode de dilution

3.2.3- Conservation de moisissures

Les isolats fongiques purifiés ont été repiqués sur gélose inclinée et incubés à 30° C pendant 7 jour, puis stockées à 4° C (Takahashi *et al.*, 2008). La conservation des isolats fongiques a été réalisée aussi sur milieu liquide (glycérol 10 %) et le stockage a été effectué à -80°C (Tindall, 1992).

3.3- Etude de l'activité anti- bactérienne

Le test d'antagonisme des isolats fongiques obtenus vis-à-vis les quatre bactéries pathogènes consiste à rechercher l'activité biologique de ces isolats sur le développement des bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*). Ce test a été réalisé par la méthode de diffusion sur gélose.

Chaque culture de bactéries doit êtreensemencée en stries sur gélose nutritive pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à une température de 37°C choisir 4 à 5 colonies bien isolées avec une anse d'inoculation et les transférer dans un tube de solution d'eau physiologique stérile, tremper un écouvillon de coton dans la suspension et tourner le pour enlever les liquides excédentaires. Enfin, Bien Etaler l'inoculum sur toute la surface de boîte de Pétri contenant la gélose Muller Hinton (MH) (Annexe 1) puis, prélever les disques

de moisissures (7mm de diamètre) à l'aide d'un perforateur stérile et déposer le de manière renversée au centre de la boîte. Les résultats ont été analysés après le 1, 2 et le 3^{ème} jour d'incubation (30°C). Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés au millimètre (Figure 13) (Errakhi *et al.*, 2007).

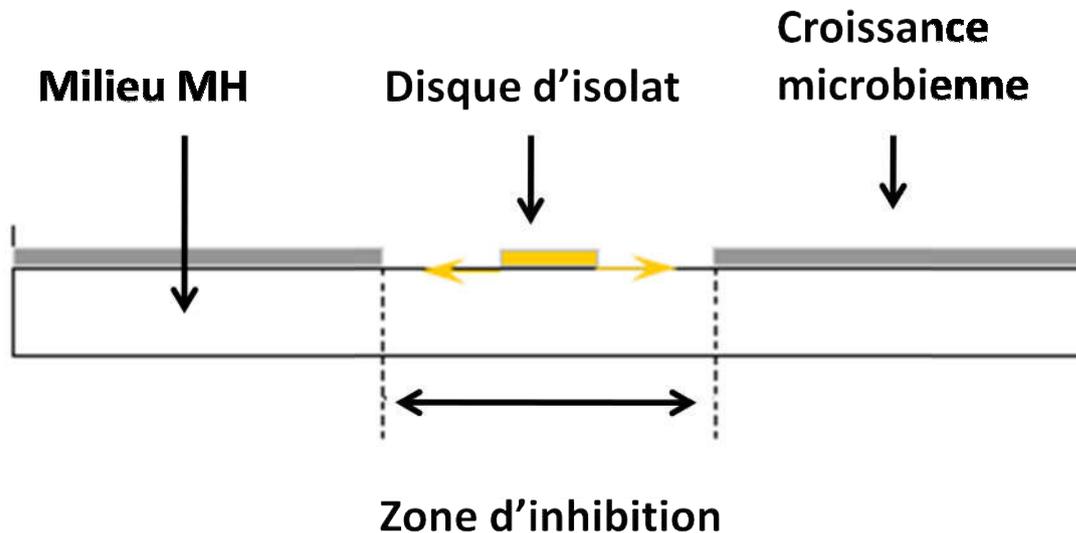


Figure 13 Boîte de Pétri présentant l'activité des isolats obtenus vis-à-vis les bactéries pathogènes.

3.4- Identification des isolats sélectionnés

Les isolats les plus performants ont été soumis à une identification macroscopique (caractères culturaux) et microscopique (caractères morphologiques) (Pitt et Hoecking, 2009).

3.4.1- Observation macroscopique

L'étude macroscopique des isolats fongiques a été effectuée sur milieu PDA préalablement incubés à 30° C pendant 7 jours. L'examen à l'œil nu permet la détermination des caractères suivants: (couleur d'isolat et son revers, aspect et pigmentation) (Guiraud, 1998).

3.4.2- Observation microscopique

Les préparations microscopiques 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 d'eau distillé 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 (Cahagnier et Richard-Molard, 1998 ; Chabasse, 2002).

L'observation microscopique a été réalisée aux grossissements X10 et X40 à l'aide d'un microscope type (Motic digital microscope DMB série).

3.5- Etude de l'activité enzymatique

Grâce à leur grande spécificité d'action, les enzymes constituent un outil de fabrication dans de nombreux secteurs de la recherche, du contrôle et de la production industrielle de métabolites. Elles sont purifiées à partir de diverses matières biologiques premières, dont les micro-organismes présentent une source très avantageuse. Un ensemble des testes enzymatiques ont été réalisés pour voir la capacité des isolats fongique de dégradée des lipides et protéines.

3.5.1- Détermination de l'activité protéolytique

La caséine étant la protéine du lait (constituent la majeure partie des composants azotés du lait). De ce fait, un test d'hydrolyse de caséine a été effectué sur gélose au lait (Annexe 2). Les souches sélectionnées ont étéensemencées en un seul disque de moisissure (7mm 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)

3.5.2- Détermination de l'activité lipolytique

Les moisissures produisent principalement trois catégories d'enzymes lipolytiques : les lipases, les estérases et les phospholipases. Selon la nature de leur substrat, il est possible de diviser les enzymes lipolytiques en deux catégories : les lipases (triacylglycérol acylhydrolases) et les estérases (carboxylestérases). Les lipases sont des carboxylestérases qui catalysent l'hydrolyse et la synthèse d'acylglycérol à longues chaînes, c'est-à-dire qu'ils contiennent plus dix atomes de carbone (>10 C), alors que les estérases catalysent l'hydrolyse de glycérolester à courtes chaînes (<10 C). Il est à noter que parfois les lipases possèdent aussi une activité estérase, mais que l'inverse n'est pas vrai. Les lipases agissent en conditions aqueuses sur les liens carboxyl esters des triacylglycérols pour libérer des acides gras et du glycérol, c'est l'action hydrolytique des lipases. Toutefois, dans des conditions où les molécules d'eau sont moins abondantes ou disponibles, la réaction inverse, soit de synthèse, peut survenir (Gupta *et al.*, 2004).

➤ Hydrolyse du tween 80

La recherche d'estérase a été effectuée par le test d'hydrolyse des Tweens 80. En effet, la dégradation du tween 80 par les souches sélectionnées a été réalisée sur un milieu approprié (Annexe 2), en cas de réaction positive, il se forme un halo opaque autour de la culture après incubation à 30°C pendant 24 à 48 heures, le développement d'un précipité autour de la culture témoigne la présence d'une estérase (acide gras) (Sierra, 1957).

➤ Lécithinase

Le jaune d'œuf est un substrat composé de lécithine, triglycérides et d'une lipoprotéine, il permet donc de rechercher trois enzymes : La lécithine : l'apparition d'un halo opaque, blanc jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à la limite, indique la présence d'une lécithinase. Si la lécithinase est absente, toute l'opacité floue à la surface de la colonie indique la présence d'une lipase. La lipoprotéinase est révélée par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie.

Ce test est réalisé par ensemencement en un seul disque de moisissure (7mm de diamètre) à l'aide d'un perforateur stérile et déposé de manière renversée au centre de la boîte, sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile (egg-yolk agar ou Gélose à l'œuf) (Annexe 2). L'apparition de toute zone claire autour de la culture après 24 à 72 heures

d'incubation à 30°C, prouve que la souche possède la lécithinase, enzymes dégradant la paroi cellulaire (De Vos *et al.*, 2009).

Résultats

Et

Discussion

4- Résultats et Discussion

Ce travail consiste à déterminer l'activité antibactérienne d'isolats fongiques isolés à partir de cinq sites différents de Sebkhia Ezzmoul d'Ain-mlila vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). En effet, l'isolement des microorganismes halophiles a été réalisé dans les différentes concentrations (5%, 10% et 20% de Na Cl).

4.1- L'agent pathogène

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ont été réactivées pour réaliser le test de l'activité anti-bactérienne.

4.2- Isolement de l'agent antagoniste

L'isolement de microorganismes à partir de cinq sites de Sebkhia Ezzmoul d'Ain-mlila a permis l'obtention de 42 microorganismes. En effet, deux isolats bactériens à concentration 10% de Na Cl ont été isolés à partir du bassin de sebkhia; Par ailleurs, 4 isolats bactériens et 7 isolats fongiques ont été isolés à partir de la rhizosphère de plantes à concentrations 5%, 10% et 20% de Na Cl et enfin, 7 isolats bactériens et 22 isolats fongiques, ont été obtenus à partir du sol de la rhizosphère de plantes adjacentes à concentrations 5%, 10% et 20% d' Na Cl (Tableau 11).

Tableau 11 Isolats microbiens obtenus à partir du Sebkhia Ezzmoul d'Ain-mlila de différents sites prospectés.

Site d'isollements prospectés	Microorganismes isolés 42	
	Bactéries	Moisissures
Bassin de sebkhia Ezzemoul	2	/
Rhizosphère de plantes	4	7
Sol de la rhizosphère de plantes adjacentes	7	22

Nous observons une forte densité d'isolats fongiques dans le sol de la rhizosphère de plantes adjacentes et la rhizosphère de plantes aux concentrations en sel 5% 10% et 20%. Ce résultat s'explique probablement par le taux relativement élevé de la matière organique du comme décrit par Gunde-Cimerman *et al.* (2005) qui ont mentionné que le nombre de moisissures halophiles du sol est proportionnel à sa quantité en matière organique.

4.3- Sélection d'isolats halophiles à effet antibactérien

Parmi les quarante deux isolats microbiens testés, dix neuf moisissures halophiles (A1, A2, A3, A4, A8, A9, A10, B1, B4, B5, B6, B7, B8, C1, C2, C3, C4, C6, C7) possèdent un effet antibactérien vis à vis les bactéries testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633)

Les résultats de ce test ont permis de constater que les valeurs varient entre 0.8 et 2.5 cm suivant l'isolat. En effet, le meilleur effet inhibiteur a été développé par les isolats (A4, A9, B5, B6, B7, C7) et ce, sur les bactéries Gram+ et Gram - testées et par les isolats (B6 et C7) sur les bactéries Gram+.

Les isolats (A10) développent un effet antagoniste moins important sur les deux types de souches bactériennes testées. (Tableau 12) (Annexe 3).

Tableau 12 Inhibition de la croissance des bactéries pathogènes *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 sous l'effet des isolats fongiques obtenus.

Les isolats	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>E.coli</i>
A1	/	++	+++	++
A2	++	+++	++	+++
A3	+++	+++	+++	+++
A4	++	+++	++++	+++
B1	+++	/	+++	/
B4	+++	++	+++	+++
B5	+++	+++	+++	++++
B6	+++	++++	+++	+++
B7	+++	+++	++++	+++
B8	+++	+++	+++	++
C1	+++	+++	+++	+++
C2	+++	+++	+++	+++
C3	+++	+++	+++	+++
C4	+++	+++	+++	+++
C6	+++	+++	+++	+++
C7	+++	++++	++++	++++

A8	+++	+++	+++	+++
A9	+++	/	++++	+++
A10	/	+++	/	/

Inhibition : (++) (Inhibition moyen), (+++) inhibition importante, (++++) inhibition très importante.

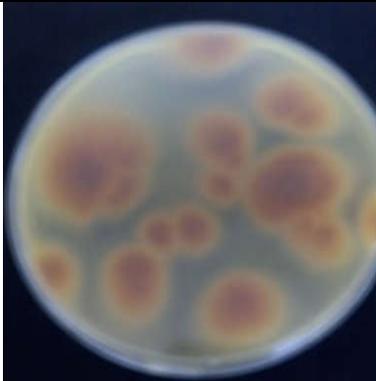
4.4- Identification des souches

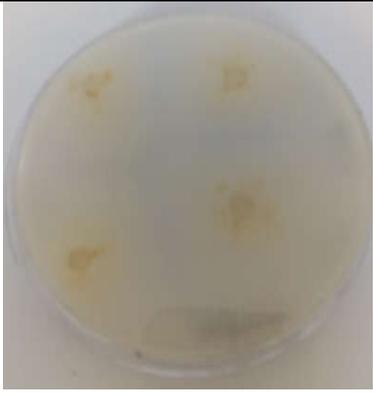
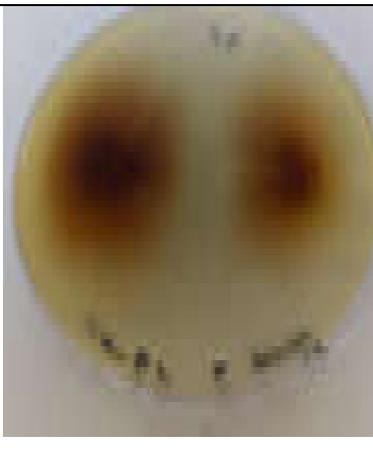
L'identification des isolats fongiques sélectionnés étant basée essentiellement sur les clés de détermination décrites par la littérature (Botton *et al*, 1990 ; Guiraud, 1998), en se basant sur les caractères macroscopiques des colonies (aspect, couleur, forme, contour, etc.) et sur les caractères microscopiques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

4.4.1- Etude macroscopique

Les caractères macroscopiques des différents isolats fongiques obtenus ont été étudiés sur le milieu PDA, les plus communément utilisé à cet effet (Botton, 1990). Le (Tableau 13) résume l'aspect du mycélium des isolats obtenus, la couleur de la surface et du revers ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque isolat.

Tableau 13 Etude macroscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.

Espèce	Milieu et pourcentage de Na Cl	Description	Aspect macroscopique	
			Face	Revers
A1	PDA 5% Na Cl	Couleur : blanc Aspect: Cotonneuse Revers : jaune, marron, contour jaune		

<p>A2</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : blanc et centre jeune Aspect : poudreuse et Cotonneuse Revers : centre jaune, contour beige</p>		
<p>A3</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : vert foncé contour blanc Aspect : velouté à poudreuse des gouttelettes d'exsudat en surface Revers : marron claire, contour beige. présence</p>		
<p>A4</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : blanc centre jaune claire Aspect: poudreuse Cotonneuse bombé Revers : marron foncé, contour marron claire. présence de pigment colleur jaune.</p>		
<p>A8</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : beige à centre rose claire Aspect : Cotonneuse bombé à poudreuse Revers : jaune, marron claire, contour blanc. Présence de pigment jaune.</p>		

<p>A9</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : vert tourné par un cercle blanc</p> <p>Aspect : laineuse veloute</p> <p>Revers : Vert pistache, contour beige.</p>		
<p>A10</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : marron foncé, contour blanc</p> <p>Aspect: poudreuse laineux</p> <p>Revers : brun à contour beige.</p>		
<p>B1</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : marron foncé</p> <p>Aspect: poudreuse</p> <p>Revers : grise claire</p>		

<p>B4</p>	<p>PDA 5%</p>	<p>Couleur : noir à centre blanc Aspect : laineuse à velouté Revers : centre noir, contour marron foncé.</p>		
<p>B5</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : noir à centre blanc Aspect : laineuse à velouté Revers : centre noir, contour marron foncé.</p>		
<p>B6</p>	<p>PDA 5%</p>	<p>Couleur : jeune claire Aspect : Cotonneuse bombé Revers : centre marron claire. Présence de pigments jaune.</p>		

<p>B7</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : blanc Aspect : Cotonneuse Revers : beige claire</p>		
<p>B8</p>	<p>PDA 20%</p>	<p>Couleur : blanc Aspect : Cotonneuse Revers : beige claire</p>		
<p>C1</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : Rose Aspect : velouté Revers : centre jaune, marron. contour rose claire</p>		
<p>C2</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : blanc Aspect : Cotonneuse bombé Revers : centre jaune, contour beige..</p>		

<p>C3</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : marron à centre blanc, contour beige.</p> <p>Aspect : Cotonneuse</p> <p>Revers : centre blanc, contour marron et tourné par un cercle beige.</p>		
<p>C4</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : noir à centre blanc</p> <p>Aspect : laineuse à velouté</p> <p>Revers : centre noir, contour marron foncé.</p>		
<p>C6</p>	<p>PDA 10%</p>	<p>Couleur : blanc et centre marron claire</p> <p>Aspect : poudreuse Cotonneuse</p> <p>Revers : center marron, contour marron.</p>		

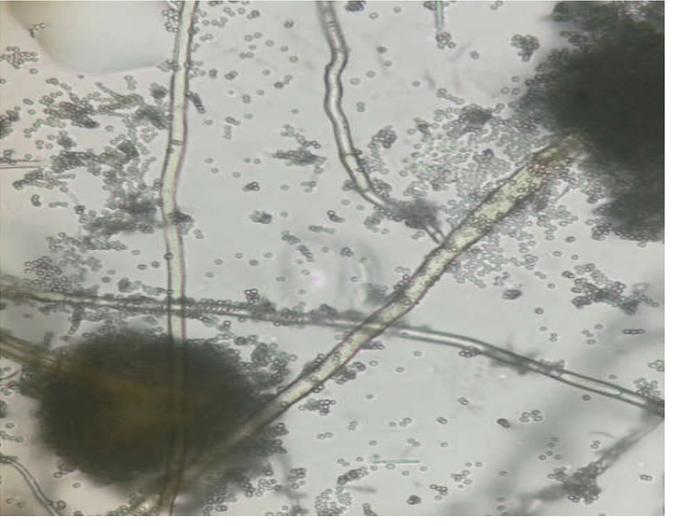
C7	PDA 20%	Couleur : blanc Aspect : Cotonneuse Revers : jaune blanchâtre		
-----------	--------------------	---	--	---

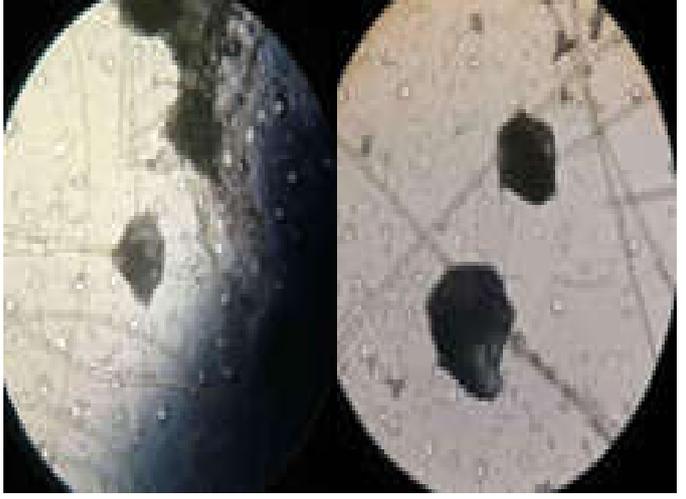
4.4.2 - Etude microscopique

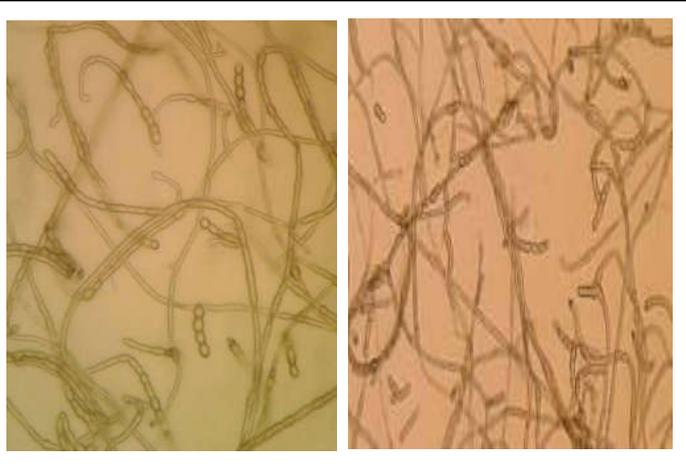
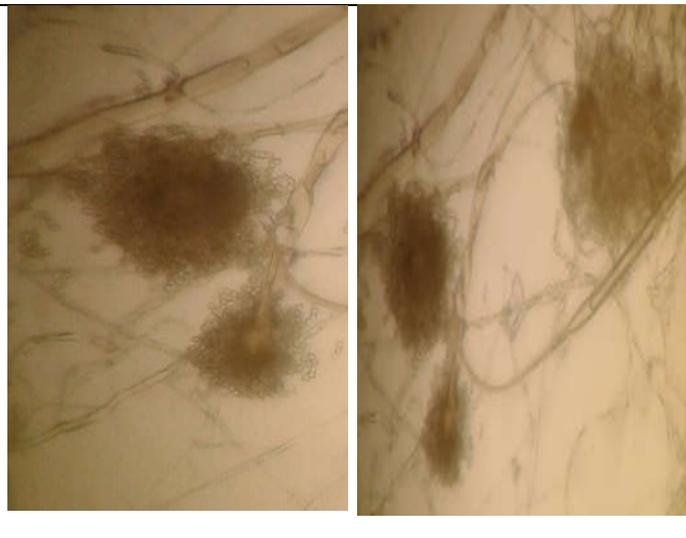
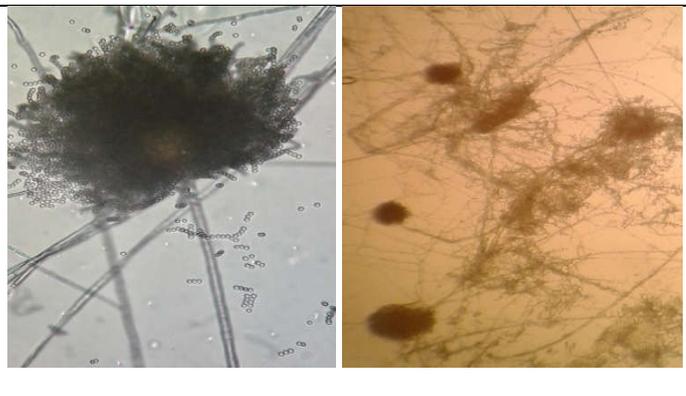
L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 19 souches fongiques (Conidiophores, conidies et mycélium) ont été mis en évidence sur le (Tableau 4).

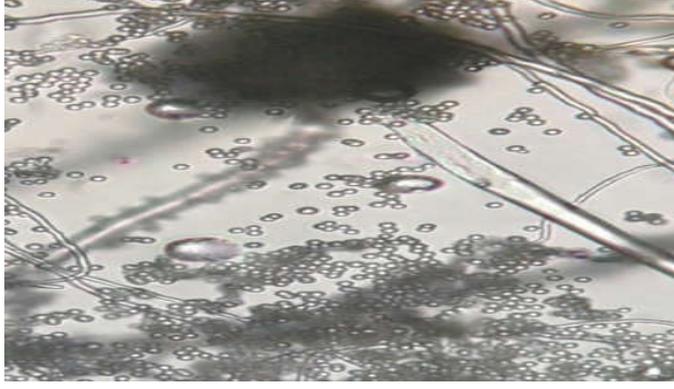
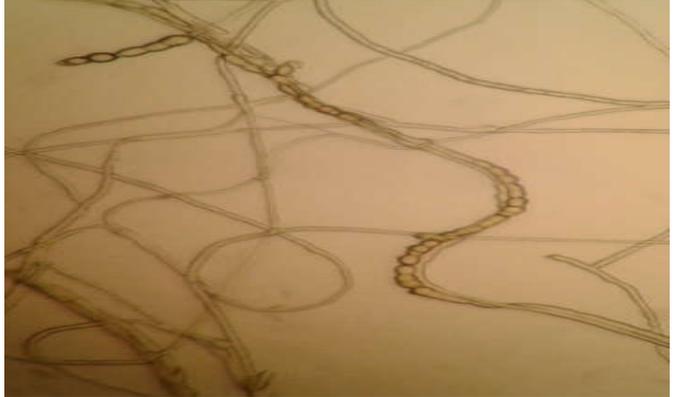
Tableau 14 Etude microscopique des isolats fongiques isolés à partir de la sebkha Ezzmoul d'Ain-mlila.

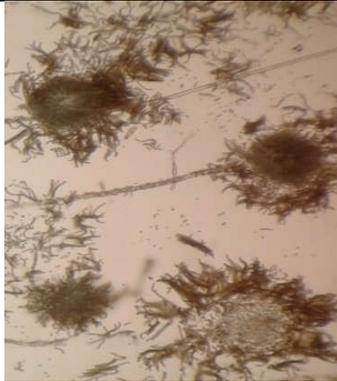
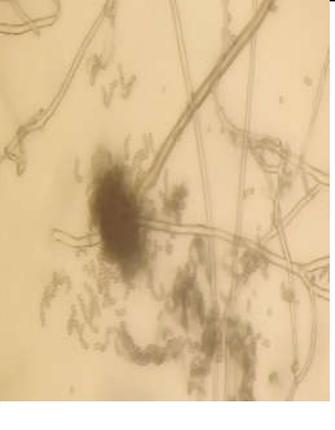
Espèce	Description	Aspect microscopique GX 40
A1 <i>Aspergillus Sp</i>	Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné, vésicule globuleuse. tête aspergillaire:unisériée radiée.	

<p>A2 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>Conidiophore : très longs et non cloisonné ,phialides : portées par des métules insérées sur la vésicule Conidies : globuleuses</p> <p>Tête aspergillaire : bisériée , radiée</p>	
<p>A3 <i>Paecilomyces Sp</i></p>	<p>-Hyphe : septé, hyalines, portent des conodiophores -</p> <p>Conidiophore : ramifiés en verticilles portent des Phialides cylindrique . Conidies : ovoïdes disposées en longues chaines divergentes ou basipétales.</p>	
<p>A4 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Conidiophore: non cloisonné ,phialides portées sur la visucule</p> <p>-Conidies: globuleuses</p> <p>-Tête aspergillaire: unisériée petite et en colonne.</p>	

<p>A8 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>Hyphe : septé</p> <p>-Conidiophore:longue et cloisonné.</p> <p>-Des conidies échinulées produites par des phialides insérées à une visicule globuleuse.</p> <p>-Tête aspergillaire: unisériée</p>	
<p>A9 <i>Penicilium sp</i></p>	<p>Hyphe : septé, hyalines, portent des conodiophores.</p> <p>Conidiophore: ramifiés cylindrique, cloisonnés, disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores -</p> <p>Conidies : rondes</p>	
<p>A10 <i>Paecilomyces Sp</i></p>	<p>Conidiophore large et très long, conidiées souvent disposées en long chaîne, portées sur des phialides allongées .</p>	
<p>B1 <i>Paecilomyces Sp</i></p>	<p>-Conidiophore :cloisonné,phialides portées sur une visicule sphérique</p> <p>-Conidies:globuleuses</p> <p>-Tête aspergillaire:unisériée et petite</p>	

<p>B4 <i>Colletotrichum sp</i></p>	<p>mycélium hyalin et septé, Les conidies sont toutes unicellulaires, hyalin et très allongées.</p>		
<p>B5 <i>Colletotrichum sp</i></p>	<p>mycélium hyalin et septé, Les conidies sont toutes unicellulaires, hyalin et très allongées</p>		
<p>B6 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Conidiophore : cloisonné, phialides portées sur une viscule sphérique -Conidies: globuleuses -Tête aspergillaire: unisériée et petite</p>		
<p>B7 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Des conidies disposées en chaîne produites par des phialide insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore long et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire grande et en colonne).</p>		

<p>B8 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Conidiophore:long liéé par une visicule globileuse.</p> <p>-Conidies ronds et lises associes sur des phialides directement liées par la visicule.</p> <p>-Tête aspergillaire: petite unisériées</p>	
<p>C1 <i>Humicola sp</i></p>	<p>Les phialides étaient discrets ou intercalaires, simples et latéraux, et plus encore</p> <p>ou moins cylindrique ou en forme de flacon.</p>	
<p>C2 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Hyphe : septé</p> <p>-Conidiophore:longue et cloisonné.</p> <p>-Des conidies échinulées produites par des phialides insérées à une visicule globileuse.</p> <p>-Tête aspergillaire: unisériée</p>	
<p>C3 <i>Geotrichum sp</i></p>	<p>Mycélium septé (eumycélium)</p> <p>-Arthrospores à paroi épaisse.</p> <p>Conidies cylindriques, en forme de tonneau à ellipsoidales, formées par désarticulation des hyphes fertiles.</p>	

<p>C4 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Conidiophore:large et long Vésicule:globuleuse -Conidies:subglobuleuses -Tête aspergillaire:bisériée</p>		
<p>C6 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>-Conidiophore large et très long, conidiées souvent disposées en chaîne, portées sur des phialides insérées à une visicule globuleuse par des métules. -Tête aspergillaire:bisiriée</p>		
<p>C7 <i>Aspergillus Sp</i></p>	<p>Conidiophore:longue non cloisonné. -Phialides : portées par des métules insérées sur la vésicule. Conidies :ronde.</p>		

4.5 - Etude de l'activité anti-bactérienne

Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 19 souches appartenant aux genres d'*Aspergillus*, *Paecilomuces*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Colletotrichum* et *Humicola* vis-à-vis de quatre bactéries (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633). La plupart des isolats (19 moisissures) ont développé une activité antibactérienne au moins sur une des bactéries tests. En effet une zone de lyse de taille différente autour des disques déposés a été mise en évidence. La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque (Tableau 2).

B8	B7	B6	B5	B4	B1	A4	A3	A2	A1	Les isolats		
										1j	2j	3j
0,8	0,85±0.07	0,97±0.31	0,92±0.14	0,95±0.07	0,9	0,8±0	0,92±0.08	0,88±0.02	/	<i>Bacillus subtilis</i>		
0,95±0.21	0,92±0.10	0,93±0.15	0,9±0.1	0,9	0,87±0.06	0,8±0	0,83±0.06	0,87±0.05	/			
0,77±0.03	0,88±0.05	0,9	0,95±0.07	0,82±0.10	/	0,85±0.05	0,87±0.11	0,87±0.11	/			
1,07±0.06	1,3±0.61	1±0.14	0,95±0.18	0,85±0.07	1	/	0,9±0.14	0,85	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
0,9	1,466666667	/	0,9±0.13	0,92±0.10	0,95±0.07	1,5	0,82±0.08	0,8±0	0,9			
/	1,3±0.69	0,9	0,98±0.18	/	0,9	1,4	/	0,9	0,9			
1,03±0.15	0,9	/	1,05±0.07	0,8	/	0,9	0,92±0.10	0,95±0.13	0,85	<i>Staphylococcus aureus</i>		
0,83±0.06	0,9	2,5	0,883333333	0,8	/	0,95±0.07	0,95±0.07	0,93±0.05	0,9			
0,85±0.07	0,8	1,9±0.85	1,02±0.25	/	/	0,95±0.07	0,95±0.07	0,9±0	0,9			
0,8	0,83±0.08	1,1	1,3±0.56	1	/	1	/	0,95±0.07	0,9	<i>E. coli</i>		
/	1,2±0.42	0,9	1,6	0,85±0.01	/	0,82±0.08	0,9	1,3±0.56	0,95			
/	1	/	1,4	/	/	0,9	/	/	/			

A10	A9	A8	C7	C6	C4	C3	C2	C1
/	1,15±0,07	/	0,85±0,07	0,9	0,81±0,12	0,92±0,25	0,95±0,07	0,87±0,07
/	1,066±0,2	0,8±0,14	0,9±0,14	0,85±0,13	0,83±0,06	0,83±0,31	0,97±0,06	0,87±0,06
/	1,066±0,1 ₂	0,85	0,85±0,13	0,85±0,07	0,75	0,95 ± 0,06	0,87±0,03	0,9±0,14
/	1,5	1	1,4±0,36	1	0,95	0,93±0,06 ₃	1±0,14	1
0,9	/	0,9	1,2±0,34	/	0,98±0,12	0,8	0,9	0,92±0,03
/	/	1,1	1,47±0,55	/	/	1,15	/	/
0,9	/	1	1,6±0,99	1	0,85±0,07	/	0,93±0,06	/
/	/	0,8	2,03±0,90	0,95±0,10	0,87±0,17	/	1±0,2	/
/	/	1	1,63±0,75	0,92±0,10	/	/	1,1±0,28	0,9
/	/	0,85±0,07	0,9	0,9	0,9	1,2	0,93±0,05	/
/	0,9	0,833±0,0	1,4±0,28	1,2	1,1	/	0,8	0,85
/	/	0,8	1,23±0,05	/	1,2	1,1	2,1	1,1

Tableau 15 Effet des moisissures halophiles sur les bactéries test

Dix sept souches de moisissures testées ont montré un effet antibactérien vis-à-vis *Bacillus subtilis* sont (*Aspergillus* A2, A4 et A8, *Paecilomyces* A3 et B1, *Penicillium* A9 *Colletotrichum* B4 et B5, *Geotrichum* C3, *Humicola* C1) sauf A1 n'a pas d'effet.

Six souches plus performante, ont montré un grand effet contre *Pseudomonas aeruginosa* sont *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Paecilomyces* et *Colletotrichum* (A1, A4, A8, B1, B5, B7, C3 et C7) (avec une zone de lyse égale à 1,15, 1,1, 1, 0,98, 1,46, 1,15, 1,47 cm respectivement. Le reste des moisissures considéré comme des espèces à moyen d'effet antibactérien, avec une zone de lyse de 0.8 à 1 cm.

Une absence totale d'activité antibactérien vis-à-vis *Staphylococcus aureus* des souches A9, B1 et C3 par contre les souches B6 et C7 produisent une très grande activité antibactérien avec des zones d'inhibition de 2.03 à 2.5 cm. Le reste des souches considéré comme espèce à moyen effet antibactérien.

Les espèces B5, B7, C2 et C7 à fort effet antibactérien contre *Escherichia coli* avec une zone de lyse de 1 à 2.1 cm, la souche B1 et A10 n'ont pas d'effet contre *E.coli*, le reste de souches considérées comme des espèces à moyen effet antibactérien.

Selon Botton *et al.*, (1990), les espèces de moisissures sont connues par leur production de substances à effet antibactérien, elles produisent, généralement, des métabolites secondaires biologiquement actifs, synthétisés en fin de croissance et possèdent des structures chimiques différentes de celles des protéines. Il est connu que ces genres constituent le réservoir principal de substances antibactériennes, en effet, comme il a été découvert par Alexander Fleming en 1928 que le genre *Penicillium chrysogenum* est connu par sa propriété à produire des antibiotiques (pénicilline G), contre les bactéries Gram (+) tel que *Enterococcus faecalis* qui possède une paroi de peptidoglycane qui constitue son enveloppe la plus externe, et qui représente une structure rigide entourant la membrane cytoplasmique, donnant sa forme à la bactérie. Nos résultats s'accordent avec ceux de Abdelaziz en 2006 qui a testé et trouvé un fort effet antibactérien d'*Aspergillus flavus* et *Penicillium sp.* vis-à-vis de deux bactéries Gram (+) *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*. Deux composés antimicrobiens produits par *Geotrichum candidum* sont l'acide phényllactique (PLA) et l'acide indoleacétique (ILA). PLA et ILA ont été signalés spécifiquement inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans le complexe médias TSBYE en induisant comportementale et structurelle changements dans ce pathogène d'origine alimentaire (Dieuleveux et Guéguen, 1998; Dieuleveux *et al.*, 1998a). Le potentiel inhibiteur du phényle alcool éthylique (PLA) produit dans le commerce a été démontré contre Gram-positif et Gram-négatif bactéries, telles que *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, et *Escherichia coli* (Dieuleveux *et al.* 1998a, b; Ohhira *et al.*, 2004). De plus, l'action bactéricide du PEA dans les espèces Gram-positives et Gram-négatives, par exemple *S. aureus* et *E. coli*, a été associé avec des changements cytologiques, y compris les dommages membranaires, et inhibition de la synthèse de l'ARN et des protéines (Lucchini *et al.*, 1990).

Xanthoquinodine A3 et B3 ont été produites par *Humicola sp* et montré anticoccidial (A3 et B3) et antibactérien (A3) (Tabata, 1993).

Paecilomyces sp. isolé d'un large éventail d'habitats conduit à la diversification de nouveaux métabolites secondaires à haute valeur ajoutée qui jouent un rôle important dans une vie saine,

à la découverte de nouveaux médicaments, au développement de nouvelles tendances et aux perspectives du potentiel de bioactivité de cet *ascomycète* (Mioso *et al.*, 2015)

Dans la recherche continue de métabolites bioactifs supplémentaires, un analogue de l'acide anacardique d'origine naturelle a été isolé à partir de la même souche fongique présentant une antimicrobienne contre les pathogènes marins. *Escherichia coli* DC2 et *Streptococcus iniae* FP5228 (Liu *et al.*, 2012).

Quatre nouveaux polycétides ont été isolés à partir de *Paecilomyces variotii* marins. Ces composés ont montré une activité inhibitrice contre les bactéries pathogènes 7001, y compris *Staphylococcus aureus* 3089 résistant à la méthicilline et *Vibrio parahaemolyticus* (Liu *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été montrés par les métabolites bruts de *Colletotrichum gloeosporioides* isolés à partir de la plante médicinale *Phlogacanthus thyrsiflorus* Nees, qui présentaient une inhibition efficace contre la souche bactérienne testée.

Le métabolite de *Colletotrichum gloeosporioides* était identifié comme des hydrocarbures volatils. Jusqu'à présent, des études ont rapporté un grand nombre de composés antimicrobiens isolés des endophytes, appartenant à plusieurs classes structurales telles que les alcaloïdes, les peptides, les stéroïdes, les terpénoïdes, les phénols, les quines et les flavonoïdes (Yu *et al.*, 2010). Les principaux composés identifiés sont présentés dans les principaux composants étaient le 9-octadécénamide, l'hexadécénamide, le diéthylpythalate, le 2-méthyl-3-méthyl-3-hexène, le 3 éthyl, 4-diméthyl-pentane. Des métabolites d'hydrocarbures volatils ont également été rapportés chez certains champignons endophytes présentant une activité antimicrobienne bactéries et champignons phytopathogènes (Strobel *et al.*, 2001).

4.6- Activités enzymatiques

Les activités protéolytique, lipolytique ont été mises en évidence en utilisant les milieux : gélose au lait, gélose à émulsion d'œuf et gélose au Tween 80 respectivement (Tableau 16).

Tableau 16 résultats de la mise en évidence des activités hydrolytiques extracellulaires

Souches	Caséinase	Lécithinase	Tween 80
A1	+	+	+
A2	+	+	-
A3	+	+	-
A4	+	+	+

A8	+	+	+
A9	+	+	-
A10	+	+	+
B1	+	-	+
B4	+	+	+
B5	+	+	+
B6	+	+	+
B7	+	+	+
B8	+	+	+
C1	+	+	-
C2	+	+	-
C3	+	+	-
C4	+	-	+
C6	+	+	+
C7	+	+	+

L'étude enzymatique a montré que le bagage enzymatique des souches est très important, elles sont capables d'hydrolyser la caséine, la lécithine et le tween 80. Parmi les isolats, dix neuf sont producteurs d'enzymes hydrolytiques extracellulaires. Ils sont dotés, principalement, d'une activité proteolytique, et lipolytique.

- **Mise en évidence de l'activité protéolytique**

Les enzymes protéolytiques sont des hydrolases formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques. (Frazier, 1967 ; Scriban, 1999).

Dans le choix de la substance protéique employée comme substrat pour la production des protéases (Clarke et Steel, 1966). On a utilisé le milieu au lait gélosé (la gélose au lait) comme milieu sélectif.

Les tests de protéolyse ont permis la mise en évidence de l'activité protéolytique chez dix neuf moisissures différentes. Six souches sont caractérisées par des zones d'hydrolyse faibles (< 1.7 cm). Alors que les autres souches, sont caractérisées par des zones d'hydrolyse, dont le

diamètre varie de 1.7 à 6.1cm. Les protéases constituent les enzymes les plus importantes qui peuvent être produites par plusieurs genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Rhizomucor*, *Endothia*, etc (Frazier, 1967 ; Ul-haq et al., 2003). Ces résultats permettent de considérer ces souches comme des moisissures productrices de protéases extracellulaires (Smith et al., 1952 ; Duce et Thomas, 1959).

Les diamètres des zones de croissance et d'hydrolyse de chaque souche sont représentés dans la (Figure 14). Le temps d'incubation durant 72 h comme indiqué sur la figure.

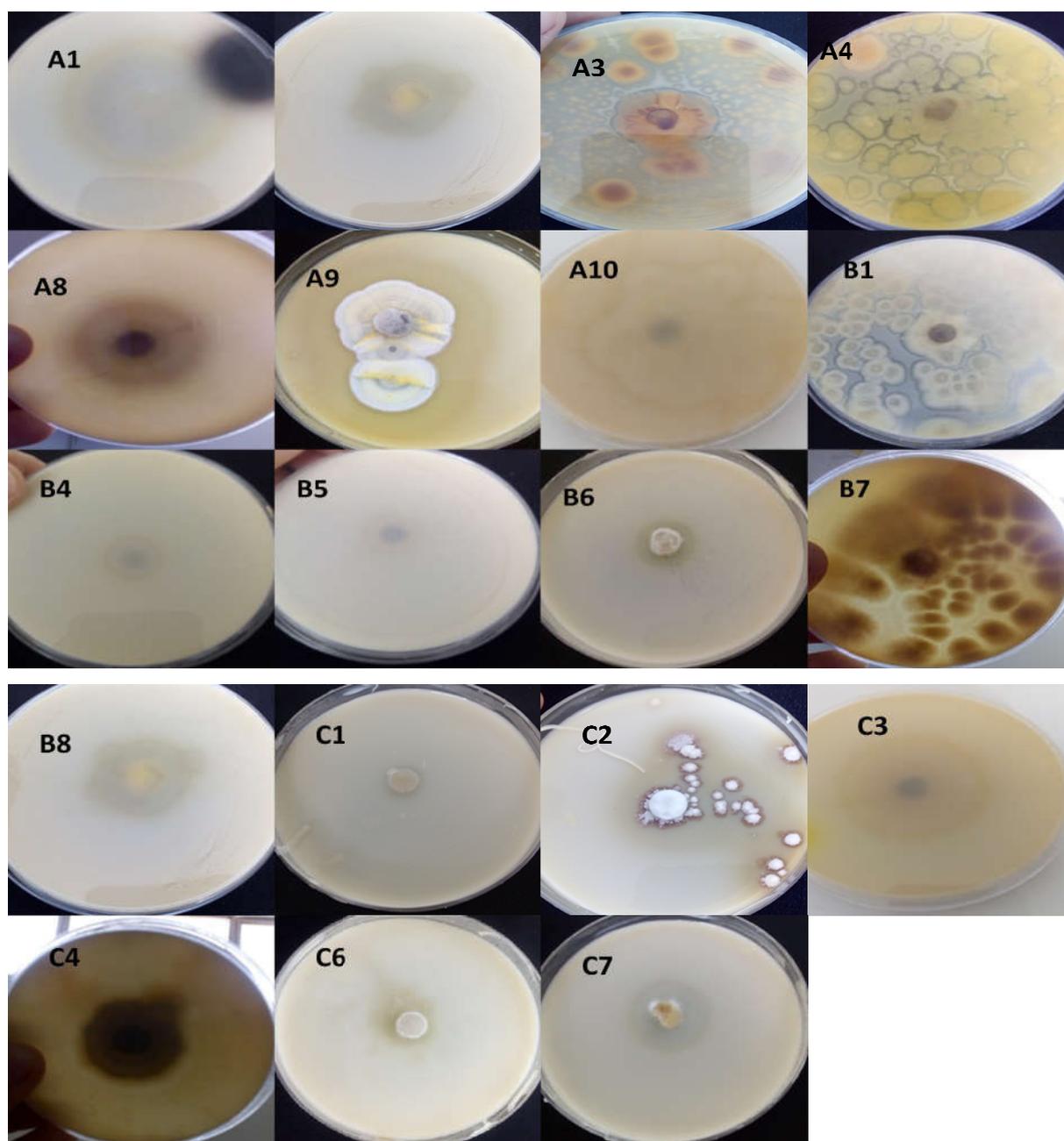
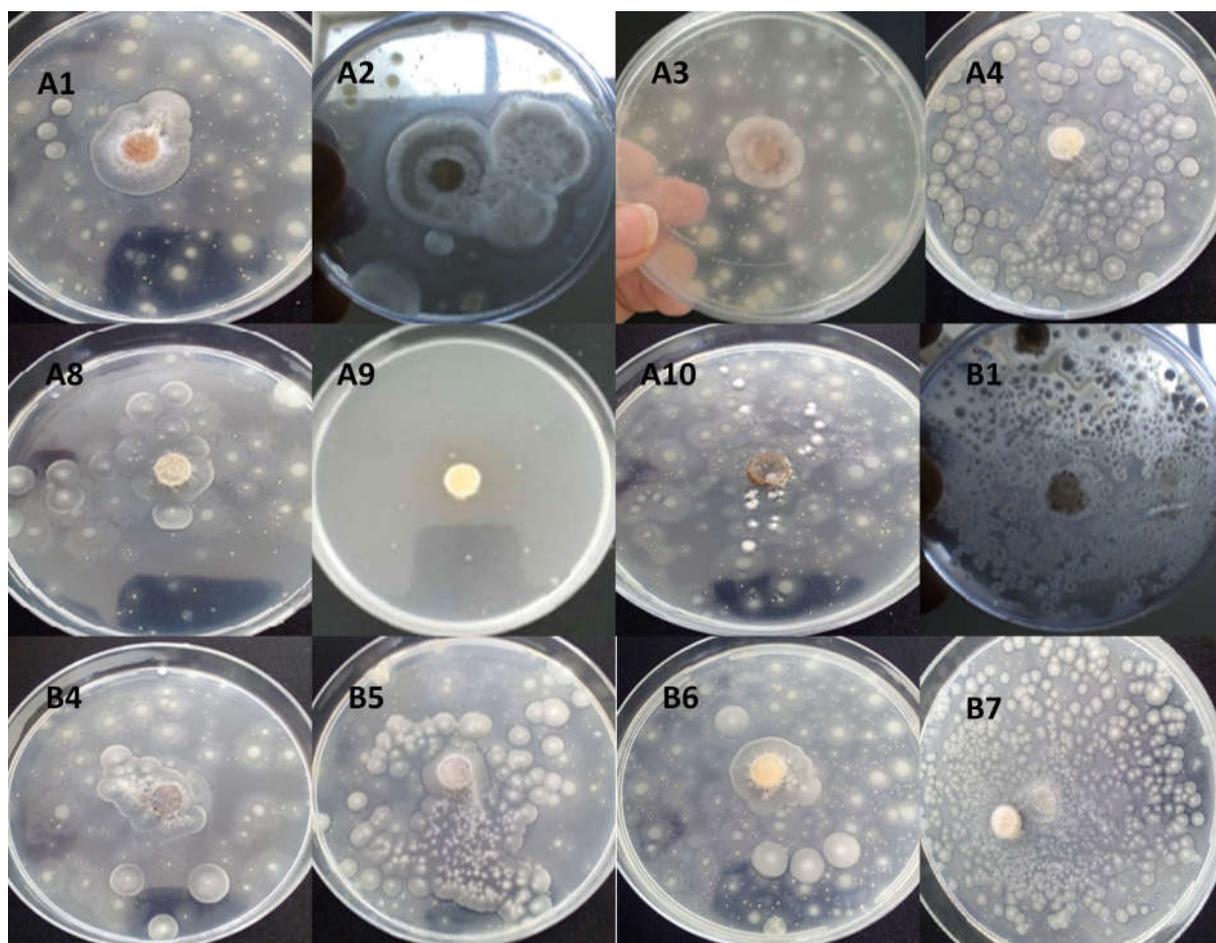


Figure 14 Résultat de la croissance des souches protéolytique sur gélose au lait.

- **Mise en évidence de l'activité lipolytique**

La majorité de nos souches sont productrices d'enzymes qui dégradent les lipides et produisent plus spécialement trois enzymes lipolytiques à savoir l'estérase, la lécithinase et la lipoprotéinase (Figure 15,16).

11 souches possèdent aussi une activité lipolytique elles hydrolysent le Tween 80 et la lécithine, de nombreux travaux ont permis d'isoler des souches halophiles d'environnements hypersalins possédant ces activités. Ces lipases sont actives en présence de fortes concentrations salines (Rohban *et al.*, 2009).



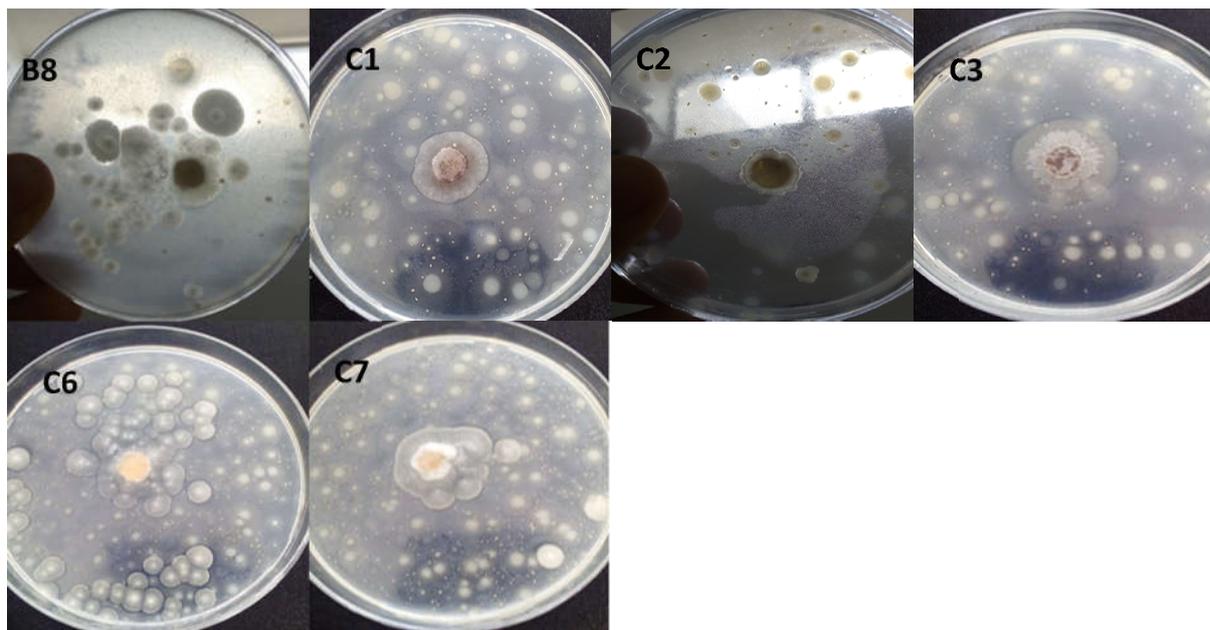
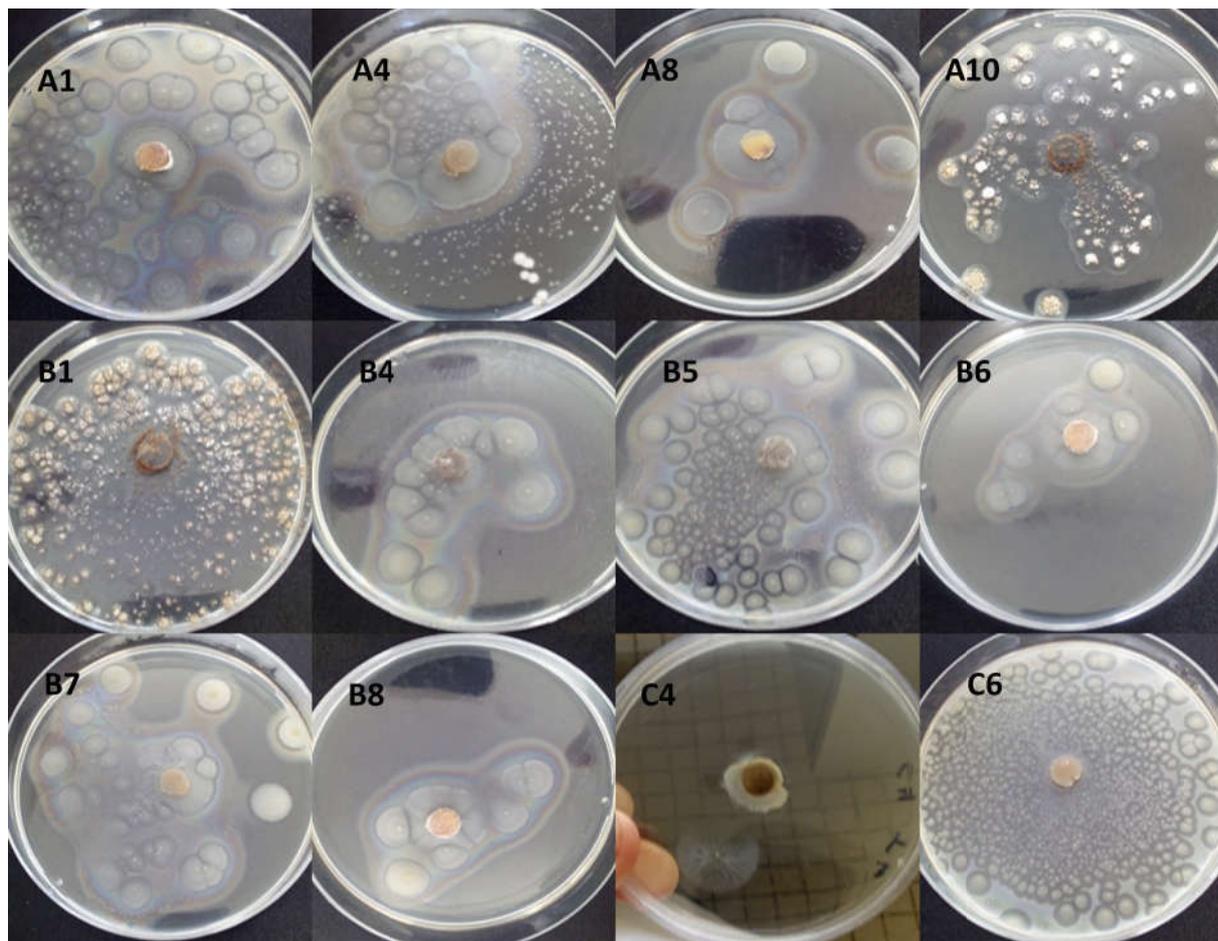


Figure 15 Résultat de la croissance des souches lipolytiques sur gélose nutritive contenant l'émulsion du jaune d'œuf stérile



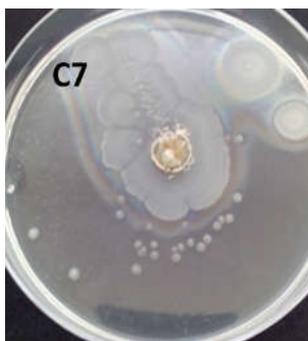


Figure 16 Résultat de la croissance des souches lipolytiques sur milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80

Conclusion

5- Conclusion et Perspectives

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème d'actualité. Dans le cadre de la recherche de l'activité antibactérienne élaborées par les moisissures halophiles isolées à partir de cinq sites différents de Sebkhâ Ezzmoul d'Ain-milila vis-à-vis de quatre souches bactériennes ; deux à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) et deux à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

Pour l'identification des moisissures halophiles isolées, une étude macroscopique réalisée sur milieu PDA et une étude microscopique est effectuée, cette dernière a permis de déterminer les genres : 11 *Aspergillus*, 1 *Penicillium*, 3 *Paecilomyces*, 1 *Geotrichum*, 2 *Colletotrichum*, et 1 *Humicola*.

Par ailleurs, l'étude de la tolérance des moisissures, à différentes concentrations de Na Cl a montré sa capacité à se développer sur des milieux de cultures contenant des concentrations élevées 5%, 10% et 20%.

L'étude de l'activité antibactérienne de ces souches fongiques sur des bactéries test a révélé leur pouvoir à développer un effet antibactérien variable mais effectif sur les quatre bactéries testées; *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Cette contribution à l'étude du potentiel biotechnologique concernant la production des activités antibactériennes élaborées par cette souche peut être complétée par des études supplémentaires.

Sur le plan de la production d'enzymes, il est intéressant de signaler que parmi les moisissures sélectionnées, plus que la moitié des souches possèdent des activités hydrolytiques combinées, d'où leur importance biotechnologique.

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

L'objectif de ce travail a été en grande partie atteint, bien que certains paramètres ou certaines techniques prévues à effectuer n'aient pas pu être réalisées en raison de non disponibilité de matériels et de moyens.

Nous comptons identifier complètement les 19 souches sélectionnées par études macroscopiques complète et microscopiques et moléculaire, pour confirmer qu'elles appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Paecilomyces*, *Geotrichum*, *Colletotrichum* et *Humicola*.

Nous comptons aussi 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.

En plus, vu l'importance des souches sur le plan de la production d'enzymes extracellulaires et qui ont peut-être un potentiel biotechnologique, la purification de ces enzymes constitue une autre excellente perspective.

*Références
bibliographiques*

6- Références bibliographiques

- (Anonyme 2, 2004). Caractérisation moléculaire des *Escherichia coli* O111 et diversité des souches isolées en France. Unité Biodiversité Bactéries Pathogènes Emergentes, 1p.
- Al-Doory, Y and Domson, JF. (1984). Mould allergy. Lea & Febiger.
- Al-Doory, Y and Domson, JF. (1984). Mould allergy. Lea & Febiger.
- Antón J., Rossello-Mora R., Rodriguez-Valera F., Amann R. (2000). Extremely halophilic Bacteria in crystallizer ponds from solar salterns. *Appl Environ Microbiol* 66 (7): 3052–3057.
- Antunes A., Rayney F.A., Wanner G., Taborda M., Pätzold J., Nobre M.F., da Costa M., Huber R. (2008). A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a brinefilled deep of the Red Sea. *J Bacteriol* 190: 3580–3587.
- Aubert G. (1975). Les sols sodiques en Afrique du Nord. *Annales de l'Institut National Agronomique. Alger, Algérie VI*: 185-195.
- Avril J.L., Denis F., Dabernat H., Monteil H. (2000). Bacteriologie clinique. 2^{ème} édition Marketing, paris. Pages 148-280.
- Ayad, k.(2011). Screening d'activités hydrolytiques extracellulaires chez des microorganismes halophiles aérobie isolés d'environnements hypersalins de l'Est algérien. mémoire de magister en sciences alimentaires, Biotechnologie Alimentaire : Université Mantouri-Constantine. Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaires (I.N.A.T.A.A), 9 p.
- Berche p, Gaillard J, Simonet M (1989). Les bactéries des infection humaines .1 : 100-101-102- 123-236-274.
- BERTRAND H, PLASSARD C, PINOCHET X, TOURAINE B, NORMAND P, CLEYET-MAREL JC (2000). Stimulation of the ionic-transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). *Can J Microbiol*, 46 : 229-36.
- Boiron P. (1996). Organisation et biologie des champignons. Nathan. Paris. 29-36, 80.
- Bonfante, 2001. At the Interface Between Mycorrhizal Fungi and Plants: the Structural Organization of Cell Wall, Plasma Membrane and Cytoskeleton. *The Mycota*. 9: 45-61

- **Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.-J., Vayssier Y and Veau P. (1990).** Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle, (edn) Masson, Paris.
- **BOUCHET, P ; GUIGNARD, J-L ; POUCHUS, Y-F ; VILLARS, J.** *les champignons, mycologie fondamentale et appliquée.* Paris : Masson, 2005. ISBN : 2-294-02116-9.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1996).** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Tome 1. Lavoisier. Paris.
- **Boutaiba S., Hacene H., Bidle K.A., Maupin-Furlow J.A. (2011).** Microbial diversity of the hypersaline Sidi Ameer and Himalatt Salt Lakes of the Algerian Sahara. *J Arid Environ* 75: 909-916.
- **BPC Inspection.** (2008). Glossary : common bacteria and molds found in houses and buildings. Site de BPC Inspection . 4-28-2008.
- **Buchalo, A. S., Nevo, E., Wasser, S. P., Oren, A. & Molitoris, H. P. (1998).** Fungal life in the extremely hypersaline water of the Dead Sea: first records. *FEMS Microbiol Ecol* 265, 1461-1465.
- **Burge, H. A. (2001).** Fungi: toxic killers or unavoidable nuisances? *Ann Allergy Asthma Immunol.* 87[6 Suppl 3], 52-56.
- **Cantrell S.A., Casillas-Martinez L., Molina M. (2006).** Characterization of fungi from
- **Carip, C.(2008).** Microbiologie hygiène, bases microbiologiques de la diététique. Paris : Edition Médicales Inter Nationales, ISBN : 978-2-7430-1010-2, p 64.
- **Centre de recherche sur la conservation des documents graphiques.** (2007). Moisissures et biens culturels. Ministère de la culture et de la Communication, France.
- **CHABASSE, D., 2002.** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.
- **Cheverry.c., 1994 :** Plant behaviour in saline environment. Action eau N°, séance spécialisée du 22 mars 1995 ; ed .acad .agro, paris, France , 49 p.de L'ACAD D'ARGRIC De France. Action n°. Revu. Bimestrielle ; 1995 ; 81(2) : 42-46.
- **Claeson, A. S., Levin, J. O., Blomquist, G., and Sunesson, A. L. (2002).** Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *J Environ Monit.* 4[5], 667-672.

- **Claeson, A. S., Levin, J. O., Blomquist, G., and Sunesson, A. L.** (2002). Volatile metabolites from microorganisms grown on humid building materials and synthetic media. *J Environ Monit.* 4[5], 667-672.
- **Claeson, A. S., Sandstrom, M., and Sunesson, A. L.** (2007). Volatile organic compounds (VOCs) emitted from materials collected from buildings affected by microorganisms. *J Environ Monit.* 9[3], 240-245.
- **Das-Sarma S., Arora P.** (2001). Halophiles, encyclopedia of life sciences. *Nat. Publ. Group.* 8: 458-466.
- **DasSarma, S.** (2001). Halophiles. *Encyclopedia of Life Sciences:* 1-9.
- **David B. Adimpong , Kim I. Sørensen , Thorsen ligne , Birgitte Stuer-Lauridsen , Warda S. Abdelgadir , Dennis S. Nielsen , Patrick MF DERKX et Lene Jespersen.** (2012). Susceptibilité antimicrobienne de Bacillus souches isolées à partir Entrées primaires pour l' Afrique La production de pain traditionnel et caractérisation de la bacitracine Operon et Bacitracine biosynthèse. 78 no : 22, 7903-7914.
- **de Hoog, G. S., J. Guarro, J. Gene, and M. J. Figueras.** 2000. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands.
- **De Vos P., Garrity G. M., Jones D., Krieg N. R., Ludwig W., Rainey F. A., Schleifer K. H. and Whitman W. B.** (2009). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., The *Firmicute*. Springer. New York. Volume 3. 63-67.
- **Delarras, C.** (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire, d'analyse ou de contrôle sanitaire. paris : Editions TEC & DOC, ISBN : 978-2-7430-0945-8 p 165.
- **Dieuleveux V & Gueguen M** (1998) Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocyto*.
- **Dieuleveux V, Lemarinier S & Gueguen M** (1998a) Antimicrobial spectrum and target site of -3-phenyllactic acid. *Int J Food Microbiol* 40: 177–183.genes in TSB-YE medium, milk, and cheese. *J Food Prot* 61: 1281–1285
- **Dieuleveux V, Van Der Pyl D, Chataud J & Gueguen M** (1998b) Purification and characterization of anti-listeria compounds produced by *Geotrichum candidum*. *Appl Environ Microbiol* 64: 800–803.
- **Duce R. G. & Thomas S. B.** (1959). The microbiological examination of Butter. *J. Appl.*

- **Duchauffour.p.,1983-** Pédologie 1 :pédologie et classification , ED MASSON .pp,468-470.Estimating data quality. Near Surface Geophysics.2005,3,187-194.
- **Duchauffour P. (2001).** *Introduction à la science du sol : sol, végétation, environnement.* 6ème édition. Dunod. p 331.
- **Dudal R. (1990).** An international Reference Base for soil classification (IRU). In: Transaction of the 14th international Congress of Soil Science, pp. 38-42. Kyoto, Japan.
- **Dumitrescu O, Dauwalder O, Boisset S, Reverdy M-É, Tristan A, Vandenesch F. (2010).** Résistance aux antibiotiques chez *Staphylococcus aureus* : Les points-clés en 2010. médecine/sciences ; 26: 943–9.
- **Edgerton, M. E. & Brimblecome, P. (1981).** Thermodynamics of halobacterial
- **Fog, Nielsen K. (2003).** Mycotoxin production by indoor molds. Fungal.Genet.Biol. 39[2], 103-117.
- **Foundation for Allergy Research in Europe. (1984).** Atlas of moulds in Europe causing respiratory allergy. Knud Wilken-Jensen et Suzanne Gravesen. -110. Danemark, ASK Publishing.
- **Frazier W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- **FRISVAD, Jens- C.** Halotolerant and halophilic fungi and their extralite production.
- **Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blocker H., Hofle G and Muller R. (2002).** The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor.
- **Garba, S. A. (2012).** Caractérisation phénotypique et génétique des *Escherichia coli* isolés des cas d colibacilloses aviaires au senegal. Thèse de doctorat : en médecine vétérinaire. Dakar : Université cheikh anta diop, 22-34p.
- **Gasmi a., 1989 :** Amélioration des propriétés physiques des sols par l'action combinée de la paille de blé et du phosphogène. Mémoire d'ing agro , Université de Tiaret
- **Gerday C., Glansdorff N. (2007).** Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM press, Washington, DC. P. 450.
- **Gerday C., Glansdorff N. (2007).** Physiology and biochemistry of extremophiles. ASM.
- **Giraud J.(1998).**Microbiologie alimentaire .p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris.
- **Errakhi R., Bouteau F., Lebrihi A and Barakate M. (2007).** Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping

- off disease in sugar beet (*Beta 1608 Afr. J. Microbiol. Res. vulgaris L.*). *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1503–1509.
- **Grant W.D. (2004).** Life at low water activity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359.
 - **Grosjean J., Clavé D., Archambaud M., Pasquier C. (2011).** Bactériologie et virologie pratique. Paris : 2^e édition révisée, isbn 978-2-8041-6398-3 p 73-77 166-169.
 - **Guiraud J.P. (1998).** Microbiologie alimentaire, (edn) Dunod. Paris.
 - **Gunde-Cimerman N., Zalar P., de Hoog S., Plemenitaš A. (2000).** Hypersaline waters in salterns e natural ecological niches for halophilic black yeasts. *FEMS Microbiol Ecol* 32: 235–240.
 - **Guo Z, She Z, Shao C, Wen L, Liu F, Zheng Z, Lin Y.** ¹H and ¹³C NMR signal assignments of paecilin A and B, two new chromone derivatives from mangrove endophytic fungus *Paecilomyces* sp. (tree 1-7). *Magnetic Resonance Chem*, 2007; 45:777-780
 - **Gupta, R., N. Gupta et P. Rathi.** 2004. Bacterial lipases : an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biothechnology*. Vol. 64, no. 6, p. 763-781.
 - **Halewyn M. A., Lercterc J. M., King N., Belonger M., Legris M. and Frenett Y. 2001.** Les risqué à la santé associés à la presence de moisissure en milieu intérieur (edn)
 - **Hamdy A., 1999.** Saline irrigation assessment for a sustainable use. Saline irrigation. Halophyte production and utilization; *Project N°IC 18 CT 960055*, p.15226.
 - **Hartmann, R., Sikinger, H.-D. & Oesterheld, D. (1980).** Anaerobic growth of halobacteria. *Proc Natl Sci USA* 77, 3821-3825.
 - **Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, et al., 2007.** A higherlevel phylogenetic.
 - **HINSINGER P (1998).** How do plant roots acquire mineral nutrients ? Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy*, 64 : 225-65.
 - **Honrubia M. 2009.** Las micorrizas: una relación planta-hongo que dura más de 400 millones de años. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*. 66S1: 133-144.
 - **INSID : Institut National des Sols, de l'Irrigation et du Drainage (2008).** Sols salins en Algérie. Pp. 1-6.

- **Isaka M, Palasan S, Lapanun S, Sriklung K. Paecilodepsipeptide A**, an antimalarial and antitumor cyclohexadepsipeptide from the insect pathogenic fungus *Paecilomyces cinnamomeus* BCC9616. *J Nat Prod*, 2007; 70:675-678.
- **Kamekura, M. (1998)**. Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2, 289-295.
- **Kaurichev, I. S. (1980)**. *Praticas de Edofologia*. Mir Publishers, Moscow.
- **Kenfaoui a, 1997**. La salinité des eaux d'irrigation .synthèse bibliographique réalisée par les élèves ingénieurs de l'Ecole Nationale du Génie Rural , des eaux et des Forêts de Montpellier . Kenfaoui @engref.fr.
- **Kharroub K. (2007)**. Identification et étude moléculaire des bactéries et des archéobactéries aérobies halophiles de la sebkha Ezzemoul (Ain M'Lila). Thèse de doctorat, Université Mentouri-Constantine. P. 194.
- **LAMBERS H, SCHEURWATER I, ATKIN OK (1996)**. Respiratory patterns in roots in relation to their functioning. In : WAISEL Y, ESHEL A, KAFKAFI U, eds. *Plant roots. The hidden half*. 2nd Ed. New York : Marcel Dekker Inc. : 529-56.
- **Lang G, Blunt JW, Cummings NJ, Cole ALJ, Munro MHG**. Paecilosetin, a new bioactive fungal metabolite from a New Zealand isolate of *Paecilomyces farinosus*. *J Nat Prod*, 2005; 68:810-811
- **Lanier L., Joly P., Bondoux P., Bellemère A. (1978)**. *Mycologie et pathologie forestière, mycologie forestière*. Tome 1. Masson. Paris : 09-18.
- **Larone, D H. (1987)**. *Medically important fungi. A guide to identification*. 2nd edition, - 230 p. New York - Amsterdam - London, Elsevier Science Publishing Co., Inc.
- **Larpent J.P. (1997)**. *Microbiologie alimentaire, techniques de laboratoires*. Lavoisier.
- **Larry M, Buch, MD**, Affiliate Professor of Cliniral Biomedical Science, Chareles E, Schnude College of Medcines, Flurida Atlantse Eniversites ; Affiliate Associale Professor of Medicine, University of Miami-Miller School of Medicine.
- **Levine, M. (1987)**. *Escherichia coli* that cause diarrhea : enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *Journal of infectious Diseases* 155:377-389.

- **Linderman RG.** 1988. Mycorrhizal Interaction with the Rhizosphere Microflora :The Mycorrhizosphere Effect. *Phytopathology* 78: 366-371.
- **Litchfield C.D., Gillevet P.M. (2002).** Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *J Ind Microbiol & Biotechnol* 28 (1): 48-55.
- **Litchfield, C. D. (1998).** Survival strategies for microorganisms in hypersaline environments and their relevance to life on early Mars. *Meteoritics & Planetary Science* 33, 813-819.
- **Liu J, Li F, Kim EL, Li JL, Hong J, Bae KS, Chung HY, Kim HS, Jung JH.** Antibacterial Polyketides from the Jellyfish-Derived Fungus *Paecilomyces variotii*. *J Nat Prod*, 2011; 74: 1826–1829.
- **Liu J, Li F, Lee Y-M, Li JL, Hong J-K, Yoon W-D, Kim E-K, Jung J-H.** An anacardic acid analog from the jellyfish-derived fungus *Paecilomyces variotii*. *J Nat Prod*, 2012; 18: 8-12.
- **Lozniewskai A., Rabaud N. (2010).** résistance bactérienne aux antibiotiques.[en ligne].
- **MacDonald I.R., Reilly II J.F., Guinasso N.L. Jr et al. (1990).** Chemosynthetic mussels at a brine-filled pockmark in the northern Gulf of Mexico. *Science* 248: 1096–1099.
- **Madigan M.T., Martinko J.M. (2006).** Brock Biology of Microorganisms, 11th edition. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. Pp. 1012.
- **Mancinelli R.L., Hochstein L.I. (1986).** The occurrence of denitrification in extremely.
- **McGenity T.J., Gemmell R.T., Grant W.D., Stan-Lotter H. (2000).** Origins of halophilic microorganisms in ancient salt deposits. *Environ Microbiol* 2: 243-250.
- **Michel. CG et al., 2005 :** Sols et environnement Dunod, Paris, Pp : 609 ;612 ;620.
- **Mioso R, Marante FJT, Bravo de Laguna IH.** The Chemical Diversity of the Ascomycete Fungus *Paecilomyces variotii*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2015; 177(4): 781-791.
- **Moroh, J. L. A. (2013).** Résistance bactérienne et phytomolécules antimicrobiennes issues de Morindamorindoides (Doctoral dissertation, Brest).
- **MUNNS.R., JAMES.R.A.,LAUCHLI.R.,2006 :** approches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals . *Jouenal of Experimental Botany* :57(5) :1025-1043.

- **Nauciel C. (2005)**. ABREGES connaissances et pratique « Bactériologie médicale ». 2^{ème} édition. MASSON, Paris : 83- 85.
- **Ohhira I, Kuwaki S, Morita H, Suzuki T, Tomita S, Hisamatsu S, Sonoki S & Shinoda S (2004)** Identification of 3- phenyllactic acid as a possible antibacterial substance produced by *Enterococcus faecalis* TH10. *Biocontrol Sci Tech* 9: 77–81.
- **Oren A. (1999)**. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 334-348.
- **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* .
- **Oren A. (2011)**. Diversity of halophiles, In: Horikoshi K. (ed.), *Extremophiles Handbook*, Springer: 1-1248.
- **Oren, A. (2002a)**. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny,
- **Oren, A. (2002b)**. Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiol* 39, 1-7.
- **PASQUALOTTO, Alessandro - C.** Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology* : SI-S10. iFirst article, 2008.
- **Paul singleton 1999** ; Bactériologie, 4^{ème} édition, Dunod, Paris.
- **Peterson L, Massicotte H, Melville L.** 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Ottawa, CA: NRC Research Press.
- **PFOHL- LESZKOWICZ, A.** *Les mycotoxines dans l'alimentation, évaluation et gestion du risque*. Paris : Edition Technique & Documentation, 1999. ISBN : 2-7430-0293 X
- **Pieckova, E. and Jesenska, Z.** (1999). Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann Agric Environ Med.* 6[1], 1-11.
- **Pieckova, E. and Wilkins, K.** (2004). Airway toxicity of house dust and its fungal composition. *Ann Agric. Environ Med.* 11[1], 67-73.
- **Pitt J.I., Hoeking A.D. (2009)**. *Fungi and food spoilage*. Springer. New York.
- **Pitt, J. I., Basilio, J. C., Abarca, M. L., and Lopez, C.** (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Med Mycol.* 38 Suppl 1:41-6., 41-46.

- **Pivato, B., Offre, P., Marchelli, S., Barbonaglia, B., Mougel, C., Lemanceau, P. & Berta, G. (2009)** Bacterial effects on arbuscular mycorrhizal fungi and mycorrhiza development as influenced by the bacteria, fungi, and host plant. *Mycorrhiza*, 19, 81-90.
- **Pochon J., Tardieux P. (1962)**. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la
- **Pohl, P. (1993)**. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli*, histoire et classification. *Annales de médecine vétérinaire* 137:325-333.
- **Poitevin B., Anras L., Blachier P., Hussenot J., Lagardère J-P., Lapouyade P., Massé J., Rigaud C. (2004)**. Les marais salés atlantiques, mieux connaitre pour mieux gérer. *Cahier technique*: 1-76.
- **Poole k. (2004)**. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria . *Clinical*.
- **Porcel R, Aroca R, Ruiz-Lozano JM. 2011**. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 32:181–200
- **PRESCOTT, L-M ; HARLEY, J-P ; KLEIN, D-A. Microbiologie**. Bruxelles : de boeck, 2007. 2^{ième} édition. ISBN : 978-2-8041-4256-8
- **Prescott., Harly and Kelin. (2010)**. *Microbiologie*, (2th edn) De Boeck-wesmael. Bruxelles.
- **Ramoul, A. (2013)**. Sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire des bactéries.
- **Raper, k ; Fennell, d-j. the genus aspergillus**. baltimore: williams and wilkins.
- **Rodriguez-Valera, F. (1993)**. Introduction to Saline Environments. In *The Biology of Halophilic Bacteria*. Eds. R. H. Vreeland & L. I. Hochstein. pp.1-23.
- **Rogers ,M.E., A.D. Craig, R. Munns, T.D. Colmer, P.G.H. Nichols, C.V. Malcolm, E.G. Barrett-Lennard, A.J. Brown, W.S. Semple, P.M. Evans, K. Cowley, S.J. Hughes, R. Snowball, S.J. Bennett, G.C. Sweeney, B.S. Dear et M.A. Ewing (2005)** .The potential for developing fodder plants for the salt-affected areas of southern and eastern Australia: An overview. *Aust J. Exp. Agr.* 45:301–329.
- **Rohban R., Amoozegar M.A., Ventosa A. (2009)**. Screening and isolation of halophilic bacteria producing extracellular hydrolyses from Howz Soltan Lake, Iran. *Ind Microbiol Biotechnol* 36: 333-340.
- **Roquebert M.F. (2002)**. *Les contaminants biologiques des biens culturels*. Paris.
- **ROQUEBERT, Marie- France. Les contaminants biologiques des biens culturels**. Paris : Elsevier, 2002. ISBN : 2-8499-323-5
- **Roussel E.G., Cambon Bonavita M-A., Querellou J., Cragg B.A., Webster G., Prieur D., Parkes R.G. (2008)**. Extending the subsea-floor biosphere. *Science* 320 (5879): 1046.

- **Samson, R. A. and Pitt, J. I.** (1992). Modern concepts in *Penicillium* and *Aspergillus* classification. *Mycologia* 84[6], 946-947.
- **Samson, RA, Hoekstra, ES, and et al.** (1984). Introduction to food and airborne fungi. 6th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- **Samson, RA, Hoekstra, ES, and Frisvad, JC.** (2004). Introduction to food and airborne fungi. 7th, -389 p. Baarn, Centralalbureau voor Schimmellcultures, Institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences.
- **Sapin J.** (2009). L'archéologie de la mer Morte, géographie et climat de la mer Morte. *Revue d'archéologie et d'histoire*: 1-63.
- **Sierra G.** 1957. A Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 23:15-22.
- **Smith N. R., Gordon R. E. & Clark F.E.** (1952). Aerobic spores-forming bacteria. *J. Appl. Bact.* 27: 78-99.
- **Souna D.** (2011). Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries au niveau du C.H.U sidi Bel Abbes. Mémoire. Université Abou Bekr Belkaid. 104 P.
- **Storey, E, Dangman, K H, Schenck, P, DeBernardo, R L, Yang, C S, Bracker, A, and Hodgson, M J.** (2004). Guidance for clinicians on the recognition and management of health effects related to mold exposure and moisture indoors. -58 p. Farmington, Center for Indoor Environment and Health, University of Connecticut Health Center.
- **Strobel GA, Dirksie E, Sears J, Markworth C.** Volatile antimicrobials from *Muscodoralbus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 2001,147: 2943–2950.
- **Subramanian, C. V.** (1983). *Hyphomycetes : Taxonomy and Biology*. Academic Press Inc. 342-355.
- **Sutton, D. A., A. W. Fothergill, and M. G. Rinaldi (ed.).** 1998. *Guide to Clinically Significant Fungi*, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.
- **Szabolcs I.** (1989). Salt Affected Soils. *CRC Press, nonda, USA*. P. 274.
- **Szabolcs I.** (1989). *Salt-affected soils*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 274 p.

- **Tabata, N.; Suzumura, Y.; Tomoda, H.; Masuma, R.; Haneda, K.; Kishi, M.; Iwai, Y.; Omura, S.** Xanthoquinodins, new anticoccidial agents produced by *Humicola* sp. Production, isolation and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)* 1993, 46, 749–755.
- **TABUC, C.** *Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines*. Toulouse : Institut national polytechnique de Toulouse et de l'université de Bucarest, 2007.
- **Texas Tech University and Health Sciences Center.** (2006). Fungal glossary with abstracts. Department of Microbiology and Immunology. <http://www.ttuhs.edu/> ([lien externe s'ouvrant dans une nouvelle fenêtre](#)) . Texas Tech University Health Sciences Center. 12-12-0006.
- **Tindall B. J. (1992).** The family *Halobacteriaceae*. In *The Prokaryotes*. Eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer. pp. 768-808. Springer, New York, N. Y.
- **Tortora J., Funk B.F. and Case Ch.I. (2003).** Introduction à la microbiologie.
- **Tournas V.H., Katsoudas E. (2005).** Mould and yeast flora in fresh berries.
- **Turner W.B. (1971).** *Fungal Metabolites*. Academic Press, London.
- **Ui H, Shiomi K, Suzuki H, Hatano H, Morimoto H, Yamaguchi Y, Masuma R, Sakamoto K, Kita K, Miyoshi H, Tomoda H, Tanaka H, Omura S.** Paecilaminol, a new NADH-fumarate reductase inhibitor produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. *J Antibiotics*, 2006; 59:591-596.
- **Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998).** Biology of aerobic moderately halophilic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 504–544.
- **Vidic, J. (2013).** Nanoparticules pour des applications antibactériennes.
- **Whipps, J.M. (2004)** Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root.
- **Yachai M. (2009).** Carotenoid production by halophilic Archaea and its applications. Thesis of Doctorat, university Prince of Songkla. P. 173.
- **Youcef, A.(2014).** Etude de l'Activité anti –*Candida albicans* des microorganismes isolés à partir du sol des zones arides. thèse de doctorat : Biothecnologie, Biologie et Environnement/Option : Bioprocédés et Biotchnologie, Applications Mycologique : Université Constantine 1, 38p.

- **Yu H, Zhang L, Li L, Zheng C, Guo L, Li W, et al.** Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiol Res.*, 2010,165(6):437-49.

- **Zahar J. P., Moumile K. (2007).** Escherichia coli, définition, épidémiologie des résistances. Service de microbiologie hygiène, CHU de Necker Enfants malades.

(1995). The taxonomic statut of the fermentative halophilic anaerobic bacteria. *Anaerobe* 1, 185-189.

Brechot V.R. (2007). La vie dans les milieux extrêmes, conférence: 1-8.

- **Cazorla F.M., Kuipers O.P., Paquot M., Pérez-García A. (2007).** The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward.

-**Chew, G. L., Wilson, J., Rabito, F. A., Grimsley, F., Iqbal, S., Reponen, T., Muilenberg, M. L., Thorne, P. S., Dearborn, D. G., and Morley, R. L. (2006).** Mold and endotoxin levels in the aftermath of Hurricane Katrina: a pilot project of homes in New Orleans undergoing renovation. *Environ Health Perspect.* 114[12], 1883-1889.

-**Gaitatzis N., Silakowski B., Kunze B., Nordsiek G., Blocker H., Hofle G and Muller R. (2002).** The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. identification. Academic press. London. P.111

-**Krska, R., Schubert-Ullrich, P., Molinelli, A., Sulyok, M., MacDonald, S., and Crews, C. (2008).** Mycotoxin analysis: an update. *Food Addit.Contam Part A Chem.Anal.Control Expo.Risk Assess.* 25[2], 152-163.

M.S., Huber R. (2009). A new lineage of halophilic, wall-less, contractile bacteria from a méthodes.Doin. Paris.

Nicolson D.H., Prado J., Silva P.C., Skog J.E., Wiersema J.H & Turland N.J. (2006).

P.,Vandeviken J., et Viseur J. (1993). Traité de pathologie végétale. Gembloux.Belgique. Paris. 397- 400.

-**Patterson, T. F., McGinnis, M. R., and ed. (2009).** The fungi :description. Site Doctor Fungus . Mycoses Study Group.

-**Rundberget, T., Skaar, I., and Flaoyen, A.** (2004). The presence of Penicillium and Penicillium mycotoxins in food wastes. Int J Food Microbiol. 90[2], 181-188.

-**Smith SE, Read DJ.** 2008. Mycorrhizal symbiosis. Cambridge, UK: Academic Press.

-**Sunesson, A. L., Nilsson, C. A., Andersson, B., and Blomquist, G.** (1996). Volatile metabolites produced by two fungal species cultivated on building materials. Ann Occup.Hyg. 40[4], 397-410.

Site :

- <http://drfungus.org/Knowledge-base/geotrichum-species/>

- <https://Wiki.bugwood.org/Colletotrichum-gloeosporioides>

- Mycosesstudygroup.org/thefungi/Peacilomyces.htm

Annexe

7- Annexes

Annexe1

➤ Composition des milieux de cultures

- **Gélose nutritive**

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

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

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

La préparation du **bouillon nutritif** est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar.

- **Potato dextrose agar (PDA)**

Pomme de terre	250 g
Glucose	20 g
Agar	15 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 l'agar dans 500 ml d'eau distillée.

- Écraser la pomme de terre, filtrer puis ajouter le filtrat à la solution d'agar.

- Ajouter le glucose.

- Compléter le volume à 1000 ml.

- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

- **Milieu Mueller-Hinton (DIFCO Laboratories, 1996)**

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
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5 g
Eau distillée.....	1000ml

pH = 7,3

Annexe 2

➤ Activité enzymatique

- Milieu pour la mise en évidence de l'hydrolyse de tween 80

Extrait de levure	5 g
NaNO ₃	1 g
Solution saline	50 ml
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,1 g
Tween 80	10 ml
Agar	8 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

- Gélose au lait

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.

- **Milieu pour la recherche de la lécithinase (*Egg-yolk agar*)**

Gélose nutritive	90 ml
Emulsion de jaune d'œuf	10 ml

Préparation de l'émulsion de jaune d'œuf

Après avoir flamber la coquille avec de l'alcool pendant 30 secondes, récupérer le jaune d'œuf et additionner 4 fois le volume en eau distillée stérile, mélanger rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C et ensuite au réfrigérateur pendant 24 heures.

N. B. Au moment de l'utilisation, mettre la gélose nutritive en surfusion (45°C) et ajouter l'émulsion de jaune d'œuf, après séchage le milieu est ensemencé.

Annexe 3

➤ **Solutions**

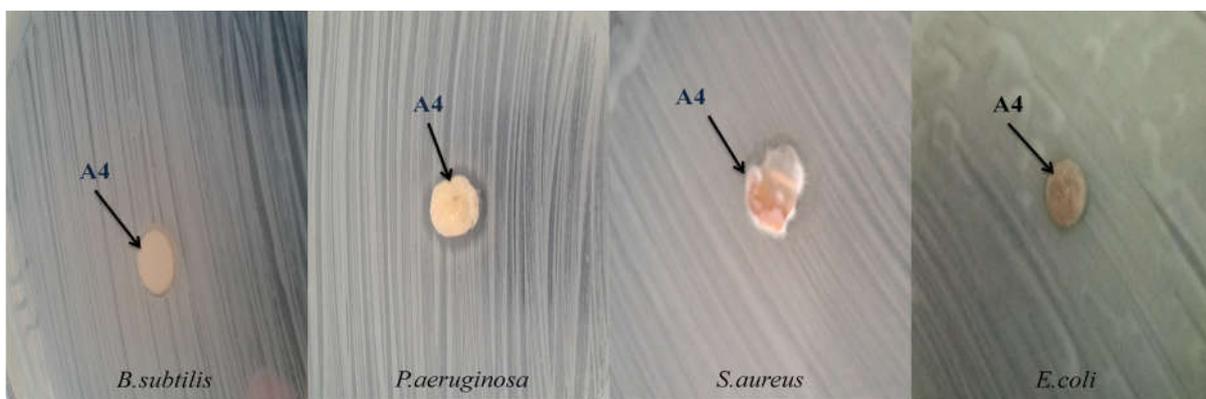
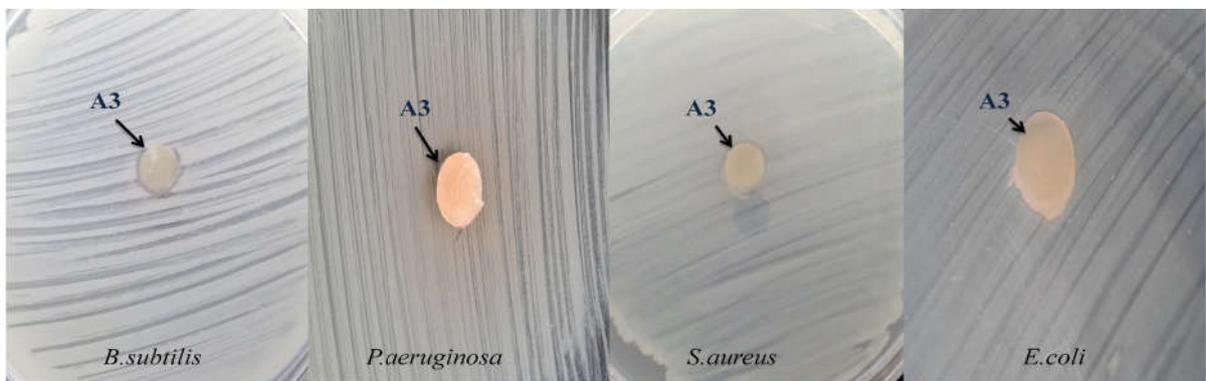
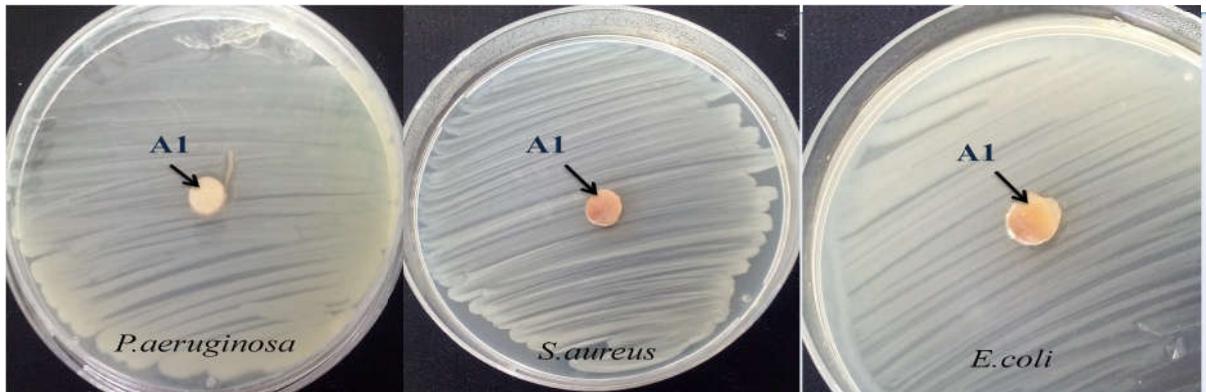
- **Eau physiologique**

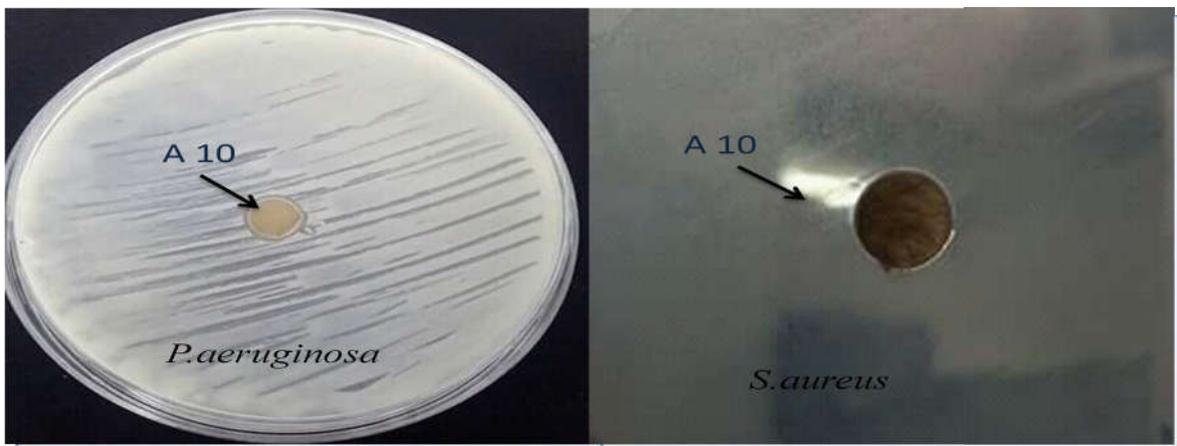
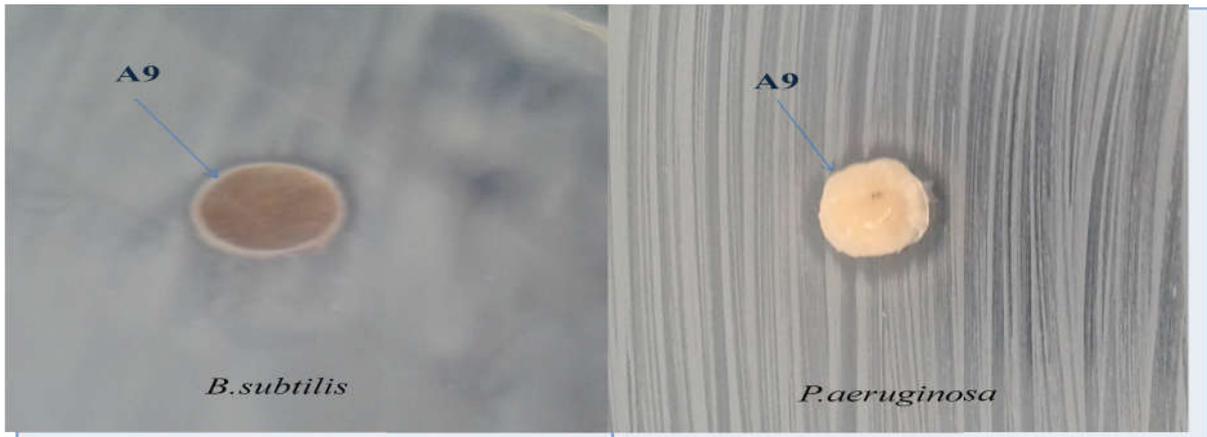
Eau distillée	1000ml
Chlorure de sodium (Na Cl)	9g

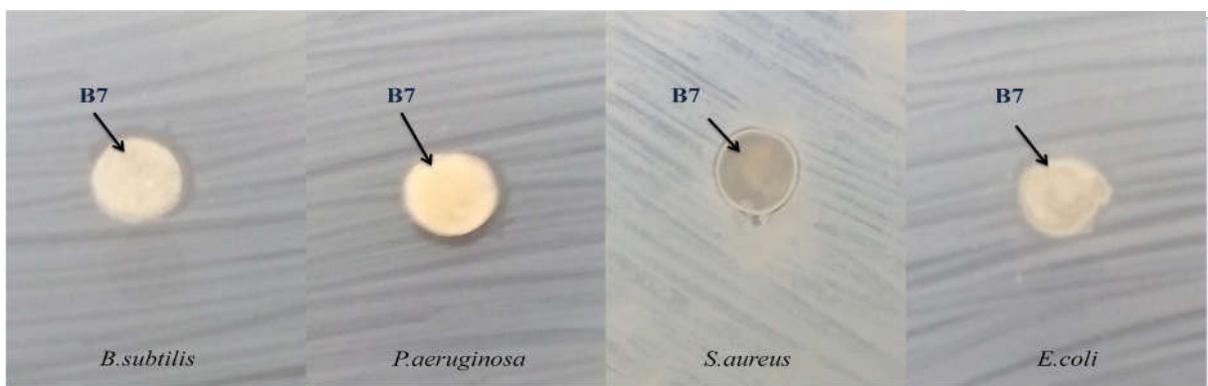
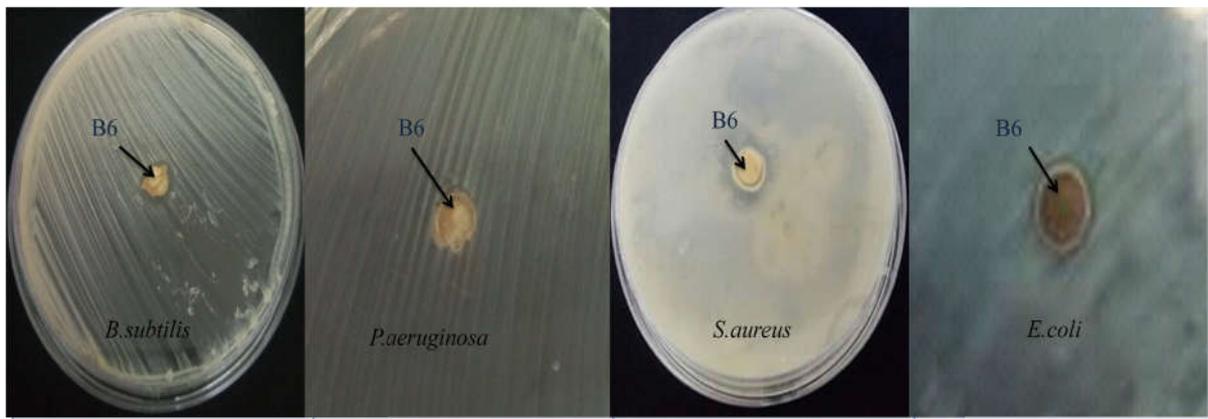
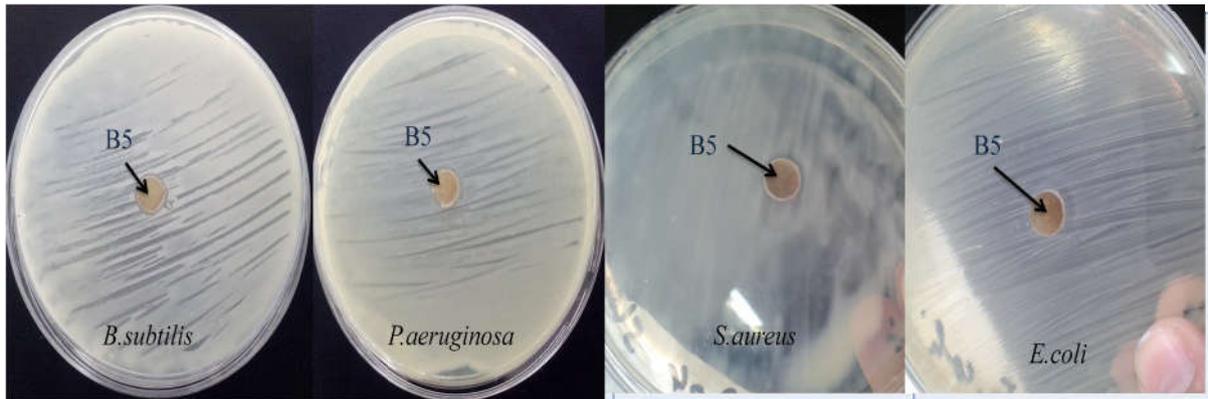
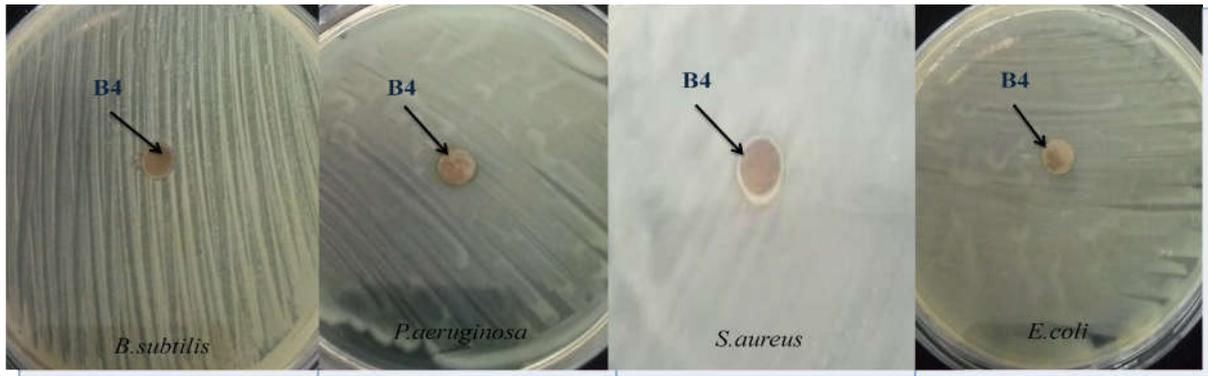
- **Solution saline**

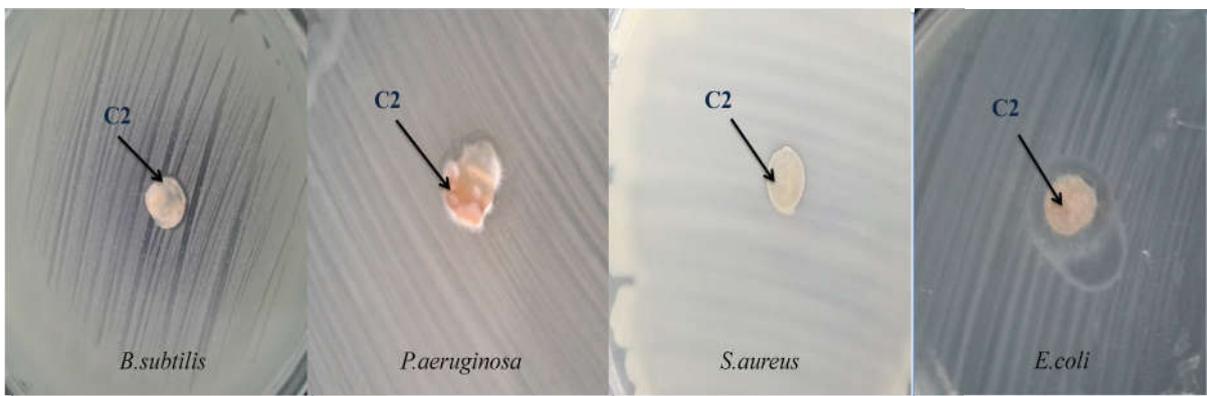
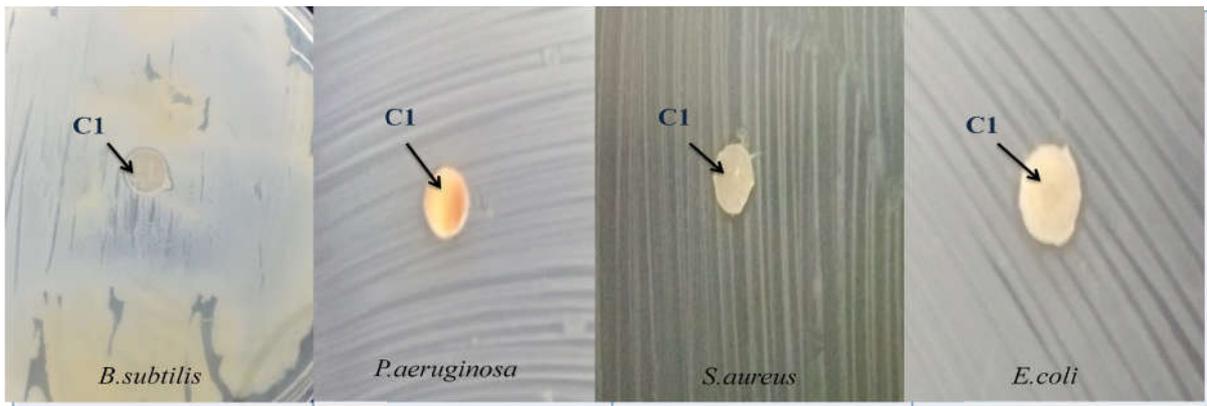
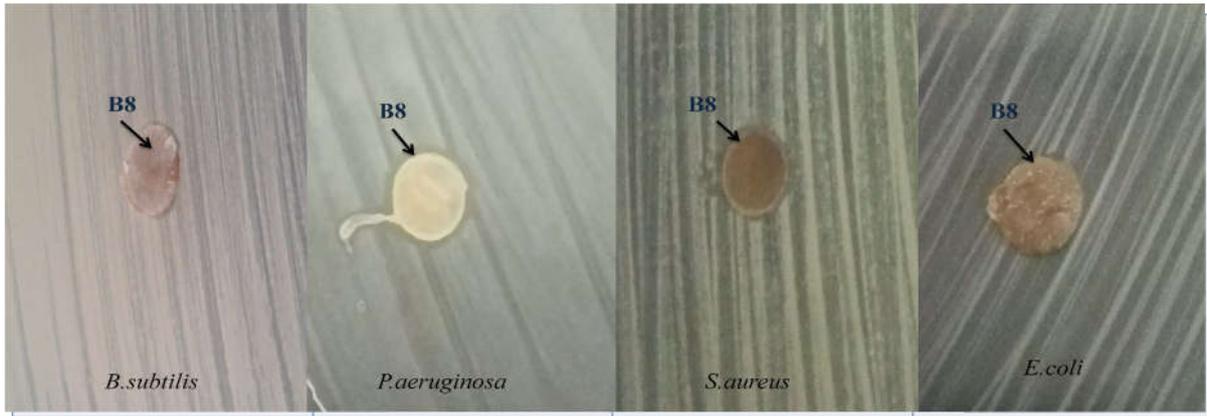
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.64g
FeSO ₄ 7H ₂ O.....	0.11g
MnCL ₂ 4H ₂ O.....	0.79g
ZnSO ₄ 7H ₂ O.....	0.15g
Eau distillée.....	100ml

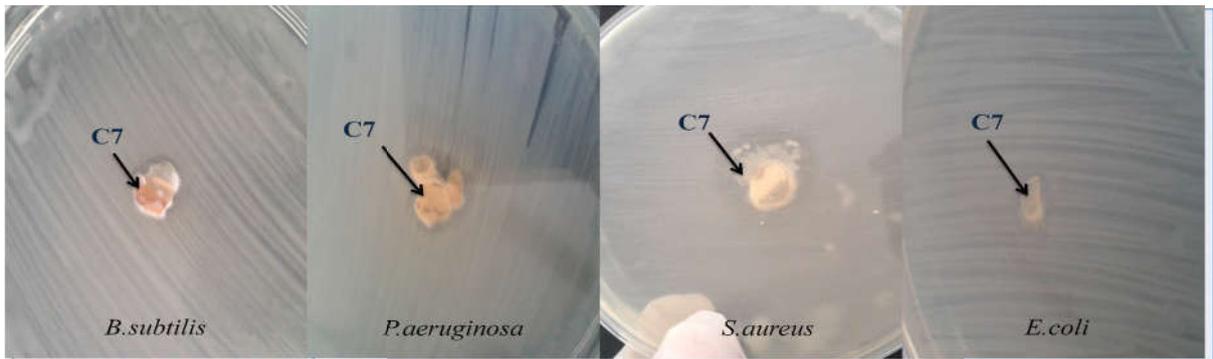
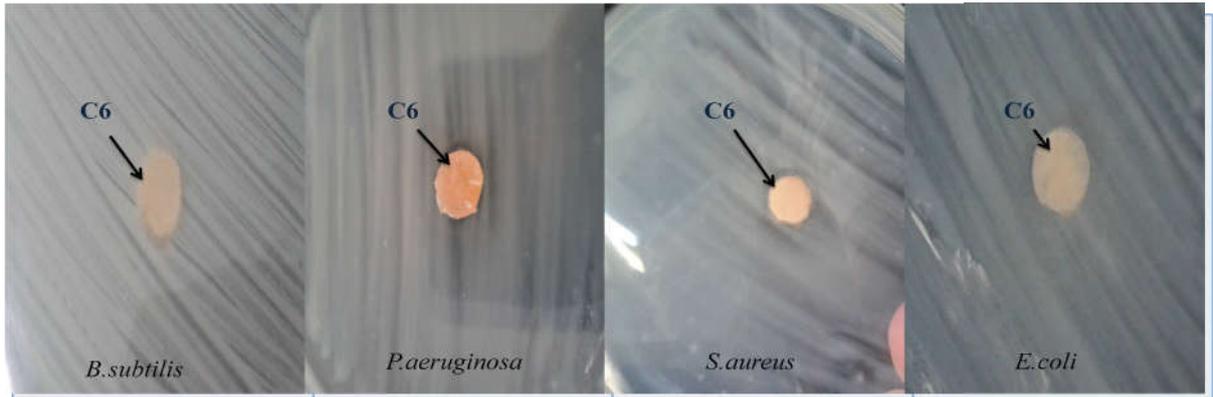
- Différente zone de lyses obtenues par dix neuf souches vis à vis les bactéries testées (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Bacillus subtilis* ATCC 6633)











Résumé

8- Résumé

Ce travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne des moisissures halophiles isolées à partir du milieu salin (Sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila). L'isolement de microorganismes à partir de cinq sites de Sebkha Ezzemoul a permis l'obtention de 42 microorganismes, 13 isolats bactériens et 29 isolats fongiques. Les souches fongiques sélectionnées développent, dans les conditions de culture en milieu PDA, à des concentrations d'Na Cl 5 %, 10% et 20 %. Six moisissures appartenant du genre *Aspergillus*, *paecilomyces*, *penicillium*, *colletotrichum*, *Geotrichum* et *humicola*, sont sélectionnées par la technique de diffusion sur gélose, pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne a été faite vis-à-vis de quatre souches bactériennes; deux à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) et deux à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Les résultats obtenus montrent que les six espèces fongiques présentent une activité plus au moins considérable où les moyennes des zones d'inhibition atteignent 1.65 cm de diamètres. Par ailleurs, les Six souches fongiques sélectionnées sont capables de sécréter des métabolites importants sont les enzymes de protéase et lipase.

Mots clés

Sebkha, Microorganismes halophiles, Bactéries, Activité antibactérienne; activité enzymatique.

Summary

8- Summary

This work intends of studying the antibacterial activity of halophilicfungiisolated from a saline environment (SebkhaEzzemoul of Ain-Mlila). The obtained results of microorganisms' isolation from five SebkhaEzzemoul sites gave 42 microorganisms; 13 bacteria and 29 fungi.

The fungal strains were developedon PDA mediumunder different conditions of culture in whichthe concentrations of NaCl were varied; 5%, 10% and 20%.Six fungal genera; *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Colletotrhicum*, *Geotrichum* and *Humicola* were selected to evaluate their antibacterial activity against four bacterial strains; two Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) and two Gram-bacteria (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) by agar diffusion technique. The obtained results showed that the six fungal genera have a more or less considerable activity in which the averages of the inhibition zones reach 1.65 cm of diameters. In addition, the six selected fungal strains are capable of secreting important metabolites thatare protease and lipase enzymes.

Keywords :

Sebkha, Halophilic microorganisms, Bacteria, Antibacterial activity; enzymatic activity.

8- ملخص

تألف هذا العمل من دراسة النشاط المضاد للبكتيريا للقولب الملحية المعزولة من البيئة المالحة (سبخة زمول عين مليلة). سمح عزل الكائنات الحية الدقيقة انطلاقاً من خمسة مواقع من سبخة الزموول عن ظهور 42 كائن حي. في الواقع ، 13 عزلة بكتيرية و 29 عزلة فطرية. وتنمو السلالات الفطرية المحددة ، في ظل ظروف وسط غذائي PDA ، بتركيز 5 % ، 10 % و 20 % من كلوريد الصوديوم. ستة فطريات ينتمون للجنس *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Humicola* و *Penicillium*, *Colletotrichum* و *Geotrichum* ، تم تحديدها بواسطة تقنية نشر في وسط غذائي للكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا أحرز وجها لوجه مع السلالات البكتيرية الأربعة؛ اثنين صنف موجب (المكورات العنقودية الذهبية ATCC 25923 ، العصوية الرقيقة (ATCC 6633) ، واثنين من صنف سالب (الإشريشيا القولونية ATCC 25922، الزائفة الزنجارية ATCC 9027) تظهر النتائج التي تم الحصول عليها أن الأنواع الفطرية الستة لديها نشاط كبير أو أكثر حيث تصل معدلات التثبيط إلى 1.65 سم من القطر. بالإضافة إلى ذلك ، فإن السلالات الفطرية الستة المختارة قادرة على إفراز الأيض الهامة هي الإنزيمات البروتينية والليباز.

ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ ANTIBACTÉRIENNE DE MOISSURES ISOLÉES À PARTIR DES MILIEUX SALINS

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Mycologie et
Biotechnologie fongique

Ce travail consiste à l'étude de l'activité antibactérienne de moisissures halophiles isolées à partir du milieu salin (Sebkha Ezzemoul d'Ain-Mlila). L'isolement de microorganismes à partir de cinq sites de Sebkha Ezzemoul a permis l'obtention de 42 microorganismes, 13 isolats bactériens et 29 isolats fongiques. Les souches fongiques sélectionnées développent, dans les conditions de culture en milieux PDA, à des concentrations d'Na Cl 5 %, 10% et 20 %. Six moisissures appartenant du genre *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Geotrichum* et *Humicola*, ont été sélectionnées par la technique de diffusion sur gélose, pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne a été faite vis-à-vis de quatre souches bactériennes; deux à coloration Gram + (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633) et deux à coloration Gram - (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027). Les résultats obtenus montrent que les six espèces fongiques présentent une activité plus au moins considérable où les moyennes des zones d'inhibition atteignent 1.65 cm de diamètres. Par ailleurs, les Six souches fongiques sélectionnées sont capables de sécréter des métabolites importants sont les enzymes de protéase et lipase.

Mots clés :

Sebkha, Microorganismes halophiles, Bactéries, Activité antibactérienne; activité enzymatique.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie de l'Activité
Microbienne (LaMyBAM)

Jury d'évaluation :

Présidente : BENSERRADJ Ouafa	(MCB U Mila),
Encadrante: MILLET Asma	(MAB UFM Constantine 1),
Examinatrice : BATAICHE Insaf	(MCB UFM Constantine 1).

Date de soutenance : 27 /06/2016