



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
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم : Microbiologie.....: Département :

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des mycètes

Intitulé :

**Isolement, identification et activité
antibactérienne des moisissures d'un sol forestier
à Constantine**

Présenté et soutenu par : LABIOD Fouzia

Le :17 /06/2015

CHAIBRAS Sara

Jury d'évaluation :

Président du jury : M^r Haddi M.L. (Professeur - UFM Constantine).

Rapporteur : M^{me} Mihoubi I. (Professeur - UFM Constantine).

Examineur : M^{elle} Benserradj Ouafa (Docteur- Centre universitaire de Mila).

Tuteur : M^{me} Ghorri S.

*Année universitaire
2014 - 2015*

REMERCIEMENT



*Avant tout , nous remercions **Allah** le tout miséricordieux l'unique , le puissant, maitre des cieux et de la terre pour nous avoir guidé , protégé , aidé et permis de mener à bien ce travail .*

C'est avec un grand plaisir que nous résevons ces lignes en signe de gratitude et de reconnaissance à ceux qui ont contibué de près ou de loin à lélaboration de ce travail :



*Notre responsable de formation madame **Mihoubi Ilhem** , encadreur de notre mémoire , merci pour son aide , ses conseis, la correction du manuscrit , et pour sa patience , sa confiance , son encouragement , et son œil critique qui nous a été très précieux pour structure le travail et por améliorer la qualité des différentes sections de notr mémoire merci pour tout.*



*Nous remercions également chaleureusement madame **Ghorri Sana** , encadreur de notre mémoire pour sa disponibilité , son avoir – faire , ses conseil , elle nous a permi de réalisé la partie pratique dans les meilleures conditions , sa compétence , sa patience , son enthousiasme et léattention particulière avec laquelle elle a suivi et dirigé ce travail ont permi son aboutissement à temps.*



*Nous remercions **Hafirassou Anissa** pour leurs disponibilités et encouragement et pour la correction de Résultat et Discussion.*



*Nouts tenons aussi à exprimé toute notre gratitude à Pr : **Haddi .M** un autre fois pour avoir accepté la président de ce jury.*



*Nos vifs remerciements s'adressent aussi à Dr : **Benseraj Wafa** qui a accepté d'examiner notre travail avec bienveillances et nous en sommes très honoré.*

Dédicace



Je dédie ce modeste travail

A ma très cher mère « *Saliha* »

Affable , honorable,aimable :tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence , la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi .

A mon très cher père « *Makhlouf* »

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

A mon cher frère « *Youcef* »

Mon ange gardien .Je te dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur , de santé et de réussite .

A mes cher Sœurs

Wafa , son marie *Abd alhak* , et les petites filles *Roa Aridj* , *Dima Alae* , *Lina Assil* .

Zineb , son marie *Hassan* , et le petit garçon *Mohamed Abd Arahman* .

Yasmine , son marie *Aissam* , et son fille *Chahed* .

Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour .

A mon fiancé « *Mohamed* »

la source de grand courage tout le moment de travail et toujours à coté de moi merci .

A tout la famille labiod et hioual .

A mes cher ami (e) s

Badra , *Semra* , *Fouzia* , *Sihem* , et spécialement ma causine *Asma* .

A mes adorable camarades : *Sara* , *Nessrine* , *Hayet* , *Hadjer* , *Narimaine* , *rokaya* , *Adjiale* , *Basma* , *Manel* , *Salsabil* , *Houda* , *Amina* , *Djihad* merci pour les bons moment qu'on a passé ensemble .



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

Je dédie ce travail :

A mes chers parents : « *Ramadan et Mbarka* » en particulière

Je dédis ce mémoire a ma mère. Qui m'encouragé à aller de l'avant et qui m'a donné tout son amour pour reprendre mes études.

A l'âme de mon père qui nous a quitté la vie .

A mes frères

Tofik, Mohamed, Marwen, Choaib

A mes charmantes sœurs

Sabah, Mira, Wissam, Miyada

À qui je souhaite beaucoup de réussite et de bonheur

A mon fiancé *Nassim*

A mes touts famille dont le soutien et les encouragements m'ont été salutaires.

A mes chers Ami (e) s :

Meriem, Marwa, Nawel, Samiha, Amina, Salma, Dounia et tous les étudiants de ma promotion et bien sure ma binôme *fouzia*, que je considère comme une deuxième famille.

Tout nos professeurs qui nous ont enseigné et à tous ceux qui nous sont chers.



Table des Matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

INTRODUCTION.....1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : Le sol

1- le sol	3
1-1- Définition du sol	3
1-2-Composition du sol	3
1-2-1- La phase solide du sol.....	3
1-2-2- La phase liquide du sol.....	4
1-2-3- La phase gazeuse du sol.....	4
1-3- Les microorganismes du sol.....	4
1-3-1- Les bactéries.....	4
1-3-2- Les champignons.....	4
1-3-3- Algues et protozoaires.....	6

Chapitre 2 : Les moisissures

2-Les moisissures.....	7
2-1- Caractéristiques générales des moisissures	7
2-1-1- Définition.....	7
2-1-2- Habitat et pathogénicité	7
2-1-3- Besoins nutritifs et activités biologiques	8

2-2- Mode de reproduction.....	9
2-3- Conditions de croissance.....	10
2-3-1- Eléments nutritifs.....	10
2-3-1-1- Source de carbone.....	10
2-3-1-2- Source d'azote.....	10
2-3-1-3- Eléments minéraux.....	10
2-3-2- Facteurs physicochimiques.....	11
2-3-2-1-Température.....	11
2-3-2-2- Humidité.....	11
2-3-2-3-pH.....	12
2-3-2-4- Oxygène.....	12
2-3-2-5- Lumière	12
2-3-2-5-Activité en eau (Aw).....	12
2-4- mode de vie	13
2-5- cycle de vie.....	15
2-6-Classification des moisissures.....	15
2-6-1- Les Zygomycètes.....	15
2-6-2- Les Ascomycètes.....	17
2-6-3- Les Basidiomycètes.....	17
2-6-4- Les Deutéromycètes.....	17
2-7- Les principaux genres fongiques.....	18
2-7-1- Le genre <i>Aspergillus</i>	18
2-7-1-1- Caractéristiques générales.....	19
2-7-1-2- Les principales espèces	20
2-7-2- Le genre <i>Penicillium</i>	23
2-7-2-1- Caractéristiques générales.....	24
2-7-2-2- Les principales espèces	25
2-7-3- Le genre <i>Fusarium</i>	26
2-7-3-1- Caractéristiques générales.....	26
2-7-3-2- Les principales espèces	27

2-8- Intérêts industriels des moisissures.....	30
2-9- Isolement et identification des moisissures.....	31
2-9-1- Isolement des moisissures.....	31
2-9-1-1- Milieux de culture.....	32
2-9-1-2- Addition des antibiotiques.....	32
2-9-1-3- Choix des milieux de cultures sélectifs.....	32
2-9-1-4- Techniques d'isolement.....	33
2-9-2- Identification des moisissures.....	33
2-9-2-1- Critères macroscopiques d'identification.....	33
2-9-2-2- Critères microscopiques d'identification.....	34
2-9-2-3-Techniques d'identification.....	38
2-9-2-3-1- Identification morphologique.....	38
2-9-2-3-2-Tests biochimiques.....	38
2-9-2-3-3- Identification génétique.....	39
2-9-2-3-4- Identification des genres par la technique de scotch	39
2-9-2-3-5-Identification des genres par la technique de micro-culture	39

Chapitre3 : Activité antibactérienne des champignons

3- Activité antibactérienne des champignons.....	40
3-1- Les Métabolites secondaires fongiques.....	40
3-2- Les mycotoxines.....	41

MATERIELS ET METHODES

1-Isolement des champignons de sol.....	42
1-1-Echantillonnage	42
1-2-Milieu d'isolement	42
1-3-Préparation des dilutions.....	43

1-4-Méthode d'isolement.....	43
1-5-Ensemencement et incubation	44
2-Repiquage et purification	44
3-Identification des souches	45
3-1-Etude macroscopique.....	45
3-2-Etude microscopique.....	45
4-Etude de l'activité antibactérienne	46
4-1-Bactérie test	46
4-1-1-Réactivation de bactérie test.....	46
4-2-Sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes	46

RESULTATS ET DISCUSIONS

1-Isolement des champignons de sol.....	48
2-Identification des souches	48
2-1- Etude macroscopique.....	48
2-2- Etude microscopique	57
3- Etude de l'activité antibactérienne.....	68
Conclusion et Perspectives	74

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

Liste
Des Figures
Des Tableaux
Des Abréviations

Liste des abréviations

- ADN : Acide désoxyribonucléique
- ARN : Acide ribonucléique
- PDA : Potato dextrose agar
- AFPA : *Aspergillus flavus* et parasiticus agar
- API : Aspergillose Pulmonaire Invasive.
- ATA : Aflatoxine A
- ATCC : l'American Type Culture Collection
- AW : Activité de l'eau.
- BN : bouillons nutritif
- CDA : Czapek Sucrose Agar
- CREA : milieu gélose à la créatine
- CYA : Czapec extrait de levure agar
- CZIA : Gélose à l'iprodione et au dichloran
- DCPA : Dichloran-chloranphénicol
- DMB : Motif digital microscope
- G25N: 25% Glycérol Nitrate Agar
- HIV : Human immunodeficiency virus
- ITS1 et ITS2 : région 1 et 2 sur ADN
- MAR : Malt-Agar-Rose de Bengal
- MEA: Malt Extract Agar
- M pa : Méga pascal
- OGA : Oxytétracycline glucose agar
- OTA : Ochratoxine A
- PCR :Polymerase chain reaction
- PDA : Potato Dextrin Agar
- pH :Potentiel hydrogène
- sp : espèce
- Ø : Diamètre
- (-) : Négative

Liste des figures

Figure 1 : Cycle de vie des moisissures

Figure 2 : Quelques champignons filamenteux

Figure 3 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*.

Figure 4 : *Aspergillus flavus*

Figure 5 : *Aspergillus fumigatus*

Figure 6 : *Aspergillus niger*

Figure 7 : *Aspergillus ochraceus*

Figure 8 : *Aspergillus oryzae*

Figure 9 : Caractères du thalle de genre *Penicillium*

Figure 10 : Caractères morphologiques des *Penicillium*.

Figure 11 : Aspect macroscopique et microscopique du genre *Fusarium*

Figure 12: *Fusarium culmorum*

Figure 13: *Fusarium graminearum*

Figure 14: *Fusarium oxysporum*

Figure 15: *Fusarium verticillioides*

Figure 16 : Modes de formation des conidies

Figure 17 : Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux

Figure 18 : le site de prelevement à foret de chaebat rassas (A : la foret de Chaabet Erassas ; B : site de prélèvement ; C : échantillon de sol pour l'analyse)

Figure 19 : l'étape de préparation des dilutions à partir de la solution mère

Figure 20 : Repiquage des boites au centre sur différentes milieux

Figure 21 : Illustration de la technique des tests antibactériens

Figure 22 : Genres fongiques isolés du sol de Chaabet Erassas

Liste des figures

Figure 23 : Résultats attendus après réalisation des tests par la méthode des disques

Figure 24 : Effet d'*Aspergillus sp 3*, *Rhizomucor sp* et *Penicillium sp 5* sur *K. pneumoniae* (de gauche à droite).

Figure 25 : La variation de zone d'inhibition entre différentes souches et *K. pneumoniae*

Figure 26 : Effet d'*Aspergillus sp 2*, *Aspergillus sp 3*, *Aspergillus sp 5*, *Aspergillus sp 11*, *Penicillium sp 4*, *Penicillium sp 5* sur *E. faecalis* (de gauche à droite).

Figure 27 : Variations de zones d'inhibition en fonction des espèces de moisissures isolées contre *E. faecalis*

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de microorganismes par gramme de terre du jardin, en fonction de la profondeur.

Tableau 2 : Etude Macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.

Tableau 3 : Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol.

Tableau 4 : Activités antibactériennes développée par l'ensemble des isolats sur les bactéries test.

Introduction

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Ruark and Zarnoch, 1992 ; Madigan *et al.*, 1997 ; Subler and Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith *et al.*, 2000). Quant à l'évaluation de la biomasse microbienne, cette dernière a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Bååth and Söderström, 1980 ; Schnürer *et al.*, 1985).

Les moisissures, ou les mycètes ou les champignons filamenteux, sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent, en outre, un intérêt économique, en raison à la fois de leur utilité et de leurs activités néfastes multiples: altérations des produits alimentaires et détériorations dans de nombreux autres domaines : production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépens de l'homme, des animaux et des plants. Par ailleurs, les moisissures synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement très importantes : acides organiques, alcaloïdes, antibiotiques, terpènes et enzymes (Sheikh, 2010; Mehravar et Sardari, 2011; Pereira *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, la connaissance de la biologie des moisissures est encore partielle; cependant, la compréhension des métabolismes primaires et secondaires et de la génétique de ces microorganismes permet de maîtriser de mieux en mieux leurs capacités de biosynthèse et leur mise à profit pour l'homme. A l'heure actuel, il n'existe pas en Algérie de données scientifiques significatives sur les variétés de mycètes, leur écologie et leur potentiel de production de métabolites secondaires (Abdalaziz , 2006).

Dans ce contexte, nous nous proposons, dans ce modeste travail, de mettre en évidence la flore fongique d'un sol forestier à Constantine et d'essayer d'évaluer l'activité antibactérienne de certains de ses genres vis-à-vis de deux souches de bactéries.

Ainsi, cette étude comprend les parties suivantes :

- **Partie 1** : une synthèse bibliographique, qui rassemble des données générales, partagée en trois chapitres ayant trait aux généralités du sol ; aux moisissures et à l'activité antibactérienne de la flore fongique

- **Partie 2** : une description des protocoles expérimentaux utilisés, d'une part, lors des prélèvements, isolement, purification sur différents milieux de cultures, identification des souches fongiques et d'autre part, lors de la mise en évidence, *in vitro*, de l'activité antibactérienne.

- **Partie 3** : consacrée à la présentation des résultats obtenus et à leur interprétation.

Revue Bibliographique



Chapitre 1

Le Sol

1- Le sol

1-1- Définition du sol

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes continentaux. Leur ensemble, dénommé pédosphère, résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques, l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite (manteau superficiel de débris), lui-même transformé en ce que l'on appelle sol. Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Atlas et *al.*, 1992) .

Le sol a de nombreuses fonctions, il est un milieu biologique dans et sur lequel se développent des organismes vivants. Ce développement dépend de la qualité de ce sol ou fertilité (quantité de carbone, d'azote, capacité d'échange ionique, etc...). Il est aussi un acteur déterminant du cycle de l'eau (stockage et régulation) et de la qualité de cette eau (source de pollution, capacité de rétention des polluants mais aussi biodégradation de ceux-ci). Mais le sol joue aussi un rôle prédominant dans tous les cycles biogéochimiques (Quénéa K , 2004).

1-2- Composition du sol

Le sol est un complexe dynamique, caractérisé par une atmosphère interne, une économie de l'eau particulière, une flore et une faune déterminées, des éléments minéraux (Davet, 1996). On peut considérer le sol comme un système composé de quatre compartiments ; les trois phases, solide, liquides et gazeuse, et les organismes vivants. Ces compartiments sont en interaction permanente par des échanges de matière et d'énergie dus à plusieurs phénomènes physiques, chimiques et biologiques (Calvet, 2000).

1-2-1- La phase solide du sol

Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On pourrait considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide, puisqu'ils ne sont ni gazeux ni liquides (Calvet, 2000). On distingue deux fractions dans le sol:

➤ **Fraction minérale** : les minéraux constituent, en général, de 95 à 99% du sol. La Composition minérale dépend de la nature de la roche-mère. La nature des minéraux peut être extrêmement diverse avec des tailles granulométriques différentes

➤ **Fraction organique** : la fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (Paul E et al . 1996). On trouve aussi des organismes vivants : des bactéries dont beaucoup d'actinomycètes, des champignons et une microfaune formée de protozoaires, nématodes, insectes, vers de terre (Quénéa K , 2004).

1-2-2- La phase liquide du sol

La phase liquide du sol n'est pas de l'eau pure mais une solution dont la composition est complexe et très variable. On la désigne par l'expression (solution du sol).

1-2-3- La phase gazeuse du sol

La phase gazeuse du sol est souvent appelée l'atmosphère du sol. Sa composition est souvent voisine de celle de l'air mais elle peut être très variable dans l'espace et dans le temps.

1-3- Les microorganismes du sol

La microflore du sol est formée de bactéries (Archaébactéries et Eubactéries), de champignons (levures et moisissures), d'algues et de protozoaires.

1-3-1- Les bactéries

Les bactéries sont les microorganismes les plus abondants et métaboliquement les plus actifs du sol. En fonction des propriétés du sol, tous les types physiologiques bactériens sont représentés : autotrophes et hétérotrophes, mésophiles, thermophiles et psychrophiles, aérobies et anaérobies.

1-3-2- Les champignons

Le sol est l'habitat naturel pour des myriades de microorganismes et d'autres formes vivantes, formant des populations de différents genres. Le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (Peuk, 2000).

L'évaluation de la biomasse des microorganismes a montré que dans la plupart des sols, les mycètes sont le composant principale (Bååth and Söderström, 1980 ; Schnürer *et al.*, 1985) (tableau 1).

Certaines espèces fongiques se retrouvent sur la plupart des terrains, comme les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc... On y retrouve aussi communément des *Oomycetes* et des *Chytridiomycetes* (Boiron, 1996).

Tableau 1 : Nombre de microorganismes par gramme de terre du jardin, en fonction de la profondeur (Alexander,1991).

Profondeur (cm)	Bactéries	Actinomycètes	Mycètes	Algues
3 à 8	9 750 000	2 080 000	119 000	25 000
20 à 25	2 179 000	545 000	50 000	5 000
35 à 40	570 000	49 000	400000	500
65 à 75	11 000	5 000	6 000	100
135 à 145	1 400	-	3 000	-

Les mycètes du sol comportent les saprophytes, les symbiotique (mycorhizes) et les parasites selon la façon dont ils obtiennent leur carbone et énergie (Christensen, 1989 ; Senal *et al.*,1993 ; Prescott *et al.*, 1995). Décomposeurs, les mycètes saprophytes, convertissent le matériel organique mort en biomasse fongique, dioxydes de carbone (CO₂), et petites molécules telles que les acides organiques. Ces mycètes emploient généralement les substrats complexes, tels que la cellulose et la lignine, du bois, et sont essentiels en décomposant les structures d'anneau de carbone dans quelques polluants. Quelques mycètes s'appellent les " mycètes de sucre " parce qu'ils emploient les mêmes substrats simples que beaucoup de bactéries.

Comme les bactéries, les mycètes sont importants pour immobiliser, ou maintenir, des aliments dans le sol. En outre, plusieurs des métabolites secondaires des mycètes sont les acides organiques, ainsi elles aident à augmenter l'accumulation de la matière organique riche d'acide humique qui est résistante à la dégradation et peut rester dans le sol pour des centaines d'années.

1-3-3- Algues et protozoaires

Les algues sont considérées comme relativement peu abondantes dans le sol. Mais leur présence est cependant commune. Les algues du sol incluent des espèces coccoïdes ou filamenteuses.

Chapitre 2
Les moisissures

2 - Les moisissures

2-1- Caractéristiques générales des moisissures

2-1-1- Définition

Les moisissures sont des organismes filamenteux hétérotrophes (Nicklin *et al.*, 2000). Certains vivent en symbiose avec les végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres sont des saprophytes, se développant sur des déchets organiques.

Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) ((Nicklin *et al.*, 2000) et mésophiles (température optimale 20-30°C)(Botton *et al.*, 1990). Cependant, certaines espèces sont psychrophiles, se développant à basse température ($T^{\circ} < 15^{\circ}\text{C}$ ou même parfois $< 0^{\circ}\text{C}$, comme *Cladosporium herbarium*, *Thamnidium elegans*). Elles ont, en générale, un faible besoin en eau par rapport à d'autres microorganismes ($a_w = 0.65$) (Boiron, 1996). Elles sont souvent dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique, protéolytique, lipolytique, etc...) qui en font des agents de dégradation dangereux mais aussi parfois des alliés utiles (affinage des fromages, production d'enzymes).

La sporulation des moisissures est sous la dépendance des facteurs nutritifs ; en particulier du rapport C/N égale à 20 (Barker et Worgan, 1981 ; Botton *et al.*, 1990) ainsi que des facteurs environnementaux, essentiellement la lumière qui influence fortement la croissance de certaines moisissures, soit par destruction photochimique de constituants du milieu, soit en agissant directement sur le métabolisme fongique. Ainsi, l'induction de la synthèse des pigments caroténoïdes sous l'influence de la lumière, colore en orange le mycélium de certaines espèces.

D'autres pigments voient également leur production stimulée par la lumière et colore diversement les moisissures (Boiron, 1996). Cependant, beaucoup de moisissures n'exigent pas de lumière pour sporuler (Botton *et al.*, 1990).

2-1-2- Habitat et pathogénicité

Lorsque les conditions environnementales sont favorables (humidité, température et substrats organiques disponibles), les moisissures se développent. Beaucoup d'espèces produisent dans les habitats froids, périodiquement arides ou autres, apparemment inhospitaliers (Isaac *et al.*, 1993).

Il est important de souligner que les conditions optimales pour la croissance et la reproduction des moisissures changent considérablement d'une espèce fongique à une autre, d'où une biodiversité de mycètes qui tend à augmenter dans les régions tropicales, certains sont spécifiques à des endroits étroitement limités (la truffe blanche de Piémont est connue uniquement au niveau d'une Provence de l'Italie nordique) (Swann *et al.*, 1999). Environ 70.000 espèces de mycètes sont décrites. L'intervention néfaste des champignons filamenteux se manifeste essentiellement dans l'industrie alimentaire avec une activité phytopathogène en particulier sur les fruits et légumes.

Les moisissures les plus connues pour leur pathogénicité sont : *Aspergillus flavus*, *A. nomius* et *A. parasitica* connus pour leur production d'aflatoxine (substance cancérigène puissante). Ces espèces se développent à la surface de certains aliments tels que les céréales et les arachides (Guiraud, 1998), la moisissure *Penicillium citreonigrum* produit la citreoviridine (mycotoxine neurotoxique responsable du bérubéri cardiaque), alors que *P.citrinum* produit la citrinine un néphrotoxique, *Fusarium sporotrichoides* et des espèces voisines produisent divers toxines comme les trichothécènes, la zéaralénone, les fumonisines etc... certaines de ces toxines sont très thermostables (30 min à 200°C). Certaines maladies dues à l'aleucie alimentaire toxique (ATA) se présentent sous forme de simples malaises (Guiraud, 1998). D'autres exemples existent encore, telle que l'action de *Cryphonectria parasitica* responsable de la cessation de quatre milliards d'arbres de châtaigne aux Etats-Unis (Alexopoulos *et al.*, 1996).million d'espèces (Hawksworth, 1991 ; Hawksworth *et al.*, 1995)

2-1-3- Besoins nutritifs et activités biologiques

Les champignons sont des hétérotrophes, ils utilisent des composés organiques comme source de carbone. La digestion des grosses molécules doit commencer dans le milieu extérieur car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme.

La panoplie enzymatique des champignons est extrêmement riche et leur permet d'utiliser les substrats les plus complexes plus efficacement que les bactéries, tel que : la cellulose, la lignine, la kératine, les acides humiques etc... (Davet, 1997). Le glucose, le fructose, le mannose, le galactose, le maltose, le saccharose, l'amidon et la cellulose représentent les sucres les plus utilisés par les moisissures comme source de carbone et d'énergie. Ces hydrates de carbone sont dégradés grâce à la glycolyse et le métabolisme aérobie (Boiron, 1996 ; Nicklin *et al.*, 2000). D'autres composés organiques tels que les pesticides, les hydrocarbures, la lignine, la pectine et les lipides sont également dégradés par

les moisissures à côté d'autres substrats organiques bon marché comme les déchets issus de l'industrie agroalimentaire (lactosérum, mélasses de canne ou de betterave, amidon de maïs, déchets d'agrumes etc.). (Nishio et Nagai, 1981 ; Joyeau, 1982 ; Hart *et al.*, 1991).

L'azote représente, quant à lui, le second élément chimique le plus important du matériel cellulaire, composé majeur des protéines et des acides nucléiques. Il constitue en moyenne 12% du poids sec cellulaire (Scriban, 1993) ; non assimilable sous forme d'azote atmosphérique par les moisissures. Ces dernières métabolisent le nitrate, l'ammonium, l'urée et les acides aminés plus facilement assimilables (Botton *et al.*, 1990). Les peptides et les protéines ne sont utilisés par les moisissures qu'après leur dégradation (Botton *et al.*, 1990 ; Nicklin *et al.*, 2000). Le cuivre, le magnésium, le sodium, le zinc et le molybdène constituent les micronutriments, et sont disponibles en grande quantité dans l'environnement des moisissures (Nicklin *et al.*, 2000). Ils sont nécessaires à la plupart des espèces fongiques pour la production de cytochromes, des pigments, d'acides organiques, etc... Les facteurs de croissance, les stérols et diverses vitamines sont également d'une grande importance pour leur croissance (Rivière, 1975 ; Botton *et al.*, 1990).

2-2- Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction que l'on appelle spores et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent au côté des formes de reproduction sexuée et leur type varie selon les moisissures

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) (Guiraud, 1998).

2-3- Conditions de croissance

2-3-1- Eléments nutritifs

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche qui leur permet d' utiliser plus efficacement encore que les bactéries les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme (Davet, 1996).

2-3-1-1- Source de carbone et d'énergie

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d' énergie par les moisissures. La plupart d' entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l' amidon et la cellulose (Boiron, 1996 ; Nicklin et *al.*, 2000).

2-3-1-2- Source d'azote

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH_4^+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination (Boiron, 1996), alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique (Punt et *al.*, 2002).

2-3-1-3- Eléments minéraux

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s' agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l' espèce (Uchicoba et *al.*, 2001). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des

moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc. (Boiron, 1996).

2-3-2- Facteurs physicochimiques

Les facteurs physicochimiques ont une grande influence sur le développement des moisissures ainsi que sur la germination, nous examinerons successivement quelques paramètres importants.

2-3-2-1- Température

La température joue un rôle prépondérant dans la croissance mycélienne, elle intervient également dans la sporulation et la germination des spores (Bourgeois, 1989). La plupart des moisissures sont mésophiles avec des optima de croissance de 25 à 35°C (Botton et al., 1999 ; Julien, 2002). Quelques espèces sont thermotolérantes ou thermophiles et peuvent croître à haute température (au dessus de 50°C) avec une croissance optimale aux environ de 20 à 25°C, *Aspergillus fumigatus* en est un bon exemple (Botton et al., 1999 ; Nicklin et al., 2000). D' autres sont des psychrophiles ou psychrotolérantes se développant à basses températures (entre -5 et 10°C) tels que *Helicostylum pulchrum*, *Chrysosporium pannorum* et *Cladosporium herbarum*, ces espèces peuvent survivre même à -60°C, on les rencontre dans des entrepôts frigorifiques (Davet, 1996 ; Botton et al., 1999).

2-3-2-2- Humidité

Les moisissures ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (Davet, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (Bourgeois, 1989).

Les moisissures à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au dessous de - 4 MPa (Méga Pascal). Les moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à - 10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de - 20 MPa (Davet, 1996).

2-3-2-3- pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 - 8.0 (Botton et al., 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acide. C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae*. (Urbanek et al., 1984 ; Delgado-Jarana et al., 2002). Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (Botton et al., 1999). Par ailleurs, les champignons modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO₂ ou de NH₃ ou par production d'acides (Boiron, 1996).

2-3-2-4- Oxygène

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures est un facteur important de développement. La plupart sont aérobies, les plus exigeantes vivent dans les régions périphériques des substrats, les moins exigeants peuvent se développer en profondeur comme *Fusarium oxysporum* et *Aspergillus fumigatus*. Certaines peuvent même supporter une anaérobiose très stricte comme *Neocallimastix* (Bourgeois, 1989 ; Botton et al., 1999).

2-3-2-5- Lumière

Les radiations du spectre visible (380 - 720) n'ont en général pas d'action sur la croissance végétative des champignons mais peuvent agir sur la sporulation. La plupart des moisissures n'exigent pas de lumière pour leur croissance, ni pour la germination de leurs spores (Botton et al., 1999).

2-3-2-6- Activité en eau (Aw)

L'Aw d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des

activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des A_w voisines de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures,...) (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002). Par comparaison, les *Fusarium* ne peuvent se développer qu'à des A_w supérieures à 0,9. Il s'agit donc d'espèces se développant au champ, sur les plantes vivantes (Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002).

2-4- Mode de vie

La quasi-totalité des mycètes vivent aux dépens de la matière organique en décomposition, ce sont des agents de *recyclage* de la matière minérale dans la nature, connus sous la nomination de « *Saprophytes* ». Dans des conditions particulières, beaucoup de micromycètes *parasitent* des organismes végétaux ou animaux ou même d'autres mycètes (c'est le cas de l'espèce *Penicillium rugulosum* qui infecte la tête d'*Aspergillus niger*, en formant dessus, des phialides regroupés en pénicilles et le conduit finalement à la mort). D'autres, cohabitent avec différentes formes de vie dans le contexte du bénéfice réciproque ou ce qu'on appelle (la symbiose) (Kachour, 2005) .

➤ **Saprophytisme** : (du grec *sapros*, pourriture et *phyton*, plante) (Kachour , 2005).

Les champignons répondent particulièrement à leurs besoins nutritionnels en absorbant les éléments organiques, de la matière inerte complexe de leur environnement après l'avoir dégradée en substances organiques simples et en molécules inorganiques. Le carbone, l'azote, le phosphore et d'autres éléments nécessaires se trouvent ainsi libérés et disponibles au profit des organismes ; les autotrophes et les lithotrophes en premier.

Le développement des moisissures sur du bois mort ou sur de la matière végétale en décomposition (*l'humus*), est favorisée grâce à leur système enzymatique renfermant des activités cellulolytiques et ligninolytiques, entre autres, à l'origine de la production des acides humiques.

Les mycètes interviennent très activement dans les cycles de l'azote en achevant des réactions métaboliques de dénitrification. Leur activité est plus importante dans les milieux légèrement acides, là où l'on assiste à une inhibition bactérienne. Leur absorption en composés azotés explique, donc, la présence de l'azote (N) au niveau du squelette fongique.

Il existe une mycoflore commune impropre au substrat, sur les premières couches de fermentation de la litière; les principaux *Hyphomycètes* constituant cette flore fongique sont *Alternaria alternata*, *Epicoccum nigrum*, *Cladosporium herbarum* et *Botrytis cinerea*, ainsi que les *Mucorales* tels que *Mortierella*, *Mucor*, *Abisidia* et des *Moniliales*, à savoir *Penicillium Trichoderma* et *Verticillium*, entre autres. La décomposition de la litière crée une chaîne trophique incluant les champignons qui vont cohabiter, collaborer ou même combattre de nombreux organismes tels que les bactéries, les arthropodes, les helminthes, etc .

➤ **Parasitisme** : (du grec *par*, à coté ; *sitos*, aliment) (Kachour, 2005). Certains champignons saprophytes seraient passés du saprophytisme au parasitisme occasionnel puis au parasitisme strict et cela, a du apparaître très anciennement lorsqu'ils auraient trouvé des conditions plus favorables pour leur croissance, chez les organismes vivants.

Le parasitisme des plantes et des animaux par les mycètes est effectué du fait que la taille des filaments de ces derniers est très inférieure à celle de l'hôte parasite. Chez les végétaux, la voie d'entrée peut être le stomate ou par dégradation de la cutine épidermique, soit à travers les blessures.

➤ **Symbiose** : (du grec *sum*, avec, *bio*, vie). Contrairement à la notion de parasitisme, la symbiose se traduit par l'association d'un champignon à un organisme différent, ils cohabitent dans un équilibre physiologique. Les deux, présentent ensemble, une complémentarité de structure et d'activités.

- **Lichens** : appelés aussi mycobionte ou phycobionte (*myco*, champignon ; *phyco*, algue; *biont*, forme de vie). Le champignon des lichens est souvent un Ascomycète, d'où *Ascolichens* (*pyrenolichens* et *discolichens*) (Kachour, 2005).

- **Les mycorhizes** : ce sont des formes de cohabitation en relation étroite et à intérêt mutuel entre champignons et végétaux supérieurs. Ces derniers étant incapables d'absorber les éléments minéraux en raison de leur faible solubilité dans le sol, ils se sont adaptés à ces conditions en s'associant à des mycètes qui développent un réseau de filament autour des racines (ectomycorhizes) ou dans leurs tissus corticaux (endomycorhizes), leur fournissant un maximum de contact avec les solutions ou particules du sol . Ce phénomène est peu rencontré en milieu aquatique où les végétaux peuvent utiliser directement les éléments minéraux dissous dans l'eau, à savoir le phosphore, le cuivre et le zinc (Kachour, 2005)

2-5- cycle de vie

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (Figure 1) : germination, développement, reproduction et la dormance/latence.

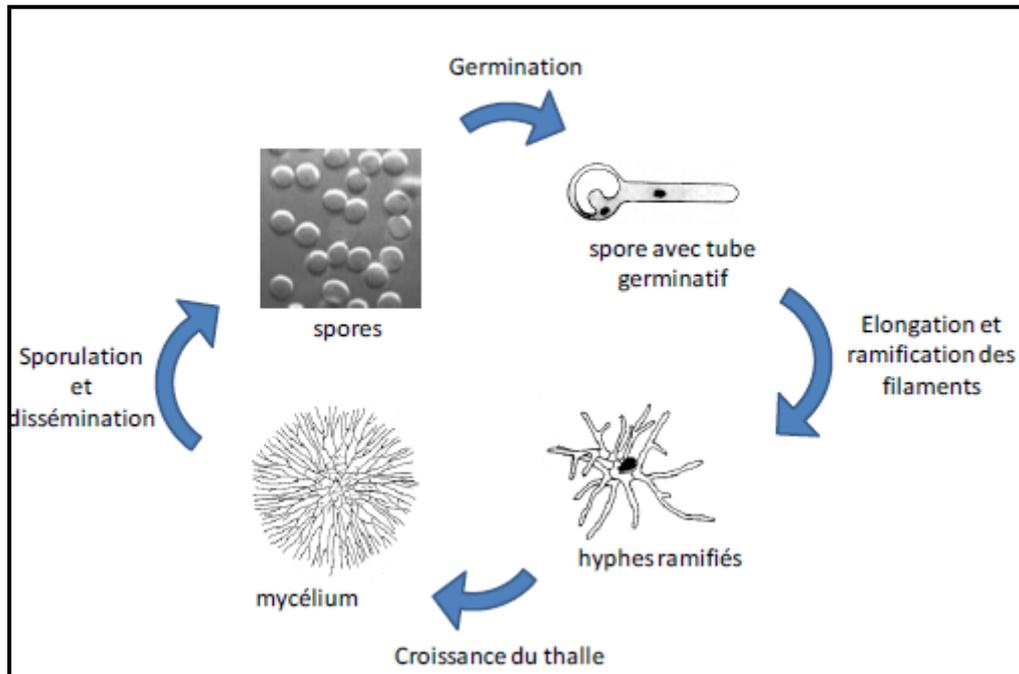


Figure 1: Cycle de vie des moisissures (www.aspergillus.man.ac.uk)

2-6-classification

Les moisissures ne correspondent pas à un groupe systématique homogène, mais se situent en diverses familles de champignons microscopiques. Leur classification est basée sur des caractères morphologiques (structure du mycélium) et le mode de reproduction (Davet, 1996). Les Eumycètes (les vrais champignons) forment un groupe très vaste incluant les classes principales des moisissures (Bourgeois, 1989), à savoir les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les Deutéromycètes (Figure 2).

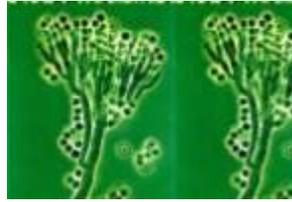
2-6-1- Les Zygomycètes

Ces moisissures possèdent un thalle mycélien non cloisonné et des organes de reproduction sexuée (Guiraud, 1998). La famille la plus importante dans cette classe est celle de Mucorales qui comprennent un grand nombre de moisissures saprophytes mais aussi quelques espèces parasites des champignons, des animaux et des hommes (mucormycoses) et

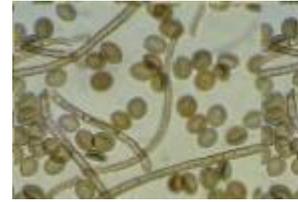
surtout des contaminants de nombreux produits alimentaires (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Certaines Mucorales sont parfois utilisées industriellement en raison de leurs activités enzymatiques (amylase, protéase,...) comme *Rhizopus* et *Mucor* (Guiraud, 1998).



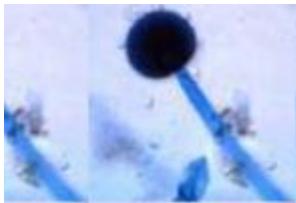
Aspergillus



Penicillium



Cladosporium



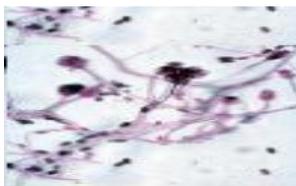
Mucor



Acremonium



Trichoderma



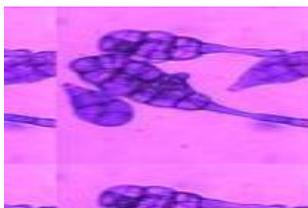
Stachybotrys



Fusarium



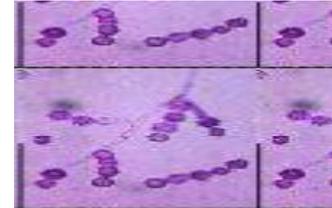
Geotrichum



Alternaria



Trichothecium



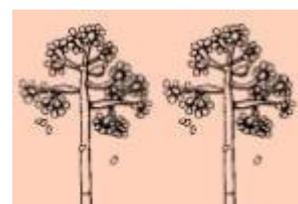
Scopulariopsis



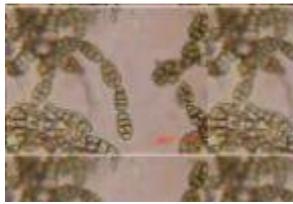
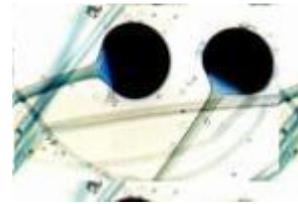
Helminthosporium



Neurospora



Botrytis

*Cephalosporium**Rhizomucor**Rhizopus***Figure 2: Quelques champignons filamenteux (Dendouga, 2006)**

2-6-2- Ascomycètes

Les Ascomycètes sont définis comme des champignons à thalle mycélien cloisonné, dont le mode de reproduction est sexué avec des spores endogènes (ascospores). Cette classe regroupe de nombreux parasites des végétaux mais aussi de nombreuses moisissures (Guiraud, 1998). Elles sont cependant plus particulièrement nombreuses dans l'ordre des Eurotiales, des Microscuales et des Sphaeriales. Dans cette classe, le genre le plus connu est *Endothia* et *Neurospora* (Bourgeois, 1998).

2-6-3- Basidiomycètes

Elles regroupent seulement certaines moisissures parasites. Elles sont caractérisées par un thalle à mycélium septé et une reproduction sexuée avec la formation de spores exogènes (basidiospores), c'est le cas de *Agaricus* et *Coprinus* (Botton et al., 1999).

2-6-4- Deutéromycètes

Egalement appelés champignons imparfaits, les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées ou par simple fragmentation du mycélium (Boiron, 1996). Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* (Frazier, 1967; Punt et al., 2002).

2-7- Les principaux genres fongiques

Les genres les plus importants de point de vue économique et médical sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Fusarium* qui représentent les contaminants les plus fréquents des aliments. On les retrouve principalement dans les céréales, mais aussi dans de nombreux autres produits végétaux et d'origine animale.

2-7-1- Le genre *Aspergillus*

C'est un genre appartenant à la classe des *Ascomycètes*. Le thalle, hyalin ou coloré, présente un mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, terminés en vésicule (Figure 3) (Raper et Fennell, 1965). Ce genre comprend environ 185 espèces réparties en 18 groupes morphologiquement, génétiquement et physiologiquement proches (Raper et Fennell, 1965 ; Botton *et al.*, 1990 ;Roquebert, 1998). Une vingtaine d'espèces est impliquée dans des pathologies animales et humaines. Les *Aspergillus* ont une large répartition géographique, mais sont plus souvent associés aux régions à climat chaud (Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002); ils se développent sur la matière organique en décomposition, dans le sol, le compost, les denrées alimentaires, les céréales. De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont présentes dans l'environnement humain, notamment dans la poussière et l'air (Morin, 1994). Certaines espèces peuvent être directement pathogènes pour l'homme et les animaux en étant capable d'envahir les tissus vivants et provoquer des aspergilloses (*Aspergillus fumigatus* responsable de mycoses pulmonaires ; *Aspergillus niger* responsable d'aspergillose du conduit auditif) (Morin, 1994).

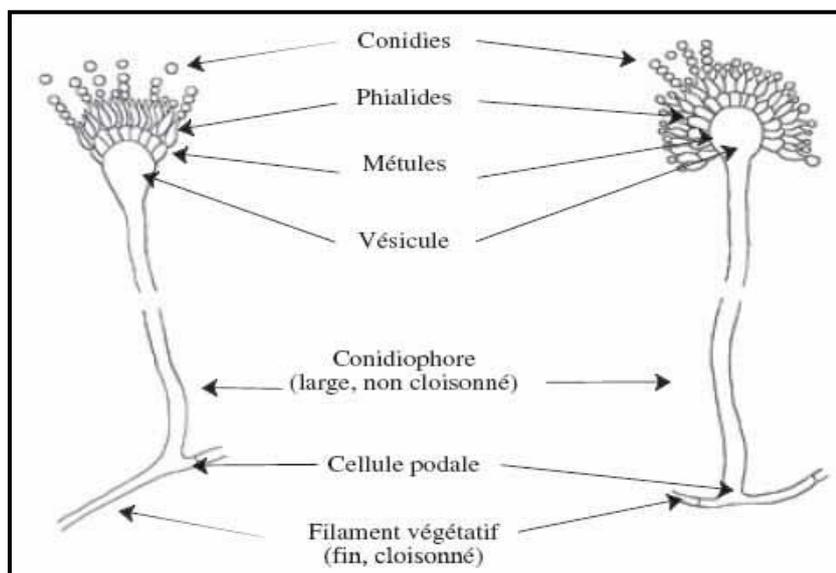


Figure 3 : Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus* (Raper et Fennell, 1965).

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* sont aussi connues pour leur capacité à produire des mycotoxines responsables de pathologies animales et humaines. Enfin, certaines espèces d'*Aspergillus* sont utilisées dans l'industrie agro-alimentaire et dans l'industrie des produits biotechnologiques notamment pour la production d'enzymes, d'acides organiques (Botton *et al.*, 1990).

2-7-1-1- Caractéristiques générales

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques (gélose au malt, Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. 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, brune, verte, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles (*A.fumigatus*) se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C (Badillet *et al.*, 1987 ; Morin,1994). Les *Aspergillus* forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses. La couleur de colonies permet une orientation rapide dans l'identification d'espèces : gris-vert pour *A. fumigatus*, vert-jaune pour *A. flavus* et les espèces du groupe *A. glaucus*, vert foncé à chamois pour *A. nidulans*, brun cannelle pour *A. terreus*, chamois clair, jaune et rose pour *A. versicolor*, jaune puis noir pour *A. niger* et blanche pour *A. candidus*. Le revers de la colonie est incolore ou jaune, mais il peut brunir ou rougir avec l'âge (Chermette et Bussieras, 1993).

Microscopiquement, les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) formé de filaments mycéliens hyalins, de diamètre fin et régulier, septés et ramifiés. Sur les filaments végétatifs prennent naissance des filaments dressés, non cloisonnés (conidiophores) qui se terminent par une vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogènes ou phialides. Les phialides peuvent être insérées directement sur la vésicule (têtes unisériées) ou portées par des petits structures insérés sur la vésicule (têtes bisériées) nommées métules ou stérigmates (Figure 4) (Badillet *et al.*, 1987 ; Raper et Fennell, 1965). Les conidies, sèches, disposées en chaînes divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses, sub-globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert, brun ou noir. L'ensemble **vésicule ± métules + phialides + conidies** constitue la tête aspergillaire caractéristique du genre *Aspergillus*. Pour certaines espèces, des formations sexuées apparaissent parfois en culture. Il s'agit de cléistotèques qui contiennent des asques arrondis renfermant chacun 8 ascospores. Les « hülle cells » ou les cellules en noisette, sont des formations arrondies, réfringentes à

paroi épaisse qui accompagnent souvent les formes sexuées, mais que l'on peut également observer isolément, indépendamment de la reproduction sexuée.

2-7-1-2- Les principales espèces

➤ *Aspergillus flavus* : le champignon se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. La température optimale de croissance est 37°C. Sur le milieu de culture *A. flavus* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord blanches, puis jaune, puis vert-jaune. Le revers peut être incolore, rosâtre ou brun-rouge foncé pour les souches productrices de sclérotés (Figure 4) (Tabuc ,2007)

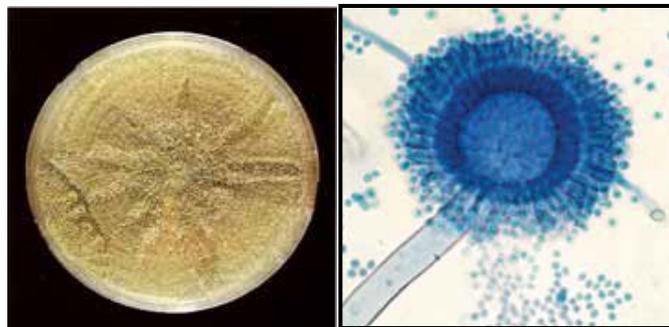


Figure 4 : *Aspergillus flavus*

(a : culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et b : aspect microscopique) (Tabuc ,2007)

Microscopiquement, on distingue les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis réparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores hyalins, verruqueux, atteignent 1 à 2,5 mm de long. Les vésicules sont sub-globuleuses, et mesurent 25 (10-65) à 45 µm de diamètre. Les phialides (6-10 x 4-5,5 µm) sont insérées directement sur la vésicule (unisériées) ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de 3-6 µm de diamètre, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotés, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir.

➤ *Aspergillus fumigatus* : on distingue un mycélium à croissance rapide sur les milieux de culture classiques à 37°C. *A. fumigatus* est une espèce thermotolérante dont la température de croissance est comprise entre 15 et 48°C ; la température optimale étant située aux alentours de 40 et 42°C. Cette espèce peut se développer jusqu'à 57°C (Morin, 1994). *A.*

fumigatus forme des colonies d'abord blanches, puis bleu-vertes et enfin vert foncé à gris noirâtre. Le revers peut être incolore, jaune, vert ou brun-rouge suivant les souches (Figure 5).

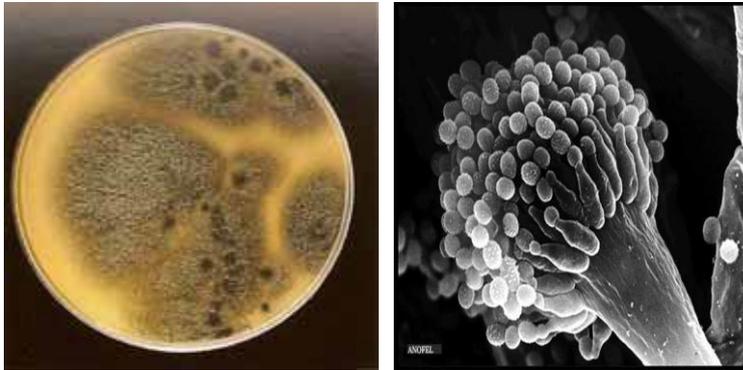


Figure 5: *Aspergillus fumigatus*

(a : culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et b : aspect microscopique). (Tabuc ,2007)

Du point de vue microscopique, les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts (300-500 μm), lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules subhémisphériques. Ces dernières (20-30 μm en diamètre), vertes, sont fertiles dans leur moitié supérieure. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, mesurent 2(2,5)-3 (3,5) μm de diamètre, et sont échinulées.

➤ ***Aspergillus niger*** : ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques (géloses au malt et Sabouraud). La température optimale de croissance varie généralement entre 25 et 30°C, mais *A. niger* peut se développer jusqu'à 42°C. Les colonies d'*A. niger* sont granuleuses, blanches au début, puis jaunes et, à maturité, elles deviennent noires. Le revers des colonies est incolore ou jaune pâle. Sur le milieu Czapek, *A. niger* forme des colonies à mycélium blanc ou jaune, et revers souvent incolore (Figure 6) ((Tabuc ,2007). L'aspect microscopique met en évidence des têtes conidiennes, bisériées, radiées, disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont longs atteignant 1,5-3 mm, lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses et entièrement fertiles. Les phialides (7-10 x 3-3,5 μm) sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles mesurent 3,5-5 μm de diamètre, sont brunes, échinulées à

très verruqueuses. Les sclérotés parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé.



Figure 6 : *Aspergillus niger*

(a : culture de 7 jours sur gélose au malt à 25°C et b : aspect microscopique) (Tabuc ,2007)

➤ ***Aspergillus ochraceus*** : ce champignon pousse rapidement (2-3 jours) sur les milieux de culture classiques à une température de 25 à 30°C. Les colonies d'*A. ochraceus* sont poudreuses ou granuleuses, blanches au début, puis jaunes ou ocre-jaunes à chamois. Le revers de colonies est incolore au jaune pâle (Figure 7)

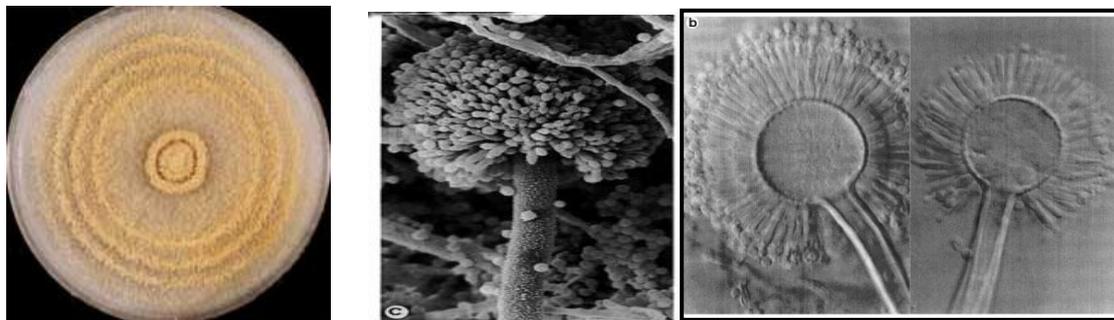


Figure 7: *A. ochraceus* K. Wilh (Raper et al., 1965)

(a : Colonie 7 jours à 25°C sur le milieu MA b : La tête de conidie ; c : Conidiophores).

L'observation microscopique met en évidence des têtes conidiennes bisériées, d'abord globuleuses puis se séparent en 2 ou 3 colonnes divergentes, bien individualisées, de couleur jaune, ocre-jaune ou chamois. Les conidiophores sont rugueux, jaunes à brun pâle, longs atteignant 1,5 mm. Les vésicules sont globuleuses, hyalines, 30-50 µm en diamètre. Les phialides (7-10 x 2-3,5 µm) sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses. Elles mesurent 2,5-3 (3,5) µm de diamètre, sont

finement échinulées ou lisses. Les sclérotés, souvent présents, de couleur lavande à pourpre, sont globuleux, ovales ou cylindriques, et atteignent 1mm de diamètre.

➤ *Aspergillus oryzae* : il se développe rapidement sur les milieux classiques (géloses au malt et Sabouraud) à 22-25°C. Sur milieu de culture *A. oryzae* forme des colonies duveteuses à poudreuses, d'abord de couleur blanche, puis jaune, et enfin vert-jaunâtre à vert olive. Le revers peut être incolore ou jaunâtre (Figure 10). Microscopiquement, *A. oryzae* peut souvent être confondu avec *A. flavus*. Les têtes unisériées ou bisériées (les deux aspects pouvant cohabiter sur une même souche), sont radiées, jaunâtre au début puis jaune verdâtre à vert-olive, puis évoluent vers des tons bruns. Les conidiophores, hyalins, sont souvent longs (2,5-5 mm), plus ou moins verruqueux suivant les souches. Les vésicules sont sub-globuleuses, à paroi mince, mesurent 40-75 µm de diamètre. Les phialides (8-15 x 3-5 µm) sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métules. Les conidies d'abord piriformes à elliptiques deviennent sub-globuleuses à globuleuses, de taille très variable, lisses ou finement verruqueuses (Figure 8).

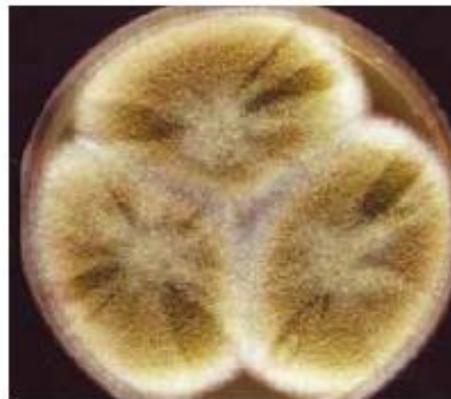


Figure 8 : *Aspergillus oryzae* (Tabuc ,2007)
(Culture de 7 jours sur gélose au malt à 25oC).

2-7-2- Le Genre *Penicillium*

Ce genre réunit des champignons filamenteux, appartenant au phylum des *Ascomycètes*. Ce genre comprend environ 227 espèces définies essentiellement d'après les caractères du thalle, des pénicilles et des spores (Pitt, 1988). Les *Penicillium* sont des champignons pour la plupart très communs dans l'environnement, polyphages, pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat naturel le sol, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition, le compost, les céréales. Les espèces du genre

Penicillium se développent normalement dans des milieux où l'activité de l'eau est plus élevée que celle permettant la croissance des *Aspergillus*, à des températures plus basses. Il s'agit de contaminants fréquents des régions tempérées.

2-7-2-1- Caractéristiques générales

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur les milieux de culture utilisés en routine (géloses au malt, Sabouraud). Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs. Après 3-4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange, chamois, rose, ou rouge. Cette couleur permet une première orientation dans l'identification d'espèces : vert-gris pour *P. citrinum*, *P. cyclopium*, *P. italicum*, vert-jaune pour *P. chrysogenum*, vert sombre pour *P. roquefortii*, *P. fellutatum*, jaune pâle, chamois pour *P. nalgiovense*, jaune vif à rouge pour *P. purpurogenum*, mélange d'orange et verdâtre pour *P. islandicum*, et blanche pour *P. camembertii*. Le revers de colonies peut être incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans le milieu de culture (Chermette et Bussieras, 1993).

Les *Penicillium* peuvent former des colonies floconneuses (*P. camembertii*, *P. nalgiovense*), funiculeuses (*P. funiculosum*), granuleuses (*P. expansum*, *P. griseofulvum*), veloutées (*P. chrysogenum*, *P. citrinum*, *P. roquefortii*...) (Figure 9).

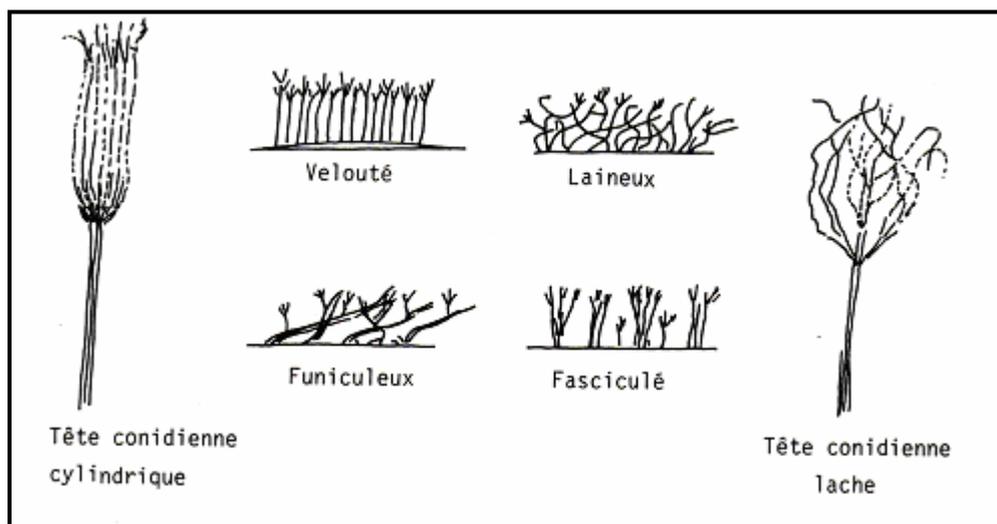


Figure 9: Caractères du thalle de genre *Penicillium* (Botton *et al.*, 1990).

Du point de vue morphologique les *Penicillium* se distinguent par leur organisation en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés (Figure 10).

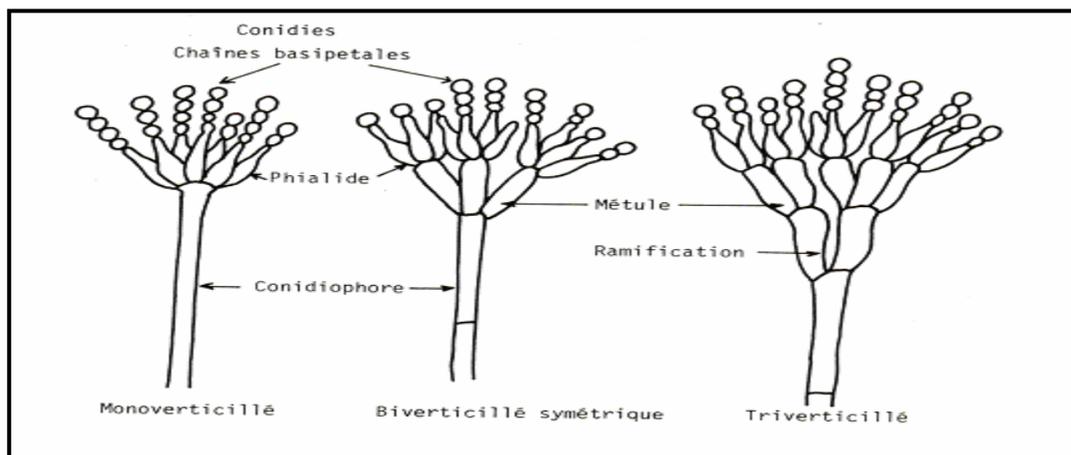


Figure 10 : Caractères morphologiques des *Penicillium* (Tabuc ,2007) .

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Les phialides peuvent être insérées directement (*Penicillium* monoverticillé) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillé) ; de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillé) ; parfois de trois rangées de métules (*Penicillium* quadriverticillé) sur les conidiophores. Les phialides, ampulliformes ou lancéolées, sont serrées les unes contre les autres donnant à l'ensemble un aspect de pinceau. Les phialides (cellules conidiogènes) donnent naissance à des conidies disposées en longues chaînes. Les conidies sont des spores unicellulaires, globuleuses, elliptiques, cylindriques ou fusiformes, lisses ou rugueuses, hyalines, grisâtres ou verdâtres (Botton *et al.*, 1990). Les caractères des pénicilles servent à la différenciation des groupes et des espèces. Certaines espèces peuvent présenter une reproduction sexuée avec la formation d'ascocarpes.

2-7-2-2- Les principales espèces

Les principales espèces connues du genre *Penicillim* sont : *P. notatum* (synthétise la pénicilline) ; *P. camembertii*, *P. glaucum* et *P. roqueforti* (utilisés en fromagerie) ; *P. griseofulvum* (largement répandu dans le sol et les matières en décomposition, responsable de

la production d'une mycotoxine dangereuse pour l'homme, qui est la patuline) et *P. chrysogenum* (espèce très commune dans le sol).

2-7-3- Le genre *Fusarium*

Ce genre inclue des champignons imparfaits appartenant à la classe des *Deutéromycètes*. Les formes parfaites ou téléomorphes de quelques espèces de *Fusarium* sont connues, et appartiennent à la classe des *Ascomycètes* (ordre des *Hyphocreales*, famille des *Nectriaceae*, genres *Gibberella*, *Calonectria* et *Nectria*). Pour plusieurs espèces de *Fusarium*, le stade parfait n'est pas connu. Le genre comprend près de 40 espèces souvent largement répandues (Nelson *et al.*, 1983).

Sur le plan économique le genre *Fusarium* est très important parce qu'il regroupe beaucoup d'espèces phytopathogènes, susceptibles d'induire des maladies (fusarioses) chez de nombreuses plantes. De plus, beaucoup d'espèces saprophytes sont capables de se développer en tant que pathogènes secondaires sur des tissus végétaux sénescents. Les espèces du genre *Fusarium* peuvent ainsi attaquer les céréales (maïs, blé, orge, avoine), des légumes, les plantes ornementales et beaucoup d'arbres fruitiers. La majorité des espèces de *Fusarium* sont susceptibles de produire des mycotoxines et sont ainsi impliquées dans des intoxications chez les animaux d'élevage.

2-7-3-1- Caractéristiques générales

Les *Fusarium* poussent sur milieu Sabouraud, mais se développent mieux sur gélose au malt ou sur milieu PDA (potato-dextrose-agar). Leur température optimale de croissance est comprise entre 22 et 37°C. Sur les milieux de culture, les *Fusarium* forment des colonies duveteuses ou cotonneuses de couleur variable (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette ou lilas) selon les espèces. Le revers peut être crème, rouge à pourpre, lilas ou violet (Figure 11). Les pigments diffusent souvent dans la gélose (Chermette et Bussieras, 1993).



Figure 11 : Aspect macroscopique et microscopique du genre *Fusarium* (Ferry, 2005)

Le principal caractère morphologique des *Fusarium* est la présence de macroconidies fusiformes et cloisonnées (le nom de *Fusarium* vient du latin « *fusus* » car les spores de ces moisissures sont en forme de fuseau). Dans la figure 13 sont présentés les principaux caractères morphologiques de genre *Fusarium*.

- ✓ Les conidiophores, parfois très ramifiés, forment sur le thalle des coussinets (sporodochies) et portent des masses de spores.
- ✓ Les phialides, plus ou moins allongées, présentent, le plus souvent, un site de bourgeonnement unique (monophialide) situé à l'extrémité d'un col allongé (*F. solani*) ou court et trapu (*F. oxysporum*). Chez d'autres espèces comme *F. proliferatum*, les phialides présentent plusieurs sites de bourgeonnement (polyphialides). Les phialides produisent deux types de conidies :
 - microconidies – uni- ou bicellulaires, piriformes, fusiformes, cylindriques ou ovoïdes, isolées, solitaires ou groupées, disposées en verticille ou plus rarement en chaînettes (*F. verticilloides*) ;
 - macroconidies – conidies pluricellulaires à cloisons seulement transversales, souvent groupées en paquets. Les macroconidies sont fusiformes, souvent courbées, avec une cellule basale pédicellée, formant un sort de talon plus ou moins visible. Les chlamydospores, sont parfois présentes, en position terminale ou intercalaire (Roquebert, 1998).

2-7-3-2- Principales espèces

Compte tenu de leur fréquence dans les différents substrats, notamment les céréales, de leur potentiel toxigène et de leur pouvoir pathogène, les principales espèces de *Fusarium* sont : *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. oxysporum* et *F. verticilloides* (*F. moniliforme*).

➤ ***Fusarium culmorum*** : cette moisissure pousse rapidement sur géloses PDA et au malt. Les colonies sont duveteuses, d'abord blanches à jaunâtres ou roses puis ocracées à rouges brunâtre. Le revers est rouge à pourpre. Morphologiquement, Les phialides, courtes et larges, formées sur le mycélium aérien, sont groupées en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées et septées (5 cloisons en moyenne, 3-8). La cellule apicale est courte et pointue (26-50 x 4-7 μ m). Les chlamydospores, intercalaires ou terminales, formées par le mycélium ou par les conidies,

sont sub-globuleuses, brunâtres, lisses ou verruqueuses (9-14 μ m de diamètre). Dans la (figure 12) sont présentés les principaux caractères morphologiques de *F. culmorum*.

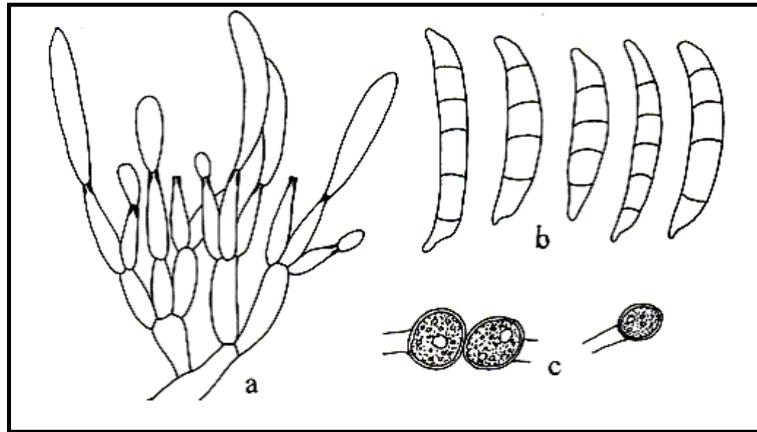


Figure 12 : *Fusarium culmorum* (Tabuc ,2007)

(Caractères morphologiques: a: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: chlamydospores).

➤ *Fusarium graminearum* (forme parfaite: *Gibberella zea* : ce champignon se développe vite sur les géloses PDA et au malt. Les colonies, floconneuses, sont au début roses grisâtres ou rouges à pourpres, puis deviennent brun vineux. Le revers est rouge à pourpre. Le pigment diffuse dans la gélose. Du point de vue microscopique, les phialides (10-14 x 3,5-5 μ m) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont absentes. Les macroconidies sont fusiformes, courbées, et présentent 3 à 7 septum. La cellule terminale est longue et pointue (25-62 x 2,5-5 μ m). Les chlamydospores, intercalaires, formées par le mycélium rarement dans les conidies, sont globuleuses, hyalines à brun pâle (8-12 μ m en diamètre) (figure 13).

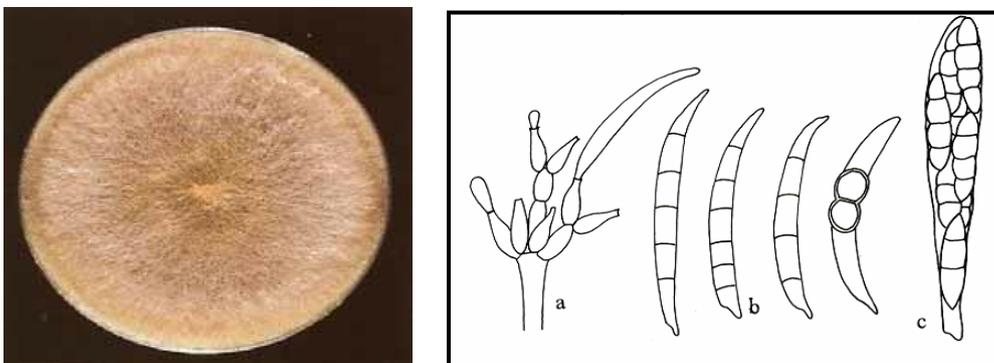


Figure 13 : *Fusarium graminearum* (Tabuc ,2007)

(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et caractères microscopiques:

a: macrophialides et macroconidies; b: macroconidies; c: asque octosporé).

➤ *Fusarium oxysporum* : il a une vitesse de croissance modérée sur les milieux de culture utilisés au laboratoire. Les colonies, sont blanches, pêches, roses saumon à violet. Le revers est pourpre (Figure 14).

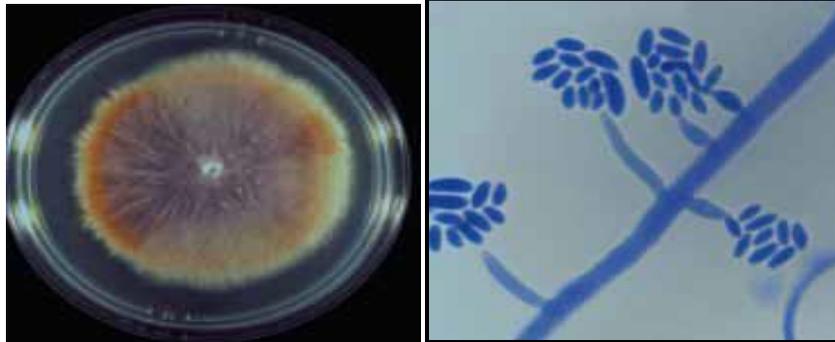


Figure14 :*Fusarium oxysporum* (Tabuc ,2007)

(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 25°C et aspect microscopique).

Les microphialides (10-14 x 3,5-5 μ m) peuvent s'agréger en sporodochies. Les microconidies sont ellipsoïdales, isolées ou potées par des conidiophores courts et ramifiés. Les microconidies sont abondantes, ovoïdes. Les macrophialides sont éparses ou groupées en sporodochies (Figure 18). Les macroconidies sont fusiformes, plus ou moins courbées, pointues aux deux extrémités, présentant 3 à 5 septum. Elles mesurent 27-65 x 3-5 μ m. Les chlamydospores, terminales ou intercalaires, formées dans le mycélium et dans les conidies, sont sub-globuleuses et hyalines (5-15 μ m de diamètre).

➤ *Fusarium verticillioides* (anciennement *F. moniliforme*) (forme parfaite: *Gibberella fujikuroi*) : ce champignon se développe rapidement sur les milieux classique de culture (PDA et gélose au malt). Le thalle, d'abord blanc à pêche ou rose saumon, devient vinacé à violet. Le mycélium aérien est dense, floconeux d'aspect poudreux. Le revers peut être violet foncé, lilas, vinacé ou crème.



Figure 15 : *Fusarium verticillioides* Sin. *F. moniliforme* (Tabuc ,2007)
(Culture de 7 jours sur milieu PDA à 25oC et aspect microscopique)

Les microphialides, subulées, sont formées sur le mycélium aérien (20-30 x 2,5-4 μ m). Les microconidies ellipsoïdales sont disposées en chaînes (Figure 15). Elles ont un aspect fusiformes, unicellulaires ou parfois uniseptées. Leur taille est d'environ 5-12 x 1,5-2,5 μ m. Les macrophialides sont groupées par 2 ou 3 sur une ramification courte. Les macroconidies sont rares, en fuseau allongé, avec 3 à 7 cloisons. Les chlamydozspores sont absents. Les périthèces, qui peuvent être formés lors du développement de cette espèce sur des végétaux morts, sont superficiels, bleu noir, globuleux, et mesurent 250-350 μ m. Les asques, clavés contiennent 4-8 ascospores hyalines, elliptiques, le plus souvent uniseptées, parfois triseptées.

2-8- Intérêts industriels des moisissures

Actuellement, les moisissures jouent un rôle primordial dans divers domaines d'applications ; elles sont utilisées dans les industries alimentaires, chimiques, la biolixiviation et la biotransformation, etc. Cependant l'industrie n'exploite commercialement qu'un petit nombre de métabolites de quelques espèces seulement (Boiron, 1996). Leur intérêt économique repose sur leur activité biologique dans la production d' une grande diversité de molécules produites au cours des métabolismes primaires et secondaires, exploitées en particulier par l' industrie pharmaceutique et en médecine (Larpen-Gourgau et Sanglier, 1992).

Les champignons filamenteux sont des producteurs importants d'acides organiques tels que les acides gluconique, malique, acétique et citrique (Leveau et Bouix, 1993 ; Boiron, 1996). Ce dernier est notamment produit par *Aspergillus niger*, où 60% de sa production est destinée au secteur alimentaire (Botton et al., 1999).

Les enzymes fongiques restent toujours les outils clés de la biotechnologie et reflètent de plus en plus l'importance et le rôle infini des moisissures dans les différentes applications alimentaires. *Aspergillus niger* est un bon exemple, il produit la cellulase, l'amylase, l'invertase et la pectinase, employées principalement comme des catalyseurs biologiques en glucoserie, brasserie et pour la fabrication des boissons (Kosikowski, 1988 ; Scriban, 1999).

Il est également à noter, l'utilisation des protéases alcalines d'*Aspergillus oryzae* et de *Stachybotrys chartarum* dans les détergents (Miller, 2002). La production de cellulase par *Aspergillus niger* et *Trichoderma harzianum* présente une diversité d'applications industrielles, où 48% de sa production par ces deux espèces fongiques et le genre *Penicillium* est utilisée pour l'industrialisation des papiers et les textiles (Delgado- Jarana et al., 2002). Certains genres fongiques tels que *Aspergillus*, *Mucor* et *Penicillium* sont capables de produire des lipides en quantités importantes et constituent une source potentielle d'utilisation chimique (Botton et al., 1999).

En biotransformation les moisissures ont une zone étroite d'application. Un exemple remarquable est l'hydrolyse enzymatique de la pénicilline V par *Penicillium chrysogenum* et *Fusarium* entraînant la formation d'acide amino-6-pénicillanique qui est un intermédiaire important de la production de pénicillines semi synthétiques telles que l'ampicilline et l'amoxicilline (Durand et Monson, 1988).

Enfin, les moisissures sont d'un grand intérêt dans le domaine médical où les premiers produits d'origine fongique en médecine sont les alcaloïdes de l'ergot de seigle (ergotamine), utilisés en gynécologie et pour diverses autres indications (Boiron, 1996 ; Botton et al., 1999).

2-9-Isolement et identification des moisissures

2-9-1- Isolement des moisissures

La plupart des milieux naturels air, sol, eau et matières premières alimentaires peuvent servir de matériel de départ pour l'isolement des moisissures (Clark et al., 1985 ; Karam2000; Julien, 2002), ces échantillons naturels contiennent aussi plusieurs espèces bactériennes et des levures. L'élimination de ces microorganismes pour l'isolement sélectif des champignons filamenteux est réalisé en le combinant traitement des milieux de cultures par un antibiotique avec le choix et le contrôle des conditions de culture. Il est important de choisir un échantillon aussi important que le permet la mise en évidence du microorganisme désiré (Ulacio et al., 1997).

2-9-1-1-Milieus de culture

Les milieux de culture sont peu sélectifs, permettant l'isolement d'un grand nombre de moisissures, le milieu Czapek permet d'éliminer les bactéries grâce à son acidité, le milieu oxytétracycline glucose agar (OGA) et le milieu Sabouraud sont utilisés pour l'isolement des levures et des moisissures (Botton et al., 1990). Dans le cas des espèces phytopathogènes, il est préférable d'utiliser des milieux à base de décoction végétale comme le milieu pomme de terre gélosé et le bouillon d' haricot gélosé (Guiraud, 2003).

2-9-1-2- Addition des antibiotiques

L'isolement des moisissures est réalisé le plus souvent à partir de produits contenant, également, des bactéries et des levures, donc il est nécessaire d'employer des inhibiteurs spécifiques pour les détruire. L'addition d'antibiotiques aux milieux de cultures est utilisée pour empêcher le développement des bactéries. Les antibiotiques utilisés sont : le chloramphénicol 0,5 mg/ml, l'oxytétracycline 0,1 mg/ml, la streptomycine 30 à 40 µg/ml, la colistine 0,08 mg/ml, la novobiocine 0,1mg/ml ou des colorants (rose Bengale 35 à 67mg/l, cristal violet 10mg/l) (Guiraud, 1998). En raison de leur stabilité, la gentamycine et la chloramphénicol peuvent être stérilisés avec le milieu ; leurs larges spectres d'action en font des antibiotiques très utilisés (Botton et al., 1999).

2-9-1-3- Choix des milieux de cultures sélectifs

Le choix des milieux de cultures est également déterminant dans l'isolement des moisissures (Harrigan et McCance, 1976). Ces milieux sont utilisés pour la détermination de champignons appartenant le plus souvent à des genres difficiles à mettre en évidence , en favorisant la croissance de certains genres ou espèces facilitant ainsi leur caractérisation; comme exemple; *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* isolés sur milieu *Aspergillus flavus et parasiticus agar* (AFPA) qui permet une caractérisation simple par la couleur jaune orangé de l'envers des colonies, milieu gélose à la créatine (CREA) permet d'identifier, par leur apparence, diverses espèces d'*Aspergillus*, de *Penicillium*, et de *Fusarium* sur gélose à la Dichloran-chloranphénicol (DCPA) ou sur gélose à l'iprodione et au dichloran (CZID) (Guiraud,2003).

2-9-1-4- Techniques d'isolements

Il existe deux types de techniques permettant de détecter la présence des champignons du sol et de les isoler. Avec les *techniques directes*, on obtient directement le développement de colonies sur un milieu nutritif plus ou moins sélectif, soit par incorporation du sol dans le milieu, soit, plus rarement, par immersion dans le sol du milieu fixé sur un support. Ces méthodes ne sont utilisables que pour des champignons capables d'un développement saprophyte. Dans le deuxième cas, la *technique indirecte* consiste à piéger le champignon dans le sol à l'aide de substrats vivants ou inertes, puis à l'isoler à partir de ces substrats lorsque sa biologie le permet (Davet et Rouxel, 1997).

2-9-2- Identification des moisissures

2-9-2-1- Critères macroscopiques d'identification

- *L'aspect des colonies* : représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses ; parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).
- *Le relief des colonies* : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure).
- *La taille des colonies* : les colonies peuvent être petites 3-3.5 cm (*Cladosporium* spp.) ou étendues 4-5 cm (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp.), envahissantes (*Botrytis* spp., *Fusarium* spp., *Trichoderma* spp.)
- *La couleur des colonies* : est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleu, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*). Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (Botton *et al.*, 1990).

2-9-2-2- Critères microscopiques d'identification

L'examen microscopique d'une colonie fongique se fait après réalisation d'un étalement entre lame et lamelle et coloration de la préparation au Bleu Cotton. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

- **Le thalle** : tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphonné ou septé :
 - ✓ Le thalle siphonné, constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 μm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes* ;
 - ✓ Le thalle septé ou cloisonné, constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 μm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* (Badillet *et al.*, 1987).
- **Les spores** : Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes
 - ✓ Les spores endogènes (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.
 - ✓ Les spores exogènes (conidies), retrouvées chez les *Ascomycètes*, *Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique (Campbell *et al.*, 1996).

- **Aspect des spores** : D'après la forme et les modalités de septation, on distingue 5 groupes de spores :
 - les amérospores : spores unicellulaires de petite taille (*Penicillium*, *Aspergillus*)
 - les didymospores : spores bicellulaires (*Trichothecium*) ;
 - les phragmospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales (*Curvularia*) ;
 - les dictyospores : spores pluricellulaires à cloisons transversales et longitudinales (*Alternaria*) ;
 - les scolécospores : spores étroites, effilées, souvent incurvées et cloisonnées transversalement (*Fusarium*).

- **Modes de formation des conidies**

- ✓ Le mode thallique : la formation des spores s'effectue à partir d'éléments préexistants du thalle. On en distingue deux variantes principales : le type thallique solitaire (ex: *Chrysosporium*) et le type thallique arthrique (ex: *Geotrichum*)
- ✓ Le mode blastique : les spores sont formées par bourgeonnement à partir de cellules conidiogènes différenciées ou pas, puis une cloison se forme à l'émergence de bourgeon et la cellule fille (la spore) se sépare de la cellule mère. On en distingue plusieurs variantes : le type blastique acropète (ex: *Cladosporium*, *Alternaria*), le type blastique synchrone (ex: *Botrytis*) et le type blastique sympodial (ex: *Beauveria*) (Figure 16).

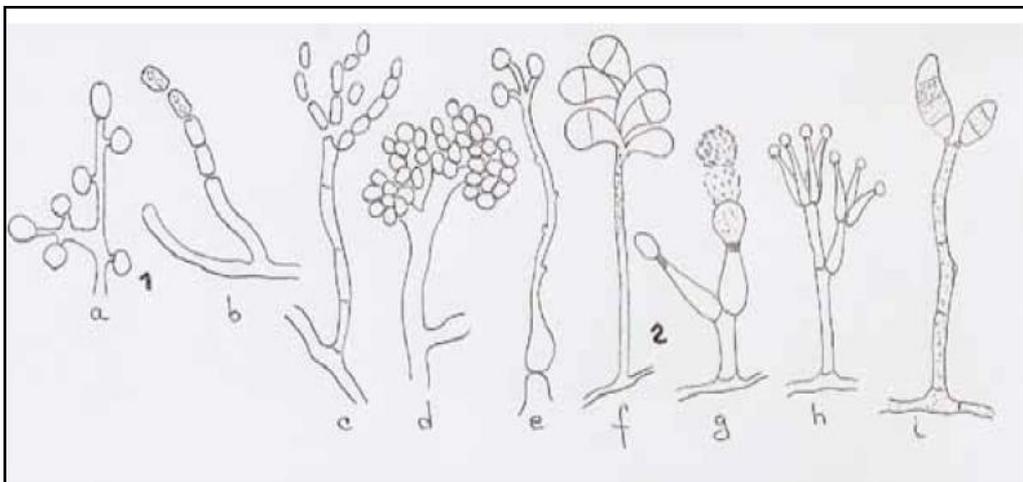


Figure 16: Modes de formation des conidies (Tabuc ,2007)

1. Formation thallique : a : solitaire (*Chrysogenum*), b : arthrique (*Geotrichum*)

2. Formation blastique : c : acropète (*Cladosporium*), d : synchrone (*Botrytis*), e : sympodial (*Beauveria*), f : régressif (*Trichothecium*), g : annelidique (*Scopulariopsis*), h : phialidique (*Penicillium*), i : poric (*Curvularia*).

- le type blastique régressif, ex: *Trichothecium*
- le type blastique percurrent (annelidique), ex : *Scopulariopsis*
- le type blastique phialidique, ex: *Aspergillus*, *Penicillium*
- le type blastique porique, ex: *Alternaria*, *Curvularia* (Figure 1) (Botton *et al.*, 1990).

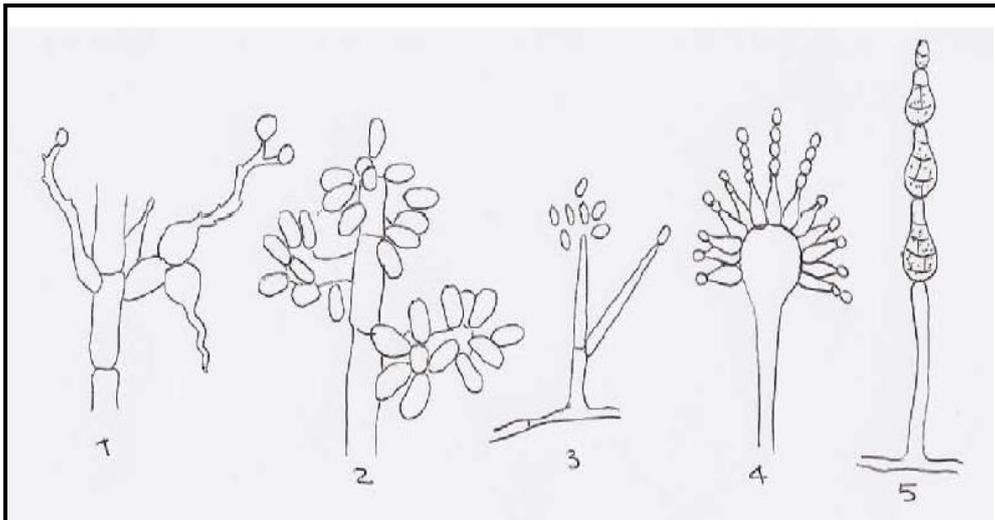


Figure 17 : Modes de groupement des conidies des champignons filamenteux (Tabuc ,2007)

- (1. grappes (*Beauveria*), 2. masses (*Botrytis*), 3. têtes (*Acremonium*),
4. chaînes basipètes (*Aspergillus*), 5. Chaînes acropètes (*Alternaria*))

- **Mode d'implantation des cellules conidiogènes**

Les cellules conidiogènes peuvent naître de structures plus ou moins élaborées issues du mycélium végétatif. Ceci est utilisé pour l'identification de genres et d'espèces (De Hoog et Guarro, 1995).

Les cellules conidiogènes non différenciées sont intégrées dans les hyphes, intercalaires ou situées dans une position terminale (ex : *Aureobasidium*).

Les cellules conidiogènes sont différenciées. Elles peuvent alors être :

- ✓ directement insérées sur les filaments végétatifs (ex : *Acremonium*, *Fusarium*)
- ✓ bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores dispersés sur le thalle végétatif :

a) regroupées à l'extrémité dilatée du conidiophore, formant une tête (ex : *Aspergillus*) ;

b) regroupées en verticille au sommet du conidiophore, formant un pinceau (ex : *Penicillium*) ;

c) disposées en verticille le long du conidiophore (ex : *Verticillium*) ;

- ✓ bien distinctes des filaments végétatifs, portées par des conidiophores groupés :
- ✓ conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, agrégés en une gerbe sporifère nommée corémie (ex : *Graphium*) ;
- ✓ conidiophores agrégés en coussinets superficiels nommé sporodochie (ex : *Myrothecium*).

- **Présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée**

Les structures protectrices issues de la reproduction asexuée sont les pycnides et les acervules :

- ✓ Les pycnides sont des nodules mycéliens, creux, composés d'une paroi épaisse formée par un feutrage compact de filaments mycéliens. La face interne de la paroi est tapissée des conidiophores produisant des conidies qui sont libérées à maturité par l'ostiole (*Phoma*).
- ✓ Les acervules sont des agrégats de filaments mycéliens enchevêtrés, solidement attachés sur un végétal délimitant une cavité avec une ouverture. A l'intérieur, on retrouve une assise de conidiophores produisant les conidies.

Sur les milieux de culture seules les pycnides sont visibles, les acervules ne se formant que dans les tissus de l'hôte végétal (De Hoog et Guarro, 1995).

Les structures protectrices issues de la reproduction sexuée peuvent être observées chez les Ascomycètes ; l'ascocarpe, qui protège l'asque peut être de plusieurs types:

- a) les apothécies : l'ascocarpe est ouvert, en forme de coupe, portant les asques en surface ;
- b) les cléistothèques : l'ascocarpe est arrondi et lisse ; il n'y a pas de réseaux mycéliens périphériques ; il est clos et sa paroi se fissure à maturité pour libérer les asques sphériques octosporées (ex : *Emericella*) ;
- c) les périthèces : l'ascocarpe à la forme d'une bouteille avec, à l'extrémité rétrécie, une ouverture (ostiole) ; le périthèce renferme des asques allongés, entourés d'une paroi à simple membrane (unitunique) ou à deux membranes (bitunique) et contenant chacun 8 ascospores (*Chaetomium*) ;

- **Présence des chlamydospores**

Les chlamydospores sont des éléments de résistance qui sont formés à partir du filament mycélien ou à son extrémité. Elles ont une paroi épaisse. Contrairement aux autres spores, les chlamydospores ne possèdent pas de mécanismes de libération permettant leur dissémination à maturité. Bien que peu spécifiques puisqu'elles se retrouvent pratiquement chez toutes les espèces lorsque les conditions sont défavorables, elles peuvent cependant constituer une aide dans l'identification lorsqu'elles apparaissent précocement (comme chez certaines espèces de *Fusarium*).

2-9-2-3-Techniques d'identification

Conventionnellement, l'identification des genres fongiques repose sur l'observation de critères morphologiques : d'une part par l'observation macroscopique du mycélium (aspect, couleur et odeur des colonies) et d'autre part, par une observation microscopique des structures reproductrices (Diguta, 2010).

2-9-2-3-1-Identification morphologique

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,...) (Cahagnier et Richard-Molard, 1998).

2-9-2-3-2-Tests biochimiques

Des tests biochimiques peuvent également être utilisés pour caractériser les moisissures tels que les tests en galerie API (20C ou ID 32C) ou les tests en plaque Biolog TM. La technologie BiologTM utilise des microplaques 96 puits prêts à l'emploi avec 95 substrats carbonés de 6 à 8 classes différentes pour une meilleure discrimination. La capacité d'un isolat à métaboliser chaque substrat est mesurée par la présence ou l'absence d'une coloration rouge pour les champignons filamenteux. Cette coloration est due à l'oxydation du iodonitrotetrazolium par la respiration cellulaire des micro-organismes. Le virage de certains puits crée une empreinte phénotypique qui est analysée par le logiciel pour identifier ou caractériser un organisme. Mais l'utilisation de ces tests Biolog s'accompagne souvent d'observations macroscopiques et Microscopiques.

L'identification conventionnelle ou biochimique des moisissures ne permet pas une identification fiable et nécessite souvent une confirmation d'identification par séquençage. C'est pourquoi, de nombreuses méthodes moléculaires d'identification ont été développées afin de permettre une meilleure spécificité d'identification des moisissures et de diminuer la durée de l'identification sans passer par une étape de séquençage.

2-9-2-3-3- Identification génétique

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturales et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (Paterson, 2003; Hinrikson *et al.*, 2005 ;Feuilhade de Chauvin, 2005 ; Jin *et al.*, 2004 ; Reiss *et al.*, 1998). Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerase chain reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson *et al.*, 2005).

2-9-2-3-4- Identification des genres par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Chabasse, 2002). Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements (G×10, G×40 et G×100) à l'aide d'un microscope type (Motic digital microscope DMB série).

2-9-2-3-5- Identification des genres par la technique de micro-culture

Décrite par Haris (1989), la technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petits carrés, de milieu PDA acidifié et les recouvrir par une lamelle. Les spores sont ensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements ($\times 10$, $\times 40$ et $\times 100$). Les genres sont déterminés par les caractères culturaux et microscopiques en se référant au manuel de (Barnett et Hunter ,1972).

Chapitre 3

Activité antibactérienne
des champignons

3- Activité antibactérienne des champignons

L'activité antibactérienne d'une souche fongique se manifeste, généralement, suite à la libération de métabolites secondaires ou encore après excrétion de mycotoxines.

3-1- Les Métabolites secondaires fongiques

Beaucoup de mycètes peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (Demain et Fang, 2000). Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses. Habituellement, ils sont sécrétés sous forme de mélange qui représente une structure chimique unique (Boiron, 1996). Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation (Hapwood, 1988 ; Demain et Fang, 2000 ; Calvo et al., 2002). Les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

- Métabolites qui activent la sporulation (acide linoléique et ses dérivés, produits par *Aspergillus nidulans*) (Calvo et al., 2002)
- Pigments nécessaires pour la formation des spores sexuelles et asexuelles
- Métabolites toxiques sécrétés par les colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines).

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

- retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables ;
- protéger les spores en dormance contre des amibes ;
- éliminer les microorganismes concurrents pendant la germination dans l'environnement (Demain et Fang, 2000).

Génétiquement, les gènes responsables de la biosynthèse des métabolites secondaires sont habituellement arrangés dans des faisceaux contenant également les gènes responsables de la résistance à l'action toxique et parfois, des gènes précurseurs de la biosynthèse d'antibiotiques (Martin and Liras, 1989 ; Cundliff, 1989 ; Chater and Bibb, 1997 ; Martin, 1998). Ce processus constitue chez les mycètes un régulateur global de métabolites secondaires appelé Lae A. En effet, ce facteur a été identifié chez *A. nidulans* et plus récemment chez *A.*

fumigatus. Cette découverte a permis d'augmenter ou diminuer la production des métabolites secondaires chez un mycète en modulant l'expression de *Lae A*. Par exemple, l'overexpression du gène *Lae A* augmente considérablement la production de pénicilline chez *A. nidulans*, d'autres métabolites secondaires et diminue la virulence de ce mycète pathogène (Woobok and Keller, 2004 ; Keller and Woobok, 2005).

3-2- Les mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires peu volatiles, élaborés par diverses moisissures sous certaines conditions environnementales. A l'heure actuelle seules certaines espèces de moisissures sont connues comme ayant la capacité de produire des toxines. Leur biosynthèse est dépendante de plusieurs facteurs, dont la température, l'intensité lumineuse, le dioxyde de carbone dans l'air, les éléments nutritifs disponibles et la présence et la présence d'autres espèces en compétition (Hendey *et al.*, 1993). Chaque mycotoxine n'est pas nécessairement spécifique à une moisissure donnée. 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).

Matériels

Et Méthodes



Matériel et méthodes

Ce présent travail est réalisé au niveau de Laboratoire de Mycologie, Biotechnologie et de l'Activité Microbienne. Il porte sur l'isolement et l'identification des moisissures isolées du sol, ainsi que l'étude de leur activité antibactérienne.

1- Isolement des champignons de sol

1-1- Échantillonnage

Les échantillons du sol, utilisés pour cet objectif, sont prélevés à partir d'un sol forestier situé à Chaabet Erassas, Université de frères Mentouri-Constantine (figure 21), au mois d'avril 2015. Les gros débris sont d'abord écartés (plante, racines, pierres, etc...), puis à 10 cm de profondeur, 30 g de sol sont prélevés à l'aide d'une spatule et placés dans un flacon stérile et transportés au laboratoire dans des conditions d'asepsie rigoureuse, selon le protocole décrit par Pochon et Tardieux (1962).



Figure 18 : le site de prélèvement à forêt de chaabet Erassas (A : la forêt de Chaabet Erassas ; B : site de prélèvement ; C : échantillon de sol pour l'analyse)

1.2- Milieu d'isolement

Le milieu utilisé pour l'isolement des moisissures du sol est la gélose PDA (potato dextrose agar) (voir annexe 01). La croissance bactérienne est inhibée par l'addition de

gentamycine aux milieux de culture, avant stérilisation, à la concentration de 5 mg/l (Botton et *al.*, 1999).

1-3-Préparation des dilutions

❖ But

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

❖ Principe

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

1-4- Méthode d'isolement

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

- homogénéiser la suspension mère par agitation du flacon de prélèvement;
- procéder tout d'abord à la numérotation des tubes en les étiquetant respectivement de 10^{-1} à 10^{-4} cellules/ml pour les différentes dilutions ;
- prélever à l'aide d'une pipette graduée, 1ml d'échantillon mère, puis l'ajouter à 9ml d'eau physiologique stérile dans un tube à essai, permettant ainsi d'obtenir une suspension microbienne diluée à 10^{-1} par rapport à la suspension mère ;
- ❖ Prélever 1 ml de la suspension 10^{-1} agitée, à l'avance à l'aide d'un vortex, avec une pipette pasteur neuve et diluer dans un second tube à essai contenant 9ml d'eau physiologique stérile, pour arriver à une dilution de 10^{-2} ; et ainsi de suite, à chaque dilution, pour arriver à diminuer la charge microbienne de l'échantillon mère à l'exponentiel de 10^{-4} . Changer les pipettes entre chaque prélèvement

Dilution décimale

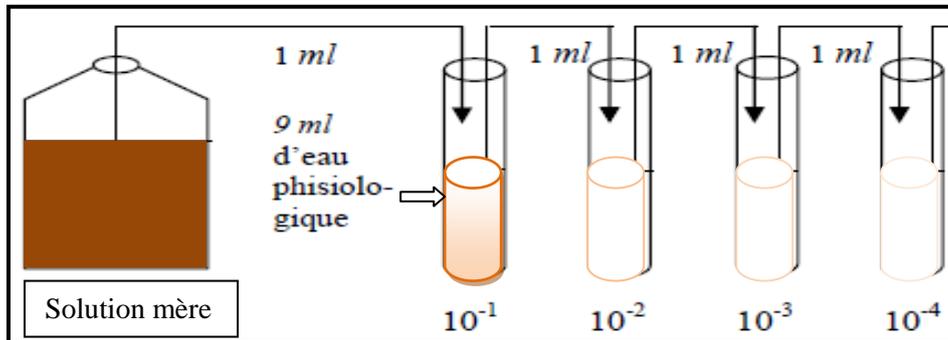


Figure 19 : l'étape de préparation des dilutions après fait la solution mère

1-5- Ensemencement et incubation

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

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

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

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

2- Repiquage et purification

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

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boîte sur

quatre milieux PDA, Sabouraud (annexe 3), Malt agar (annexe 2) et Czapek Dox (annexe 4). Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boîte sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boîte de prélèvement. Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen et les boîtes sont incubées à 28°C pendant six jours jusqu'à obtention des souches pures.

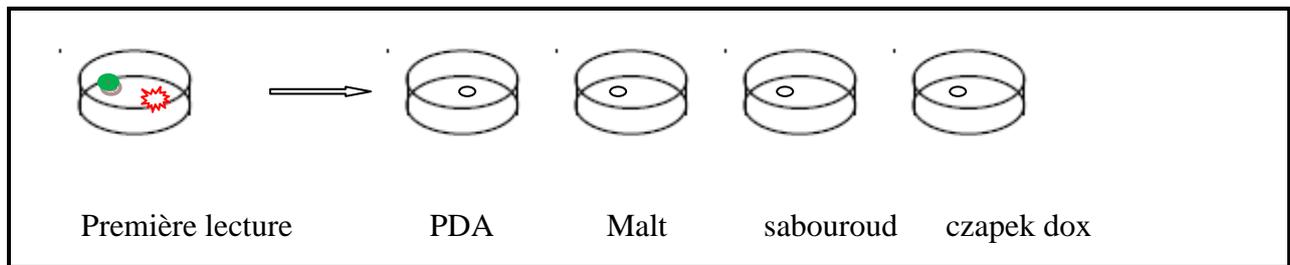


Figure 20: repiquage des boîtes au centre sur différents milieux

3-Identification des souches

L'identification d'une souche représentative est effectuée par deux techniques classiques : une observation macroscopique et une étude microscopique des souches, largement suffisantes pour déterminer le genre des moisissures isolées et cela en réalisant des ensemencements par touches sur des milieux d'études solides favorisant la croissance et la sporulation des moisissures. Les milieux les plus souvent utilisés à ces fins sont PDA, Sabouraud, Malt agar, Czapec dox.

3-1- Etude macroscopique

Les caractères morphologiques et culturels sont déterminés après ensemencement des souches pures sur les milieux de cultures spécifiques. L'identification se fait à l'œil nu, elle se base essentiellement sur les caractères suivants: la vitesse de croissance, l'aspect du mycélium aérien, couleur de l'envers de la colonie, l'odeur et la couleur des moisissures.

3-2- Etude microscopique

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

- Ruban adhésif : un petit morceau du ruban adhésif est appliqué par la face collante sur la colonie puis déposé sur une lame porte-objet.
 - Lactophénole bleu de coton : un fragment de la colonie est prélevé à l'aide d'une anse de platine et déposé sur une lame porte-objet dans une goutte de colorant, ensuite recouvrir avec une lamelle couvre – objet qui écrase la préparation (Chabasse et al., 2002).
- L'observation microscopique est effectuée en microscope optique aux différents grossissements (GX10, GX40) ainsi qu'à l'immersion (GX100).

4- Etude de l'activité antibactérienne

4-1- Bactéries tests

L'activité antibactérienne, de plusieurs genres de moisissures, a été testée vis-à-vis de deux bactéries provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC). Il s'agit d'une bactérie Gram négative, *Klebsiella pneumoniae*, et d'une bactérie Gram positive, *Entérocoque* (voir annexe 7).

4-1-1- Réactivation de bactéries test

A partir du tube de conservation les deux bactéries test sont revivifiées dans des bouillons nutritifs. Une culture bactérienne jeune est obtenue après incubation à 37°C pendant 24 heures.

4-2- Sélection des isolats producteurs de substances antibactériennes

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée, on ensemence uniformément toute la surface des boîtes contenant le milieu Muller-Hinton (annexe 6). Après séchage de la surface (environ 5 min), on dépose des disques de 5 mm de diamètre d'une colonie mycélienne de 6 à 7 jours, réactivée sur PDA, Malt agar, Sabouraud, Czapek dox (Figure 21). Après un deuxième séchage, les boîtes de Pétri sont incubées à 28°C pendant 48 h. Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés au millimètre près (Prescott, 1995; Madigan et al., 1997).

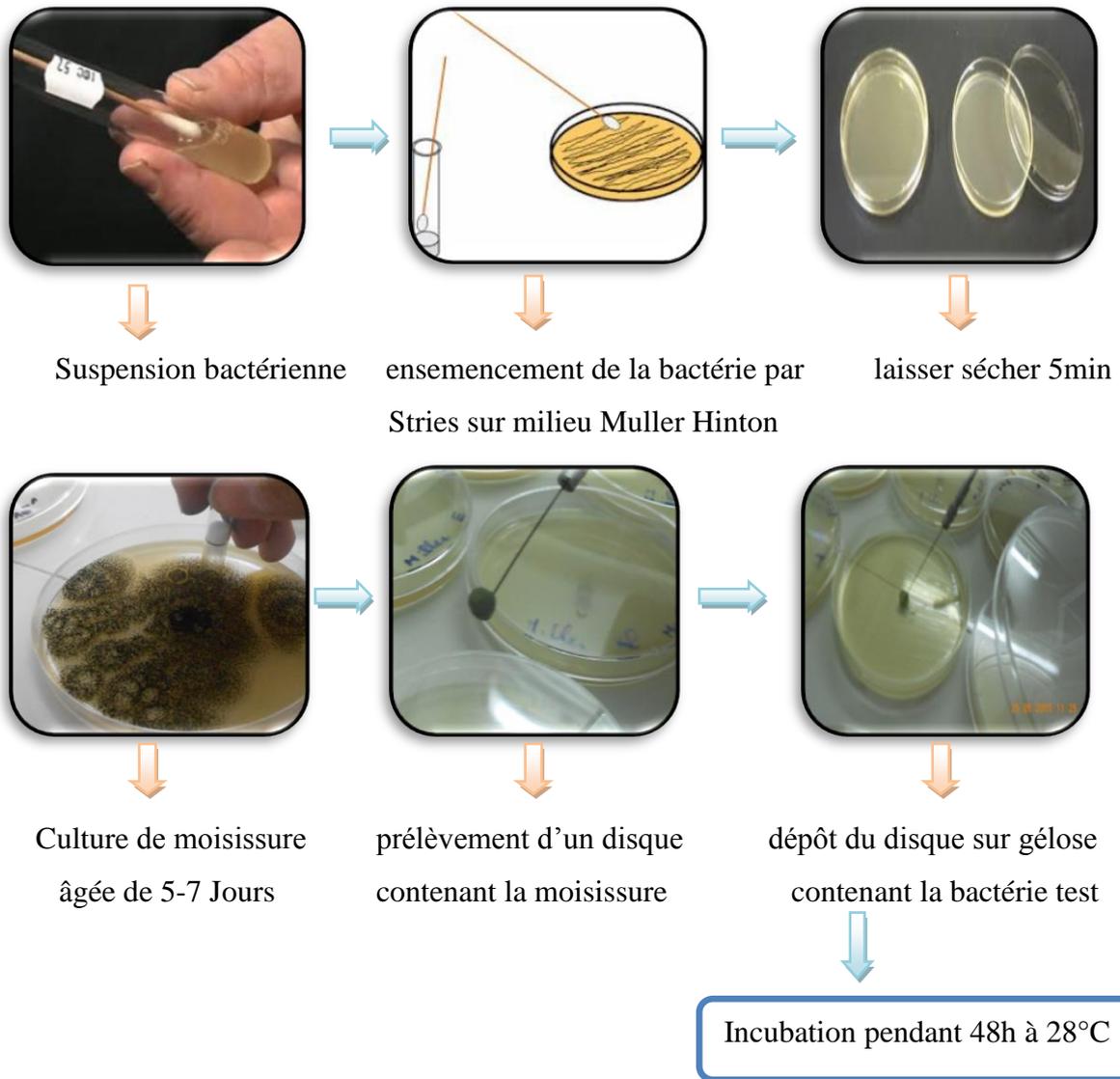


Figure 21 : Illustration de la technique des tests antibactériens

Résultats

Et Discussions



Résultat et Discussion

1- Isolement des champignons de sol

Les cultures réalisées à partir des dilutions décimales d'échantillon de sol de la forêt de Chaabet Erassas ont abouti à des aspects, de texture et de couleurs différentes sur milieu PDA. Nous avons pu sélectionner 22 colonies que nous avons purifiées.

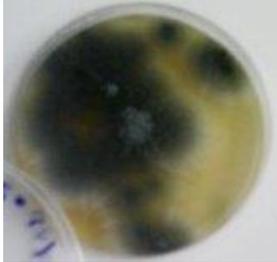
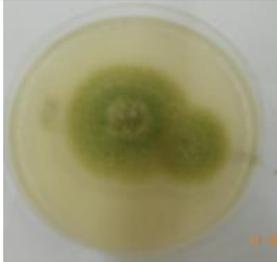
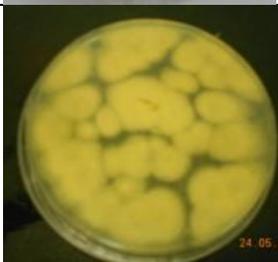
2-Identification des souches

L'identification de ces genres 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.).

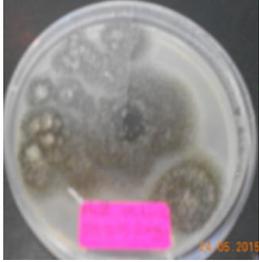
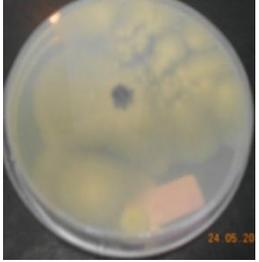
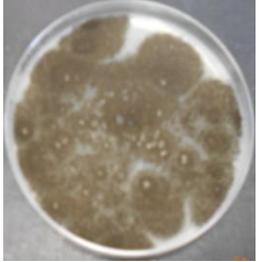
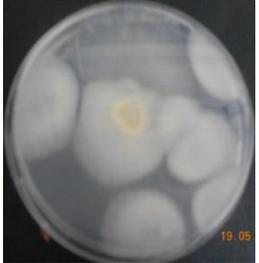
2-1- Etude macroscopique

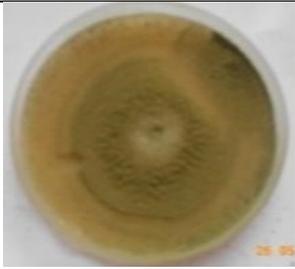
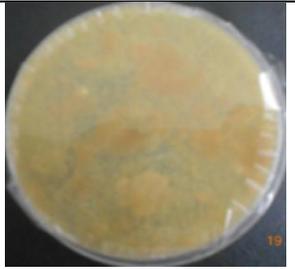
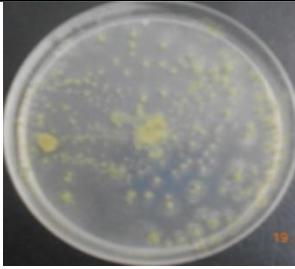
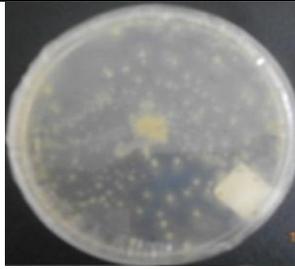
Les caractères macroscopiques des différentes souches sont étudiés sur les quatre milieux PDA, Malt agar, Czapek Dox et Sabouraud, les plus communément utilisés à cet effet (Botton, 1990). Le (Tableau 2) résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la consistance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche.

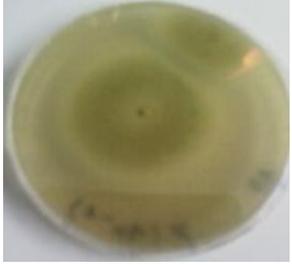
Tableau 2 : Etude Macroscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

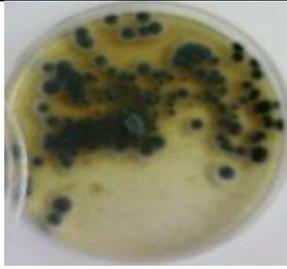
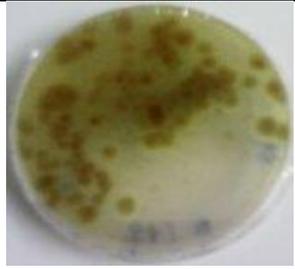
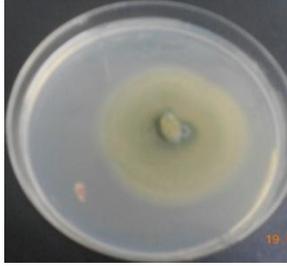
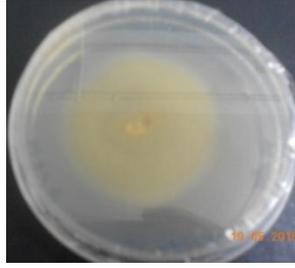
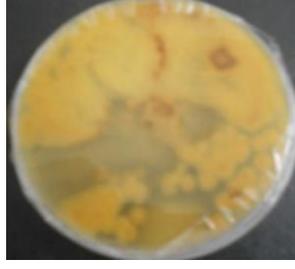
Espèce	Milieu	Description	Aspect macroscopique	
			Face	Revers
S1 <i>Aspergillus sp1</i>	PDA	Couleur : Vert foncé à noir Aspect : Veloutée à poudreuse Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : vert Aspect : poudreuse revers : pas de pigment		
	Sabouraud	Couleur : Grise et centre noir Aspect : Veloutée plissé Revers : pas de pigment		
S2 <i>Aspergillus sp2</i>	PDA	Couleur : Vert pistache Centre blanc Aspect : Veloutée Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : jaune foncé Aspect : laineuse à poudreuse Revers : pas de pigment		

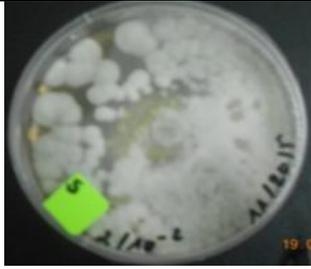
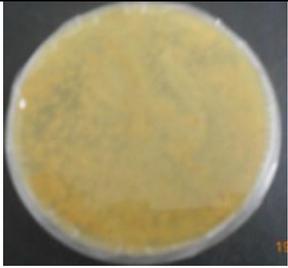
	Sabouraud	Couleur : blanc jaunâtre Aspect : laineuse à poudreuse Revers : pas de pigment		
S3 <i>Aspergillus</i> <i>sp 3</i>	PDA	Couleur : vert Aspect : tapie poudreuse Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : vert Aspect : poudreuse revers : pas de pigment		
	Sabouraud	Couleur : petite tache vert Aspect : poudreuse Revers : pas de pigment		
S4 <i>Aspergillus</i> <i>sp 4</i>	Sabouraud	Couleur : jaune foncé centré par blanc Aspect : cotonneuse à poudreuse irrégulière revers : pas de pigment		

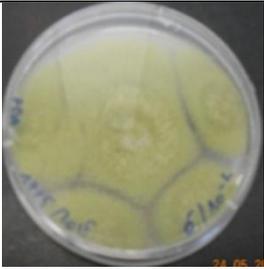
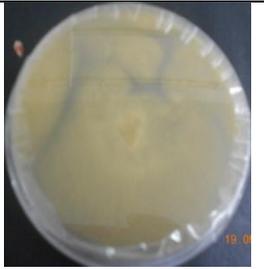
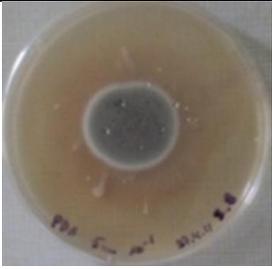
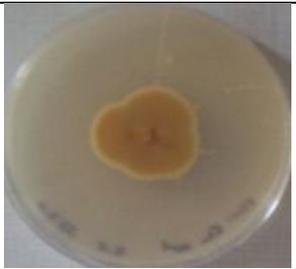
<p>S5 <i>Aspergillus</i> <i>sp 5</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : grise tourné par un cercle blanc Aspect : poudreuse irrégulière plissée Revers : pas de pigment</p>		
	<p>Malt agar</p>	<p>Couleur : noir Aspect : laineuse à Poudreuse Revers : Pas de pigment</p>		
	<p>Sabouraud</p>	<p>Couleur : noir plus foncé Aspect : laineuse Revers : pas de pigment</p>		
	<p>Czapek Dox</p>	<p>Couleur : blanc Aspect : poudreuse irrégulière plissée</p>		

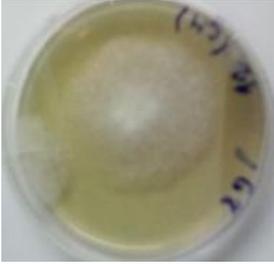
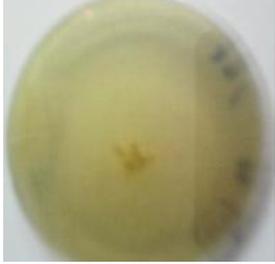
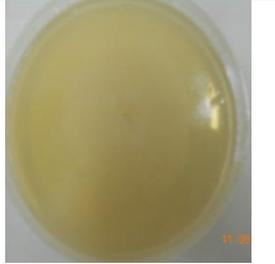
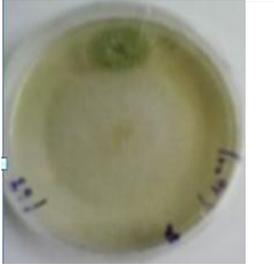
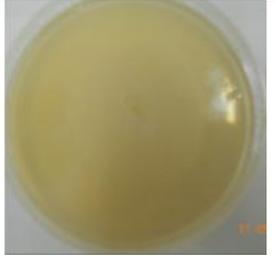
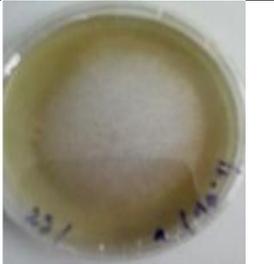
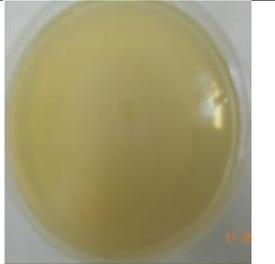
S6 <i>Aspergillus</i> <i>sp 6</i>	PDA	Couleur : vert Aspect : veloutée revers : pas de pigment.		
	Malt agar	Couleur : taches vert. Aspect : duveteuse Revers : pas de pigment.		
	Sabouraud	Couleur : jaune blanchâtre Aspect : poudreuse à Laineuse Revers : pas de pigment		
	Czapek Dox	Couleur : vert Aspect : duveteuse Revers : pas de pigment		
S7 <i>Aspergillus</i> <i>sp 7</i>	PDA	Couleur : noir et blanc Aspect : veloutée à envahissante		

<p>S8 <i>Aspergillus</i> <i>sp 8</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : vert Et centre blanc Aspect : cotonneuse Revers : pas de pigment</p>		
<p>S9 <i>Aspergillus</i> <i>sp 9</i></p>	<p>Sabouraud</p>	<p>Couleur : blanc jaunâtre Aspect : cotonneuse irrégulière plissée Revers : pas de pigment</p>		
<p>S10 <i>Aspergillus</i> <i>sp 10</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : blanc et centre grise Aspect : velouté</p>		
<p>S11 <i>Aspergillus</i> <i>sp 11</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : blanc Aspect : veloutée</p>		
	<p>Malt agar</p>	<p>Couleur : vert claire Aspect : veloutée à poudreuse Revers : pas de pigment</p>		

S12 <i>Penicillium</i> <i>sp1</i>	PDA	Couleur : noir Aspect : veloutée à poudreuse Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : vert claire, centre vert foncé Aspect : veloutée à poudreuse Revers : pas de pigment		
		Couleur : blanc Aspect : veloutée Revers : centre jaune		
S13 <i>Penicillium</i> <i>sp2</i>	PDA	Couleur : blanc Aspect : veloutée Revers : pigment jaune foncé Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : taches grise Aspect : duveteuse Revers pas de pigment		

	Sabouraud	<p>Couleur : grise claire</p> <p>Aspect : veloutée poudreuse irrégulière</p> <p>Revers : pas de pigment</p>		
S14 <i>Penicillium sp3</i>	PDA	<p>Couleur : vert foncé</p> <p>Aspect : Envahissante</p> <p>Revers : pas de pigment</p>		
	Malt agar	<p>Couleur : vert</p> <p>Aspect : duveteuse</p> <p>Revers : pas de pigment</p>		
	Sabouraud	<p>Couleur : blanc jaunâtre</p> <p>Aspect : veloutée</p> <p>Revers : pas de pigment</p>		
	Czapek Dox	<p>Couleur : mélange avec grise et blanc</p> <p>Aspect : veloutée</p> <p>Revers : pas de pigment</p>		

<p>S15 <i>Penicillium</i> <i>sp4</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : vert Aspect : poudreuse Envahissante</p>		
<p>S16 <i>Penicillium</i> <i>sp5</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : brun verdâtre Aspect : velouté à poudreuse des gouttelettes d'exsudat en surface Revers : rougeâtre</p>		
<p>S17 <i>Penicillium</i> <i>sp6</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : brun verdâtre Aspect : veloutée à Poudreuse Revers : pas de pigment</p>		
<p>S18 <i>Penicillium</i> <i>sp7</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : vert à noirâtre Aspect : veloutée à Poudreuse Revers : pas de pigment</p>		
<p>S19 <i>Penicillium</i> <i>sp8</i></p>	<p>PDA</p>	<p>Couleur : vert noirâtre Aspect : veloutée Revers : pas de pigment</p>		

S20 <i>Absidia sp1</i>	PDA	Couleur : blanc Aspect : cotonneuse Revers : pas de pigment		
	Malt agar	Couleur : blanc Aspect : cotonneuse bombé Revers : pas de pigment		
S21 <i>Absidia sp2</i>	Sabouraud	Couleur : blanc Aspect : cotonneuse Revers : pas de pigment		
S22 <i>Rhizomucor sp1</i>	Sabouraud	Couleur : blanc Aspect : Cotonneuse bombé Revers : pas de pigment		

2-2- Etude microscopique

L'étude microscopique porte sur l'observation des structures caractéristiques des 22 souches fongiques (Conidiophores, conidies et mycélium) 04 genres des Champignons sont mis en évidence sur le tableau 3.

➤ **01 souche présente les caractéristiques suivantes :**

- ✓ Filaments larges peu ou pas septés.
- ✓ Les rhizoïdes et les stolons sont présents, mais parfois difficiles à reconnaître.

✓ Les sporocystophores sont assez courts, avec des ramifications subterminales en sympodes.

✓ Les sporocystes sont foncés (noirs), recouverts d'aspérités.

✓ La columelle est bien développée, mais il n'y a pas d'apophyse.

✓ Les spores sont globuleuses (3 à 4 µm de diamètre), lisses et hyalines .

Cette souche appartient probablement au genre *Rhizomucor* (Wehmer ex Vuillemin; 1936)

➤ **02 souches présentent les caractères suivants :**

✓ Filaments larges (5 à 15 µm) peu ou pas septés.

✓ Sporocystophores isolés ou groupés, fixés au milieu des stolons et ramifiés en grappe ou en corymbes. Ils se terminent par une large apophyse conique (évasement en forme d'entonnoir).

✓ Sporocystes de 10 à 120 µm de diamètre, d'aspect piriforme avec une columelle hémisphérique.

✓ Spores cylindriques lisses, jaunâtres, de 3,4 à 4,6 µm de long sur 2,8 à 3,8 µm de large.

✓ Rhizoïdes peu nombreux, situés sur les stolons à distance des sporocystophores.

✓ Chlamydo-spores absentes ou peu nombreuses, contrairement au genre *Chlamydoabsidia* non décrit dans cet ouvrage.

Ces souches appartiennent probablement au genre *Absidia* (Saccardo et Trotter , 1912)

➤ **11 souches présentent les caractéristiques suivantes :**

✓ Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).

Ces souches semblent appartenir au genre *Aspergillus*

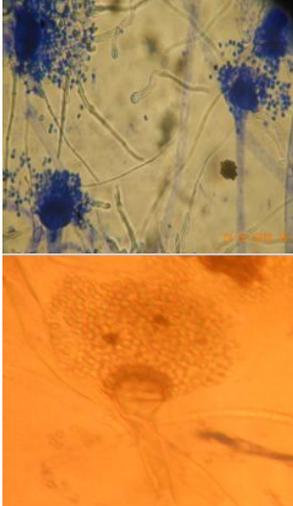
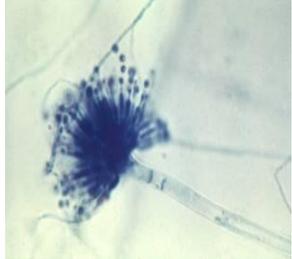
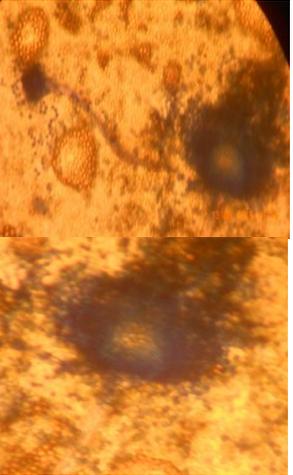
➤ **08 souches caractérisées par:**

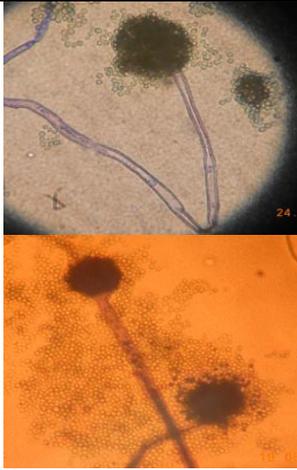
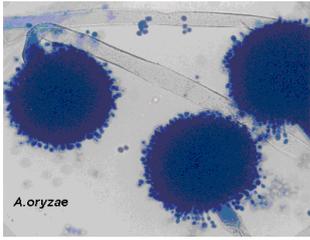
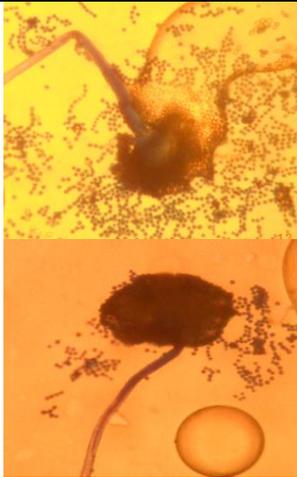
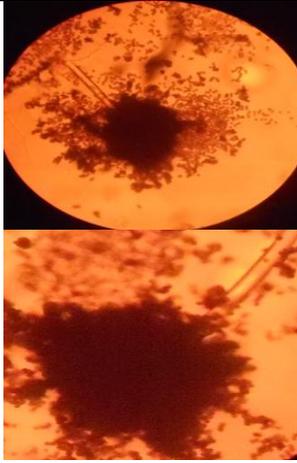
✓ Des conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné (disposition en pinceau).

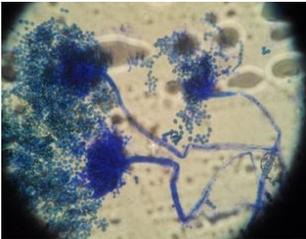
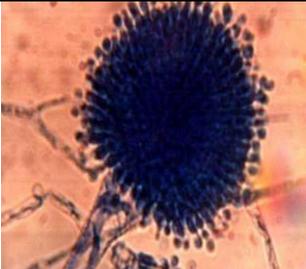
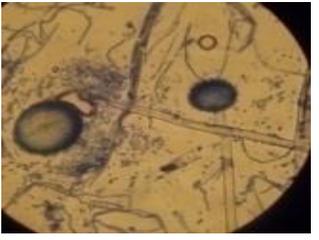
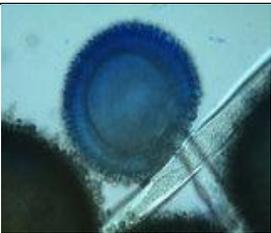
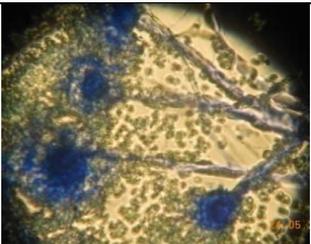
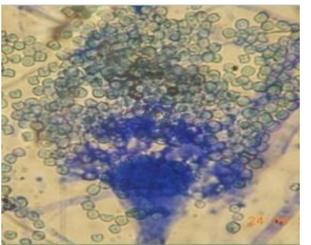
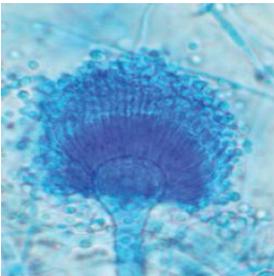
✓ Des phialides à col peu développées disposés en pinceaux serrés.

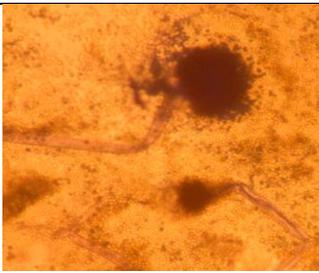
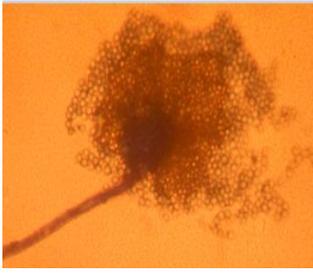
Ces souches appartiennent probablement au genre *Penicillium*

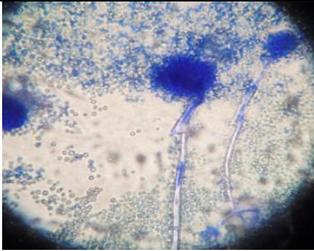
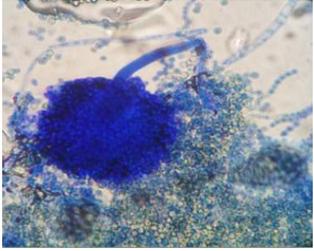
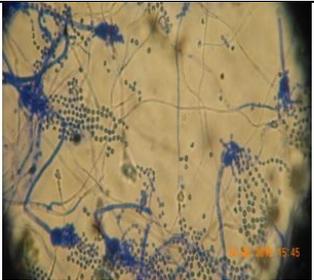
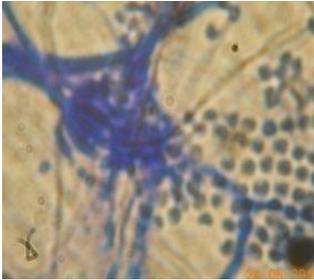
Tableau 3: Etude Microscopique des souches fongiques isolées à partir du sol

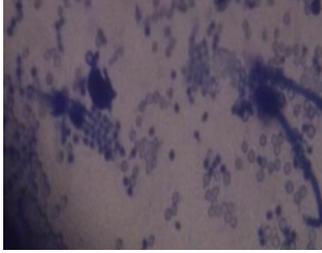
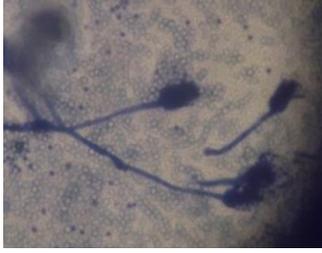
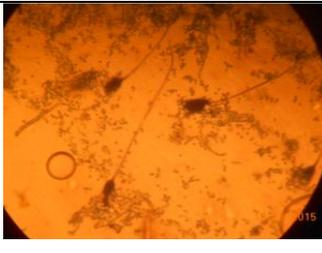
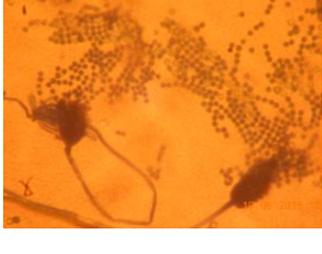
Espèce	Description	Aspect microscopique	Photo référence
<p>S1 <i>Aspergillus</i> <i>Sp 1</i></p>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux -conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicules; -Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules; -Têtes conidiennes unisériées ou bisériées; -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires</p>		 <p>Tiraboshi ,1929</p>
<p>S2 <i>Aspergillus</i> <i>Sp 2</i></p>	<p>-Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>		

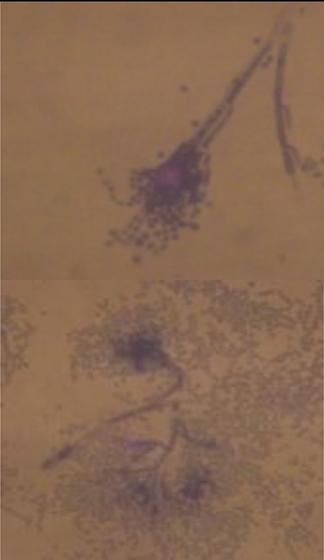
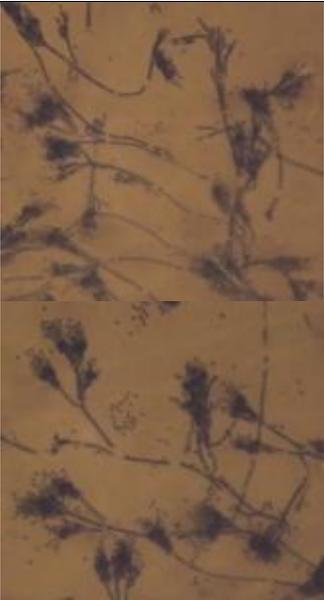
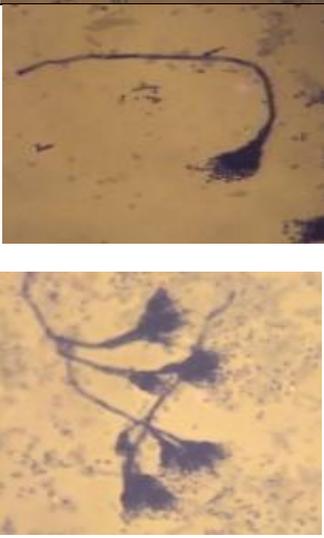
<p>S3 <i>Aspergillus</i> Sp 3</p>	<p>Hyphe : septés -Conidiophore : long , et non cloisonné, hylines -Phialides : directement insérées sur la vésicule -Conidies : globulaires, vert pale, échinulées -Tête aspergillaire : unisériée, radiée</p>		 <p><i>A.oryzae</i></p>
<p>S4 <i>Aspergillus</i> Sp 4</p>	<p>-Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>		 <p>La tête de conidie Willh (Raper et <i>al.</i>, 1965)</p>
<p>S5 <i>Aspergillus</i> Sp 5</p>	<p>Hyphe : septés -Conidiophore : très longs et non cloisonné -Phialides : portées par des métules insérées sur la vésicule -Conidies : globulaires -Tête aspergillaire : bisériée , radiée</p>		 <p>Van Tieghen, 1867</p>

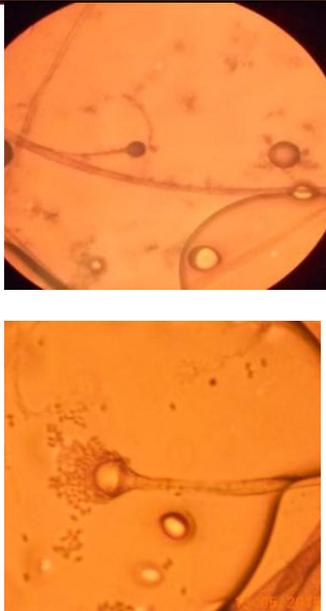
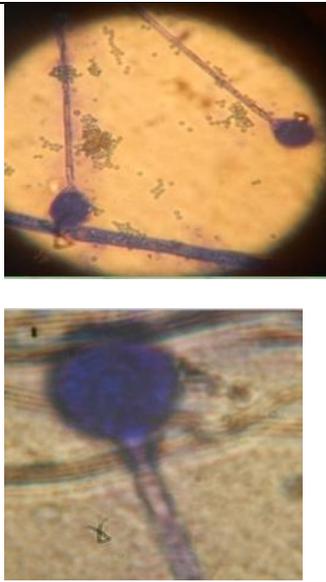
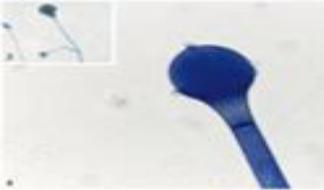
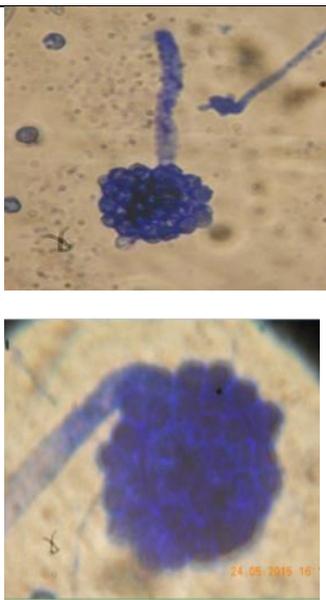
<p>S6 <i>Aspergillus</i> Sp 6</p>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores non ramifiés, terminés en vésicules; -Phialides formées directement sur la vésicule -Têtes conidiennes unisériées -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires</p>	 	
<p>S7 <i>Aspergillus</i> Sp 7</p>	<p>- Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire)</p>	 	 <p>http://tsjok45.multiply.com/photos/album/1656/Fungi_II</p>
<p>S8 <i>Aspergillus</i> Sp 8</p>	<p>- Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>	 	 <p>Thom, 1918</p>

<p>S9 <i>Aspergillus</i> <i>Sp 9</i></p>	<p>-Thalle à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores non ramifiés, terminés en vésicules; -Phialides formées directement sur la vésicule ou sur des métules; -Têtes conidiennes unisériées ou bisériées; -Masse conidienne rayonnante, les conidies en chaînes unicellulaires</p>	 	
<p>S10 <i>Aspergillus</i> <i>Sp 10</i></p>	<p>Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>	 	

<p>S11 <i>Aspergillus</i> Sp 11</p>	<p>Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>	 	
<p>S12 <i>Penicillium</i> Sp 1</p>	<p>Des conidies produites par des phialides insérées à l'extrémité dilatée d'un conidiophore large et non cloisonné (disposition en tête aspergillaire).</p>	 	 <p>Link,1909</p>
<p>S13 <i>Penicillium</i> Sp 2</p>	<p>-Mycélium cloisonné -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore</p>	 	

<p>S14 <i>Penicillium</i> <i>Sp 3</i></p>	<p>-Mycélium cloisonné -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore</p>	 	
<p>S15 <i>Penicillium</i> <i>Sp 4</i></p>	<p>-Mycélium cloisonné -Conidiophores isolés, ramifiés, terminés par un pénicille ; -Pénicille constitué de phialides branchées directement à l'extrémité du conidiophore</p>	 	
<p>S16 <i>Penicillium</i> <i>Sp 5</i></p>	<p>Des conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné (disposition en pinceau). -Des phialides à col peu développés disposées en pinceaux serrés.</p>	 	

<p>S17 <i>Penicillium</i> Sp 6</p>	<p>-Hyphe : septé, hyalines, portent des conodiophores -Conidiophore : ramifiés , cylindrique, cloisonnés -Phialides : disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores -Conidies : rondes , lisse</p>		
<p>S18 <i>Penicillium</i> Sp 7</p>	<p>Des conidies produites par des phialides groupées en verticilles à l'extrémité non dilatée d'un conidiophore fin et cloisonné (disposition en pinceau). -Des phialides à col peu développés disposées en pinceaux serrés.</p>		
<p>S19 <i>Penicillium</i> Sp 8</p>	<p>-Hyphe : septé, hyalines, portent des conodiophores -Conidiophore : ramifiés cylindrique, cloisonnés -Phialides : disposées en pinceaux ou pénicilles serrés, insérées par l'intermédiaire des métules sur les conidiophores -Conidies : rondes</p>		 <p>http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/rakot_02.htm</p>

<p>S20 <i>Absidia</i> Sp 1</p>	<p>Sporocystophore ramifié terminé par une columelle faisant saillie dans le sporocyste globuleux</p>		
<p>S21 <i>Absidia</i> Sp 2</p>	<p>- Sporocystophore ramifié terminé par une columelle faisant saillie dans le sporocyste globuleux</p>		 <p>(Cohn) Saccardo et Trotter (1912)</p>
<p>S22 <i>Rhizomucor</i> Sp 1</p>	<p>-Rhizoides et court sporocystophore à ramification subterminales -Après rupture du sporocyste , on visualise une columelle bien développée sans apophyse .</p>		 <p>Lucet et Constantin) Wehmer ex Vuillemin (1936)</p>

L'isolement à partir du sol de Chaabet Erassas a permis l'obtention de 22 isolats fongiques appartenant à 4 genres : *Aspergillus*, *Absidia*, *Penicillium* et *Rhizomucor*.

L'analyse des résultats montre, par ordre décroissant, que le genre majoritaire est *Aspergillus* avec une fréquence de 50 %, suivie du genre *Penicillium* avec un pourcentage de 37 %, le genre *Absidia* avec un pourcentage de 9% et enfin *Rhizomucor* avec un pourcentage de 4 %.

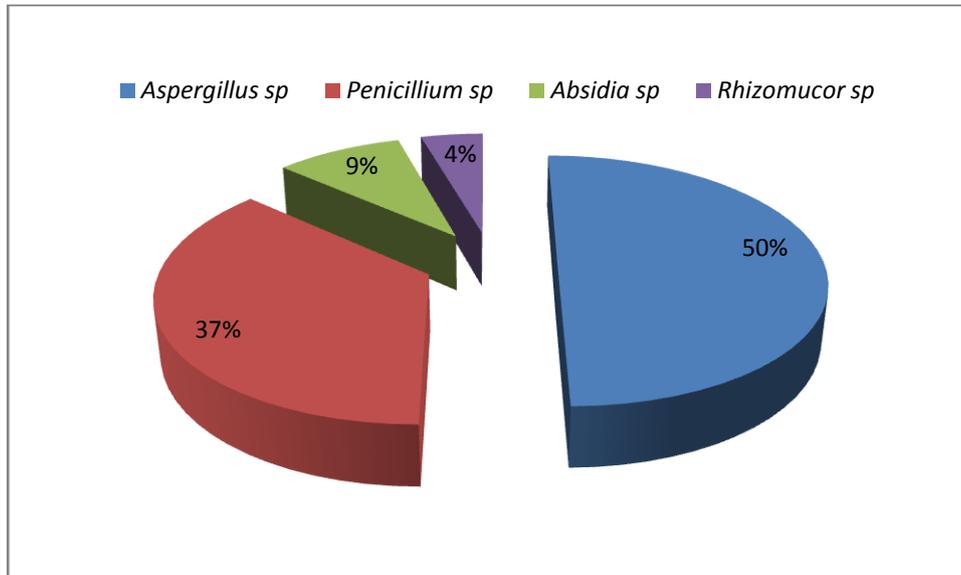


Figure 22 : Genres fongiques isolés du sol de Chaabet Erassas.

Ces genres fongiques sont présents dans la majorité des sols de toutes natures, Alvarez-Rodriguez *et al.*, 2003 et Boiron en 1996 ont déclaré qu' *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus* sont des souches autochtones, habituellement isolées à partir de la plupart des terrains.

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

Il a même été rapporté qu'*Aspergillus* et *Penicillium* ont été les espèces majoritairement isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) avec un pourcentage de 50 % et 19%, respectivement par Kachour en 2005.

Nos résultats sont donc en concordance avec ceux de Abdlaziz en 2006, qui a pu isoler le genre *Aspergillus* majoritairement avec une fréquence de 37.5% regroupant 6

espèces différentes dont : *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger*, à partir du sol aride et avec une fréquence de 42.85% à partir d'un autre sol de CHEGGA.

3- Etude de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des moisissures a été largement décrite *in vitro* dans plusieurs études. Dans cette étude nous avons testé l'activité antibactérienne d'un total de 15/22 espèces appartenant aux genres d'*Aspergillus*, *penicillium*, *Absidia* et *Rhizomucor* vis-à-vis de deux bactéries tests *Klebsilla pneumoniae* ATCC 700603 (Gram -) et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Gram+).

La plupart des isolats (9/15 espèces) ont développé une activité antibactérienne au moins sur une des bactéries tests. En effet une zone de lyse de taille différente autour des disques déposés a été mise en évidence (Figure 23). La lecture des résultats se fait par la mesure des diamètres de la zone d'inhibition autour de chaque disque à l'aide d'un pied à coulisse (mm).

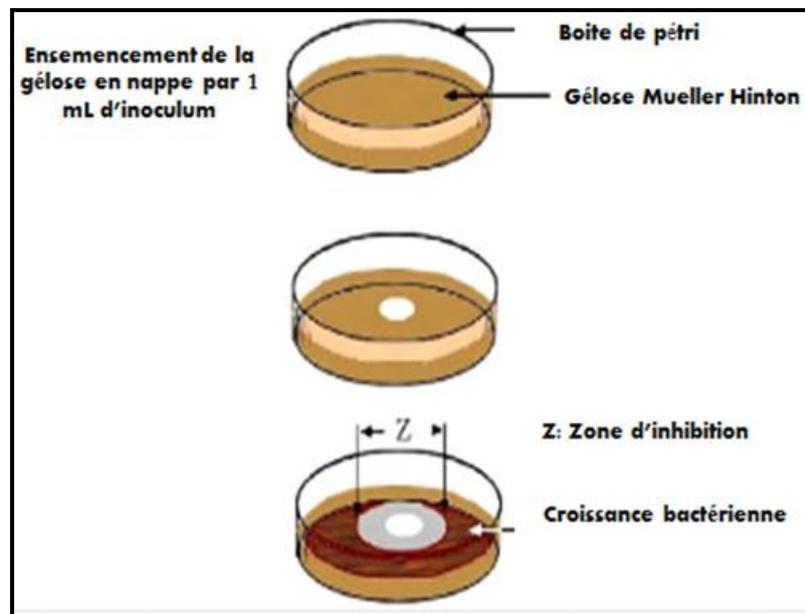


Figure 23 : Résultats attendus après réalisation des tests par la méthode des disques

L'activité antibactérienne contre les deux bactéries pathogènes à l'homme a été évaluée en observant la zone d'inhibition de la croissance d'espèces testées en contact

de nos moisissures, les diamètres d'inhibition relevés sont regroupés dans le tableau ci- dessous (Tableau 4) :

Tableau 4 : Activités antibactériennes développée par l'ensemble des isolats sur les bactéries test.

N° d'isolat	Les souches fongiques présumées	Disque prélevé sur Milieu de culture	Diamètre de la zone d'inhibition Ø (mm) sur les bactéries test	
			<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>
1	<i>Aspergillus sp1</i>	PDA	-	30
		Sabouraud	-	-
2	<i>Aspergillus sp2</i>	PDA	-	19
		Sabouraud	-	16
3	<i>Aspergillus sp3</i>	PDA	8	26
		Malt agar	9	25
4	<i>Aspergillus sp4</i>	PDA	-	-
		Sabouraud	-	-
5	<i>Aspergillus sp5</i>	PDA	-	-
		Malt agar	-	20
		Czapek dox	-	23
6	<i>Aspergillus sp6</i>	PDA	-	-
		Sabouraud	-	-
		Czapek dox	-	-
10	<i>Aspergillus sp 10</i>	Malt agar	-	-
		Sabouraud	-	-
11	<i>Aspergillus sp11</i>	PDA	-	-
12	<i>Penicillium sp1</i>	PDA	-	20
		Czapek dox	-	-
13	<i>Penicillium sp2</i>	PDA	-	-
		Malt agar	-	-
		Sabourud	-	-
		Czapek dox	-	-
14	<i>Penicillium sp3</i>	PDA	-	-
		Sabouraud	-	-
		Czapek dox	-	25
		Malt agar	-	25
15	<i>Penicillium sp4</i>	PDA	15	12
		Malt agar	-	-
16	<i>Penicillium sp 5</i>	Czapek dox	15	12
		Malt agar	-	-
20	<i>Absidia sp1</i>	PDA	-	14
21	<i>Absidia sp2</i>	PDA	-	-
		Sabouraud	-	-
		Czapek dox	-	-
		Malt agar	-	-
22	<i>Rhizomucor sp</i>	Sabouraud	14	-

▪ Test antibactérien contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

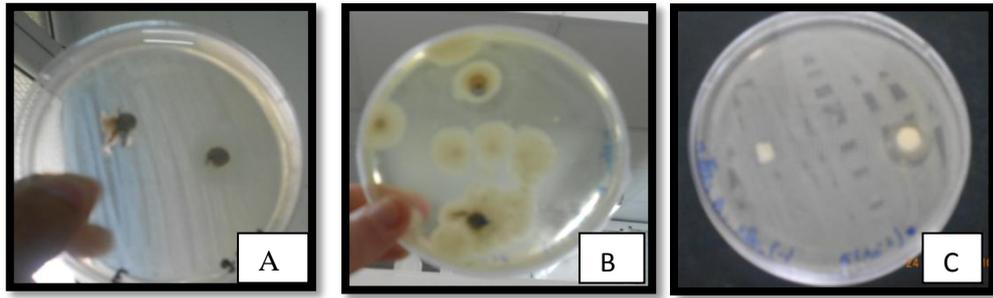


Figure 24 : Effet d'*Aspergillus sp 3* (A) , *Rhizomucor sp* (B) et *Penicillium sp 5* (C) sur *K. pneumoniae*

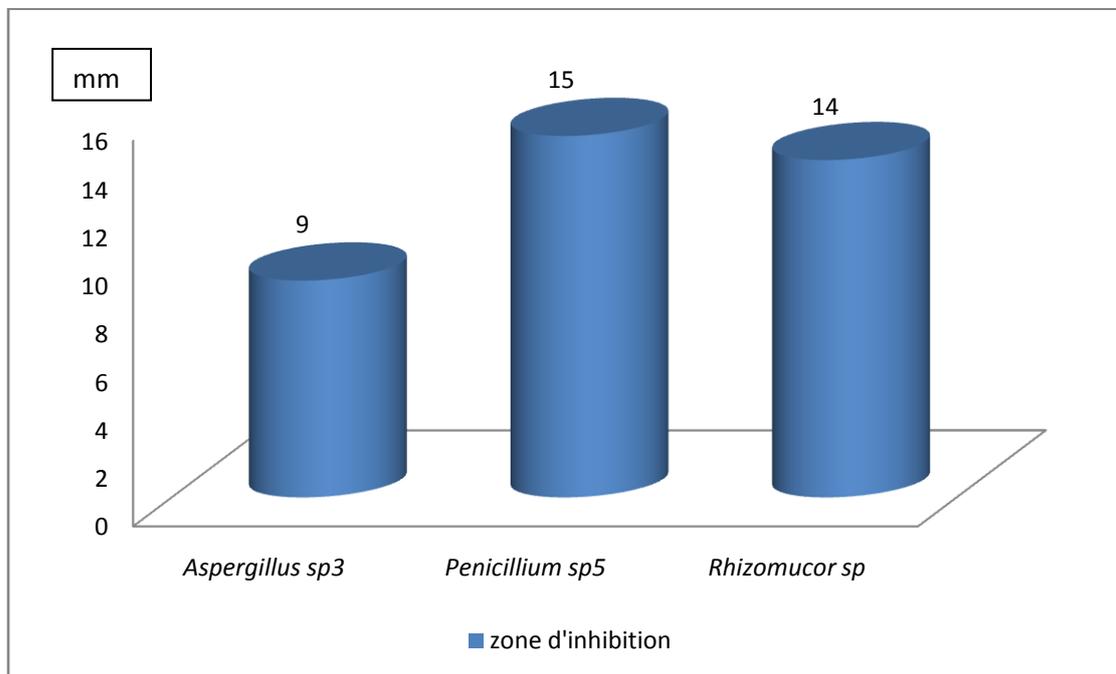


Figure 25 : La variation de zone d'inhibition entre différentes souches et *K. pneumoniae*

Parmi les 15 espèces de moisissures testées, seulement 3 ont montré un effet antibactérien vis-à-vis de *K. pneumoniae* Gram (-), à savoir : les espèces à fort effet antibactérien *Penicillium sp 5* et *Rhizomucor sp*, avec une zone de lyse égale à 15mm et 14 mm respectivement. *Aspergillus sp 3* considéré comme espèce à moyen effet antibactérien, avec une zone de lyse égale à 9 mm.

Selon (Botton *et al.*, 1990), ces 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 (Attalah and Kacem-chaouche, 1992).

Nos résultats peuvent aussi être interpréter par la présence d'une capsule chez *K. pneumoniae*, dite polysidique, composée de plusieurs sucres. Cette capsule intervient dans la défense de la bactérie contre les agents antibactériens. *K. pneumoniae* est donc considérée comme résistante aux différentes attaques antibactériennes des autres moisissures testées.

En plus de cette résistance, *Klebsiella* produit naturellement des B-lactamases, enzymes qui dégradent la B-lactamines (penicilline A) produite par le genre *Penicillium* (Smaoui, 2010).

Nos résultats sont conformes à ceux trouvés dans la littérature par Laredj en 2004 qui a noté une faible sensibilité de *K.pneumoniae* à l'huile essentielle de menthe, et qui a relié sa faible sensibilité à la nature de sa membrane externe et surtout à la présence de sa capsule.

▪ **Test antibactérien contre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

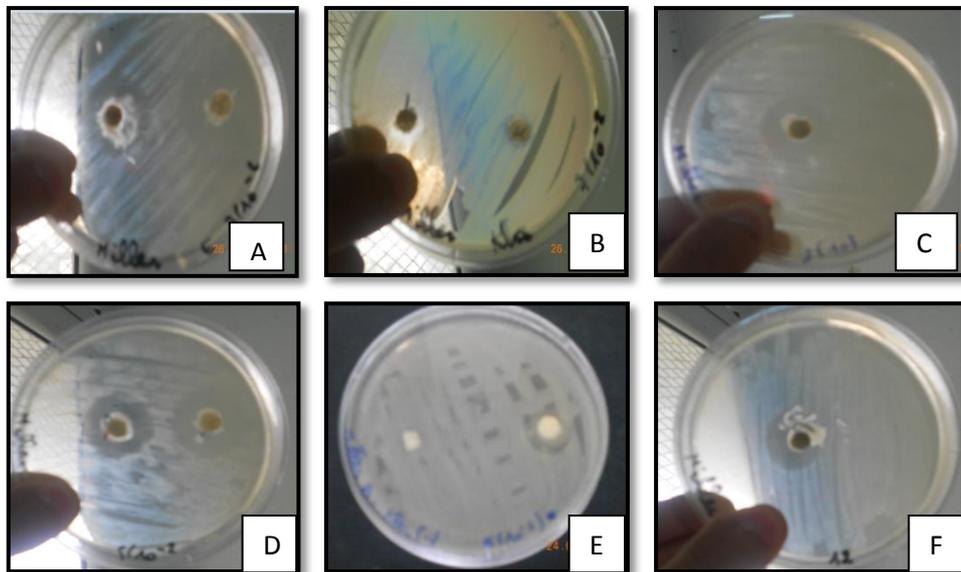


Figure 26 : Effet d'*Aspergillus* sp 2, *Aspergillus* sp 3, *Aspergillus* sp 5, *Aspergillus* sp 11, *Penicillium* sp 4, *Penicillium* sp 5 sur *E.faecalis*

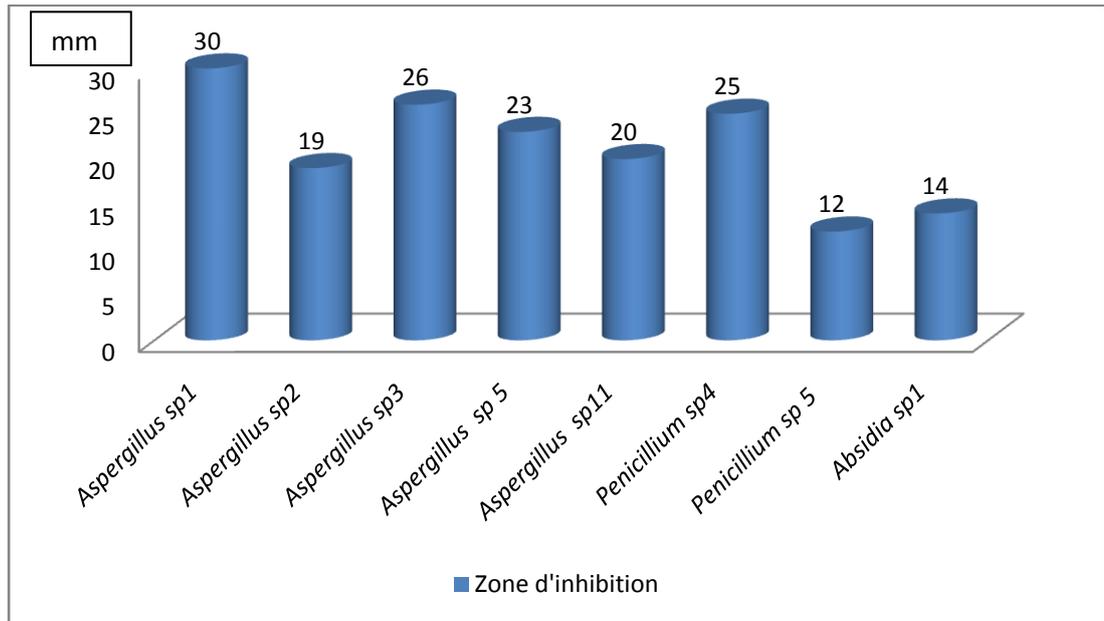


Figure 27 : Variations de zones d’inhibition en fonction des espèces de moisissures isolées contre *E. faecalis*

8/15 espèces de moisissures appartenant à 3 genres : *Aspergillus*, *penicillium* et *Absidia* montrent une activité antibactérienne significative, contre *E. faecalis*, à savoir les espèces à fort effet antibactérien: *Aspergillus sp 1*, *Aspergillus sp 2*, *Aspergillus sp 3*, *Aspergillus sp 5*, *Aspergillus sp 11* et *Penicillium sp 4*, avec une zone d’inhibition entre 19 et 30 mm. *Penicillium sp 5* et *Absidia sp1*, représentent les isolats à effet antibactérien moyen avec une zone d’inhibition entre 12 et 14 mm, respectivement.

Aspergillus sp 3 et *Penicillium sp 5* ont donné un effet antibactérien contre les deux espèces de bactéries.

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*.

En effet, il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de ces substances (Botton *et al.*, 1990) .

Calamita et Doyle en 2002, explique le mécanisme d'action des β -lactamines (produites par le genre *Penicillium*) qui exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier, le blocage de la multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane sera donc dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne.

Conclusion

ET

PERSPECTIVES

Conclusion

Au terme de ce modeste travail, il en ressort que le sol de la région étudiée contient une grande diversité d'espèces fongiques, avec notamment des champignons incriminés en pathologie humaine. Par ailleurs, l'analyse de la nature et de la fréquence d'isolement des champignons selon le site et la période de prélèvement, montre une nette prédominance de la contamination fongique. D'une manière spéculative, on peut déduire que la répartition de la microflore fongique dépend d'un ensemble de facteurs environnementaux telles que les conditions climatiques, leur présence dans l'atmosphère et la présence de matière organique.

Selon les résultats des analyses obtenues par diverses méthodes mycologiques, il semble que la méthode de dilution permet un isolement plus performant des moisissures d'un point de vue qualitatif et quantitatif où les genres les plus dominants sont : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia*, *Rhizomucor*.

L'activité antibactérienne de ces genres contre les souches *Klebsilla pneumoniae* et *Enterococcus faecalis* s'est avérée fort intéressante. En effet, *Penicillium* et *Rhizomucor* ont révélé un diamètre de zone de lyse de l'ordre de 14-15 mm, contrairement au genre *Aspergillus* qui a montré un effet antibactérien de moindre importance.

Pour compléter ce travail sur la flore fongique du sol et de son activité biologique, nous proposons :

- Sur le plan technique : L'utilisation des techniques moléculaires pour détecter même les champignons non cultivables.
- Sur le plan technologique :
 - Les souches de champignons isolées peuvent faire l'objet d'une recherche de certaines propriétés biotechnologiques telles que la production d'antibiotiques.
 - Les compétences acquises dans ce domaine peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité fongique d'autres sols (sable des plages, sol du barrage,...).
- Identification des substances antibactériennes séparées par des méthodes performantes comme la HPLC et la CPG dans l'espoir d'obtenir de nouvelles substances

Abstract

22 fungal strains were isolated from soil sample taken from the forest Chaabat Erassas, Constantine representing 4 genera *Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia* and *Rhizomucor*.

Macroscopic and microscopic study found 11 species belonging to the genus *Aspergillus*, 8 species to the genus *Penicillium*, two species to *Absidia* and one species to *Rhizomucor*.

Analysis of the results showed, in descending order, that the majority of genus was belonged to *Aspergillus* with a frequency of 50%, followed by *Penicillium* genus with a percentage of 37%, *Absidia* with a percentage of 9% and finally with a *Rhizomucor* percentage of 4%.

The antibacterial activity test on *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus faecalis*, bacteria test: showed that only 3 species had a strong antibacterial effect against *K. pneumoniae* Gram (-), *Penicillium sp 5* and *Rhizomucor sp*, with a lysis area equal to 15mm and 14mm respectively. *Aspergillus sp 3* with a medium antibacterial effect, with a lysis area equal to 9 mm. 8/15 mold species have an antibacterial effect against *E. faecalis* Gram (+), namely: *Aspergillus sp* (1, 2, 3, 5 and 11) and *Penicillium sp 4*, with a zone of inhibition between 19 and 30 mm. *Penicillium sp 5* and *Absidia sp 1*, have an antibacterial effect means with a zone of inhibition between 12 and 14 mm. *Aspergillus sp 3* and *Penicillium sp 5* gave a good antibacterial effect against both species of bacteria.

Keywords: Isolation, Identification, Mold, forest floor, antibacterial activity.

ملخص

تم عزل 22 سلالة فطرية من عينات أخذت من تربة الحفر لغابة شعبة الرصاص بقسنطينة و قد وجد 4 جنس .
Absidia, Aspergillus, Penicillium, Rhizomucor
قد اظهرت الدراسة العينية والمجهرية انه في جنس *Aspergillus* يوجد 11 نوع وفي جنس *Penicillium* 8 انواع جنس *Absidia* نوعين، و جنس *Rhizomucor* نوع واحد.
تحليل النتائج يبين ترتيب تنازلي حيث الغالبية تكون لجنس *Aspergillus* بنسبة 50 %،
تليها جنس *Penicillium* بنسبة 37 % ثم *Absidia* بنسبة 9 % - و اخيرا *Rhizomucor* بنسبة 4 %.
اختبار النشاط المضاد للبكتيريا على البكتيريا المعزولة للاختبار كليبسلا الرئوية والمعوية البرازية بين انه لثلاثة
انواع فقط تاتي مضاة قوي لكليبسلا وجها لوجه *Penicillium sp4* و *Rhizomucor sp*. بمنطقة تحلل تساوي
15 مم و 14 مم على التوالي و نوع *Aspergillus sp3*. تعتبر ذات تأثير متوسط بمساحة تثبيط 9 مم.
يوجد 8 انواع من بين 15 عفن ينتمون الى *Aspergillus sp* (1،2،3،5،11) ادو تثبيط بين 19 و 30 مم مع
منطقة تثبيط بين 12 و 14 مم لنوع *Penicillium sp5* و *Absidia sp 1* ضد البكتيريا المعوية. ويوجد نوعين
Aspergillus sp 3 و *Penicillium sp 5* قاما بفعل مضاة مع نوعي البكتيريا المدروسة.

الكلمات المفتاحية: عزل، تحديد الهوية، العفن، ارض الغابة، النشاط المضاد للبكتيريا .

Références

Bibliographiques



- **Abdelaziz W. (2006)**. Isolement des mycètes producteurs des substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magistère En Microbiologie et Biochimie Appliquées .Université Mentouri. Constantine.
- **Alexander M. (1991)**. Introduction to soil microbiology, (edn) Willy .NewYork
- **Alexopoulos C.J., Mims C.W., Blackwell M. (1996)** . Introductory Mycology (4 th Ed). p:868. New York, USA .
- **Attalah M & Kacem –Chaouche N. (1992)**. Production of ochratoxin A in a semi synthetic : « in the second Regional Mycological Conf. *RMC 2* ». Cairo. Egypt.
- **Atlas R. M. & Bartha R. (1992)**. Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), 563.
- **Alvarez – Ropdriguez M.L., Lopez-Ocana L., Lopez C., Rodriguez N.E ., MartinezM.J., Larriba G & Coque J-J.R. (2002)**. Cork taint of wines : role of filamentousfungi Isolated from rock in the function of 2,4,6- Trichloroanisol by O methylation of2,4,6 – Trichlorophenol. *Applied and Environmental Microbiology* . **68 (12)** : 5860-5869.
- **Badillet G., de Briève C., Guého E.(1987)**. Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique, vol II, Ed VARIA, Paris.
- **Barker T.W., Worgan J.T.(1981)**. The application of air. Lift fermenters to the cultivation of filamentous fungi. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*13 p: 77 - 148.
- **Bååthe E., Söderström B.E. (1980)**. Comparaisons of the agar-film and membranefilter methods for the estimation of the hyphal lengths in soil , with particular reference to the effect of magnification .*Soil Biol. Biochem.* **12** :385-387.
- **Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1972)**. Illustrated genera of Imperfect fungi. 3thEd, Burgess publishing company, Minnesota, pp. 62- 197.
- **Boiron ,P. (1996)**. Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan.p:13-19-69-79.

- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P.H., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y., Veau P. (1990)** . Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. p :34-428.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999)** . Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P. 12-426.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. (1989)** . Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.
- **Cahagnier B., Richard-Molard D. (1998)** . Analyse mycologique in Moisissures des aliments peu hydratés, Ed. Tec & Doc, p 140-158.
- **Calvet R.(2000)**. Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), 83-90 .
- **Calvo A.M., Wilson R.A., Bock J.W and Keller N.P. (2002)** . Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol.Mol.Bio.Rev.* **66** : 447- 459.
- **Campbell C.K., Johnson E.M., Philpot C.M., Warnock D.W. (1996)**. Identification of pathogenic fungi, Public Health Laboratory Service.
- **Calamita H. G. and Doyle R. J., 2002**. Regulation of autolysins in teichuronic acid-containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.* 44, 601-606.
- **Castegnaro M., Pfohl-Leskowicz A. (2002)**. Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La sécurité alimentaire du consommateur*, Lavoisier, Tec&Doc.
- **Chabasse, D.(2002)**. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, Bioforma.France. pp. 25-27.
- **Chabasse, D ;Penn P ; Cimon B ; Bouchara J ; De Gentile L ;Brun S.(2002)** Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale.

(Tiraboshi ,1929 ; Van Tieghen,1867 ; Thom,1918 ; Link,1909 ; (Cohn) Saccardo et Trotter 1912 ; (Lucet et Constantin)Wehmer ex Vuillemin 1936) . Bioforma.France.

- **Chater K & Bibb M. (1997)**. Regulation of bacterial antibiotic production, Klein Kauf & H. Vandhoven edn. INK.

- **Chermette R., Bussieras J. (1993)**. Parasitologie vétérinaire. Mycologie, Edité par le Service de Parasitologie de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort.

- **Christensen M. (1989)**. A view of fungal ecology. *Mycologia*. **81** :1-19.

- **Clark H. E., Geldriche E. F. B., Kabler P. W. & Huff C. B.(1985)**. Identification of Industrial microorganismes. *Appl. Microbiol. Process Biochem*. **30**: 723-727.

- **Cundliffe E. (1989)**. How antibiotic- producing organisms avoid suicide *.Ann. Rev.Microbiol* .**43** : 207-333.

- **Davet P. (1996)**. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52-57.

- **Davet R. (1997)**. La Communauté Fongique : Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

- **Davet, P., and Rouxel, F. (1997)**. Detection et isolation des champignons du sol. *INRA*. Paris. 17-54.

- **De Hoog G.S., Guarro J. (1995)**. Atlas of clinical fungi, Centraalbureau voor de Magister en Microbiologie . Université Badji Mokhtar . Annaba.

- **Delgado-Jarana J., Rincon A. M. & Benitez T. (2002)**. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*. **148**: 1305- 1315.

- **Delgado-Jarana J., Rincon A. M. & Benitez T. (2002)**. Aspartyl protease from Development of Novel Real-Time PCR Assays for Detection and Differentiation of Eleven Medically Important *Aspergillus* and *Candida* Species in Clinical Specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 45 (3), 906-914.

- **Demain A & Fang A. (2000).** The natural functions of secondary metabolites .Adv.
- **Diguta Filofteia Camélia . (2010) .** ecologie des moisissures présentes sur baies de raisin.thèse de doctorat en sciences de l'alimentation . universite de bourgogne.
- **Duran J.A., Malvar A., Pereiro M., Pereiro Jr. M . (1989).** *Fusarium moniliforme* keratitis, *Acta ophthalmol., Scand.* 67, 710-713 *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*1.p: 156-160.
- **Feuilhade de Chauvin M . (2005).** New diagnostic techniques, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 19 (1), 20-24.
- **Frazier W.C. (1967).** Food microbiology. Academic presse. London. P. 3-429.
- **Giraud J.(1998).**Microbiologie alimentaire .p 8-101.p 330 Edition Donod, Paris.
- **Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976).** Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.
- **Hart H.E., Parish M.E., Burns J.K., Wicker L. (1991).** Orange finisher pulpas substrate for polygalacturonase production by *Rhizopus oryzae*. *Journal of food science.*56 (2). p:408- 483.
- **Hapwood D.A. (1988).** Toward's and understanding of gene switching in In ASCE manuals and reports on engineering practice. No.71. Am. Soc. Civil Eng. New York.
- **Hawksworth D. L. (1991).** The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research* 95 p:641-655.
- **Hawksworth D. L., Kirk P. M., Sutton B. C., & Pegler D. N. (1995).** Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi.CAB International, Wallingford, Unitd Kingdom. 8,p: 616.
- **Hendey K.H. & Cole C.E. (1993).** Areviws of mycotoxins in indoor air . *J.Toxical.Environ. Health.* 38 (2):. 183- 198.
- **Hinrikson H.P., Hurst S.F., De Aguirre L., Morrison C.J . (2005).** Molecular methods for the identification of *Aspergillus* species, 43 (1), 129-137.

- **Issac S., Frankland J.C., Watling R., Whalley A.J.S.(1993).** Airworth and Bishys Dictionary of the Fungi (8 th Ed.). CAB International, Wallingford, United Kingdom. p:616.

- **Jin J., Lee Y.K., Wickes B.L. (2004).** NOTES Simple Chemical Extraction Method for DNA Isolation from *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* Species, J. Clin. Microbiol., 42 (9), 4293-4296.

- **Joyeaux A. (1982).** Les préparations industrielles d'enzymes. p :22-46.In : Durant G., Monsan. (ed.), Les enzymes production et utilisations industrielles. EditionGautier- Villars.Paris.

- **Julien R.(2002).** Les moisissures parlons-en. Objectif prevention. **25** (4): 7-8.

- **Kachour Leila . (2005).** Identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leur diversité , Mémoire de magister en microbiologie de l' environnement .université baji mokhtar Annaba .

- **Karam H. & Karam N-E.(2000).** Isolement et identification de bactéries lactiques du lait cru de chamelle. XIIèmes Journées Nationales de Microbiologie. Constantine.

- **Keller N.P. & Woobok.J. (2005) .** Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesis in fungi , (edn) Warfe.

- **Kosikowski F. V. (1988).** Dairy foods research papers. Enzyme behavior utilization in dairy technology. J. Dairy Sci. **71**: 557-573.

- **Laredj H. (2004).**Les plantes médicinales : extraction des huiles essentielles et activités antibactérienne.Université Badji Mokhtar, Annaba.P 21.

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

- **Leveau S. B. & Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier microbiologie de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P. 216-244.

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

- **Maheux L .(1998).** Session on microbial contamination occupational and environmental health servoces agency , (edn) Health Canada. Canada.

- **Martin J.F. (1998).** New aspect of genes and enzymes for B- Lactam. *Biosynthesis.App.Microbiol. Biotechnol.***50:** 1-15.

- **Martin J.F. & Liras P. (1989).** Organisation and expression of genes involvbed in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolite. *Annu. Rev. Microbiopl.***43:**173-206.

- **Mehravar M. & Sardari S. 2011.** Screening of antimicrobial membrane-active metabolites of soil microfungi by using chromatic hospholipid/polydiacetylene vesicles. *Journal of Medical Mycology*, 21 (3): 188-197.

- **Miller J. D. (2002).** Enzymic hydrolysis of protein by various enzyme preparations. *J. Ferment. Technol.* **54:** 872-884.

- **Morin O. (1994).** *Aspergillus* et aspergilloses: biologie, Ed. Techniques Encyl. Med. Chir. (Elsevier, Paris), Maladies infectieuses 8-600-A-10.

- **Nelson P.E., Toussoun T.A., Marasas W.F.O. (1983).** *Fusarium* species: an illustrated manual for identification. Pennsylvania state Univ. Editor.

- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R.(2000) .** L'essentiel en microbiologie.. Edition Berti. p :210-216.

- **Nishio N., Nagai S. (1981) .** Single cell protein production from mandarin orange peel. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.***1.p:** 156-160.

- **Paul E. A. & Clark F. E.(1996).** Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.

- **Paterson P.J., Seaton S., McLaughlin J., Kibbler C.C. (2003).** Development of molecular methods for the identification of *Aspergillus* and emerging moulds in paraffin wax embedded tissue sections, *J. Clin. Pathol.*, 56, 368-370.

- **Peuk A.D.(2000).** The chemical composition of xylen sapin *Vitis vinifera* L.cv. Riesling during vegetative growth on three different francian vineyard soils and as influenced by nitrogen fertilizer.*Am. Enol. Viticult.* **51** :329-339.

- **Pereira E., Santos A., Reis F., Tavares R.M., Baptista P., Lino-Neto T. & Almeida-Aguiar C. 2013 .** A new effective assay to detect antimicrobial activity of filamentous fungi. *Microbiological Research*, 168 (1): 1-5.

- **Pochon J., Tardieux P., (1962).** Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Edition la tourtourelle, Saint-Mandé.110 – 111.

- **Prescott., Harly., Klein. (1995).** *Microbiologie*. 2th ed. Debroeck-wesmael. Bruxelles .

- **Pitt, J.I . (1988).** An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* **65**, 1135-1157.

- **Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C.RAMIREZ, C. (1982).** Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

- **Quénéa K.(2004).** Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

- Raper K.B. & Fennell . (1965).** The genus *Aspergillus*. *Food Microbiol* **5**: 163-176.

- **Reiss E., Tanaka K., Bruker G., Chazalet V., Coleman D., Debeaupuis J.P., Hanazawa R., Latgé J.P., Lortholary J., Makimura K., Morrison C.J., Murayama S.Y., Naoe S., Paris S., Sarfati J., Shibuya K., Sullivan D., Uchida K., Yamaguchi H . (1998) .** Molecular diagnosis and epidemiology of fungal infections, 36 (1), 249-257 responsible species, *Mycoses*, 35, 109-114.

- **Rivière J. (1975).** Les applications industrielles de la microbiologie. p :31-195. Collection sciences agronomiques. Masson et Cie (éd.).

- **Roquebert M.F. (1998).** Taxonomie des moisissures ; Méthodes de culture et techniques d'observation ; Identification”, in “Moisissures des aliments peu hydratés”, Ed. Tec & Doc, 39-95.

- **Ruark G. H., Zarnoch S. J. 1992.** Soil carbon, nitrogen and fine root biomass sampling in a pine stand. Soil Sc. Soc. Am.J. 56 :1945-1950.

- **Schnürer J., Clarholm M., Rosswall T. 1985.** Microbial biomass and activity in a agricultural soil with different organic matter contents. Soil Biol. Biochem. 17:611-618.

- **Scriban R. (1993).** Biotechnologie. p:32-690. 4^{ème} édition. Technique de documentation- Lavoisier (éd.). Significance of Mold Species in Norwegian Drinking Water, Appl. Environ. Microbiol., 72 (12), 7586-7593.

- **Senal J., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Lepoivre Ph., Meulmans M., Seilleur P., Vandevéken J., et Viseur J. (1993).** Traité de pathologie végétale. Gembloux. Belgique.

- **Smaoui, S.(2010)** .Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés .Thèse de doctorat en Génie de Procédés et environnement .Université de Toulouse.France : p 251 .

- **Smith C.K., Coyea M.R., Munson A.D.2000** . Soil carbon , nitrogen and phosphorus stocks and dynamics under disturbed black spruce forest. Ecol. App. 10 :75-78.

- **Subler S., Kirsh K.S. 1998.** Spring dynamic of soil carbon, nitrogen and microbial activity in earthwarm middens in no-till cornfield. Bio. Fert. Soils. 26 :243-249.

- **Swann E.C., Frieders E.M., & McLaughlin D.J.(1999).** Microbotryum, Kriegeria and the changing paradigm in basidiomycete classification. Mycologia 91. p:51-66.

- **Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa, H. & Kaneda M. (2001).** Isolation and characterization of a trypsin-like protease from *Trichoderma viride*. *Biol. Chem.* **382**: 1509-1513.

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

- **Urbanek H., Yirdaw G. (1984) .** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. *Acta Microbiol. Pol.* **33** (2): 131.

- **Woobok J. and Keller N.P. (2004).** Lae A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus sp.* *Eucaryotic Cell.* **3(2)**: 527-535.

Sites webs :

- ❖ http://tsjok45.multiply.com/photos/album/1656/Fungi_II_
- ❖ http://www.culture.gouv.fr/culture/conservation/fr/cours/rakot_02.html
- ❖ www.aspergillus.man.ac.uk

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre200 g
Glucose20 g
Agar20 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.
- ajuster le pH= $6,4 \pm 0,2$ à 25°C
- Stériliser par autoclavage à 121° C / 15 min.

❖ Annexe 2 : Malt agar

Composition par un litre

Extrait de Malt 30g.

Agar15g.

Eau distillée 1000ml.

PH 5.5 ± 0.2 à 25°C.

Dissoudre l'agar à chaud puis ajouter l'extrait de malt. Stériliser à 120°C pendant 20minutes. Ce milieu est utilisé pour la recherche et le dénombrement des moisissures, ainsi que pour l'entretien des souches de collection et le repiquage en vue de la préparation de pieds de cuve industriels.

Annexes

❖ **Annexe 3 : Sabouraud agar modifié**

Composition par un litre

Agar20g.

Glucose..... 20g.

Neopeptone10g.

Eau distillée 1000ml

Ph 7 ± 0.2 à 25°C .

Stérilisée 20 minutes à 120°C . Ce milieu est utilisé pour l'isolement et la culture des levures et les moisissures. Son utilisation est recommandée par le codex de la pharmacopée française pour le contrôle de stérilité des produits pharmaceutiques.

❖ **Annexe 4 : Czapek DOX agar**

Composition par un litre

Glucose30g.

Agar 15g.

NaNO_3 3g.

KCl 0.5g.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g.

$\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g.

Eau distillée 1000ml.

Ph 7.3 ± 0.2 à 25°C .

Ce milieu permet de bien différencier sur les boîtes ensemencées les *Fusarium*, *Aspergillus* et *Penicillium* l'acidité de ce milieu permet en outre d'éliminer les bactéries.

Annexes

❖ **Annexe 5 : Bouillon nutritif**

Bouillon nutritif poudre2.3 g.

L'eau distillée..... 100ml.

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

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

Répartir 10ml dans chaque tube.

Autoclavage à 121⁰ C pendant 20min.

Annexe 6 : Muller -Hinton.

Agar10g/l

Extrait de viande.....2g /l

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

Amidon.....1,5g/l

Eau distillée.....1000 ml

PH : 7,0

Annexe 7 : Les bactéries test

❖ *Klasiella pneumoniae* ATCC 700603 est une bactérie aérobie facultative, Gram(-), fréquemment présente dans le sol et l'eau. Nombre de ces bactéries sont de fixé de l'azote atmosphérique, ce que certains considèrent comme un avantage sur le plan nutritif pour les populations isolées dont le milieu environnemental comprend peu d'azote protéique.

La virulence de *Klasiella pneumoniae* est liée à la production d'une capsule qui fait un obstacle à la différence de l'hôte en perturbent la phagocytose et elle permet à la bactérie d'adhérer aux voie respiratoire et de les coloniser et cause parfois une forme grave de pneumonie chez (Tortora et *al.*, 2003).

Annexes

❖ *Enterococcus faecalis* ATTC 29212

Bactérie commensale à Gram positif de la famille Enterococcaceae, elle se trouve dans le tube digestif humains et d'autres mammifères, causer des infections mortelles chez l'homme et le singe, particulièrement dans un environnement hospitalier. Elle peut aussi déclencher des inflammations chroniques de l'intestin.

Thème : Isolement, Identification et activité antibactérienne des moisissures d'un sol forestier à Constantine

Nature du diplôme : Master

Domaine : Science de la Nature et de la vie

Filière : Science biologique

Spécialité : Biotechnologie des Mycètes

Résumé : 22 souches fongiques ont été isolées à partir d'échantillons du sol prélevé de la forêt de Chaabat Erassas, Constantine représentant 4 genres : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizomucor* et *Absidia*.

L'étude macroscopique et microscopique a montré 11 espèces appartenant au genre *Aspergillus*, 8 espèces au genre *Penicillium*, deux espèces à *Absidia* et une seule espèce à *Rhizomucor*.

L'analyse des résultats a montré, par ordre décroissant, que le genre majoritaire était *Aspergillus* avec une fréquence de 50 %, suivi du genre *Penicillium* avec un pourcentage de 37 %, le genre *Absidia* avec un pourcentage de 9% et enfin *Rhizomucor* avec un pourcentage de 4 %.

Le test d'activité antibactérienne des isolats sur les bactéries test : *Klebsiella pneumoniae* et *Enterococcus faecalis*, a montré que seulement 3 espèces ont eu un fort effet antibactérien vis-à-vis de *K. pneumoniae* Gram (-), à savoir : *Penicillium sp 5* et *Rhizomucor sp*, avec une zone de lyse égale à 15mm et 14 mm respectivement. *Aspergillus sp 3* à moyen effet antibactérien, avec une zone de lyse égale à 9 mm. 8/15 espèces de moisissures ont eu un effet antibactérien contre *E. faecalis* Gram(+), à savoir : *Aspergillus sp*(1, 2, 3, 5 et 11) et *Penicillium sp4*, avec une zone d'inhibition entre 19 et 30 mm. *Penicillium sp 5* et *Absidia sp1*, ont un effet antibactérien moyen avec une zone d'inhibition entre 12 et 14 mm. *Aspergillus sp 3* et *Penicillium sp 5* ont donné un bon effet antibactérien contre les deux espèces de bactéries.

Mots clés : Isolement, Identification, Moisissure, Sol forestier, Substance antibactérienne.

Lieu de Travail : laboratoire de Mycologie de Biotechnologie et de l'activité microbienne, Département de Microbiologie. Université des frères Mentouri .