

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة ابو بكر بلقايد - تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID- TLEMSEN

كلية علوم الطبيعة و الحياة و علوم الارض والكون

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et Sciences de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



**MEMOIRE**

Présenté par

**CHERADI ROKIA**

En vue de l'obtention du

**Diplôme de MASTER**

En Microbiologie Fondamentale

**Thème**

**Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la  
Grotte de Noufigher– Ghardaia.**

Soutenu le 06/06/2024, devant le jury composé de :

Président	M. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	M. BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice	Mme. BOUBLENZA Nesrine	MAB	Université de Tlemcen

**Année universitaire 2023/2024**



## *Dédicace*



Avec l'aide d'un Dieu généreux et miséricordieux, j'ai réussi à accomplir cette humble tâche à laquelle je me suis consacré :

Qu'Allah vous bénisse d'une bonne santé et d'une longue vie. Merci à mes chers parents qui ont cru en moi et m'ont soutenu dans l'atteinte de mes objectifs, tant moralement que financièrement.

Merci à mes belles-sœurs et à la famille Cheradi pour leurs conseils et leur soutien moral.

A mes chers frères pour leur présence dans mes côtés.

À toute la famille, à tous nos collègues, en souvenir de tous les moments et rires que nous avons passés ensemble.

## ***Remerciements***

Je tiens avant tout à remercier « Allah » de m'avoir donné la force et la volonté d'accomplir ce maigre travail.

Tout d'abord, je tiens à remercier Monsieur BELYAGOUBI Larbi conférence à l'Université Abbeker Belkaid - Tlemcen, qui a aimablement accepté de me prendre en charge dans la réalisation de ce modeste travail dont les mérites sont dus à son aide matérielle et morale, ses précieux conseils et sa gratitude.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers Monsieur REBIAHI Sid Ahmed Professeur à l'université de Tlemcen, de m'avoir accordé de son temps précieux et accepté de présider le jury de ma soutenance.

Je souhaite exprimer ma gratitude et mon respect envers Madame BOUBLENTA Nesrine pour avoir acceptée d'examiner ce travail.

## Résumé

Compte tenu de la fréquence des micro-organismes pathogènes multirésistants émergents, la découverte de nouveaux antibiotiques et d'autres métabolites microbiens bioactifs est une priorité absolue. En conséquence, les scientifiques recherchent de nouveaux antibiotiques isolés de microbes des habitats extrêmes tels que les grottes.

Les écosystèmes Algériens abritent une variété fascinante de micro-organismes qui constituent des sources importantes d'un large éventail de molécules antimicrobiennes. Dans notre recherche, nous avons été fascinés par la recherche de champignons producteurs de molécules bioactives de la Grotte de Noufigher située dans la wilaya de Ghardaïa.

Tandis que les sédiments et les roches étaient échantillonnés, 11 souches fongiques ont été sélectivement isolées. Les isolats identifiés appartenaient aux genres *Aspergillus* (2/11), *Penicillium* (4/11), *Cladosporium* (1/11) et *Trichoderma* (4/11).

Le test d'activité antibactérienne a montré qu'une souche présentait une activité antibactérienne contre les bactéries testées. Cette souche a une activité reproductrice contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* avec un diamètre de zone d'inhibition allant de 4 à 12 mm par la méthode de diffusion sur gélose.

La grotte de Noufigher peut être perçue comme une opportunité pour la production de microorganismes bioactifs.

**Mots clés :** Grotte de Noufigher, sédiments, Moisissures, Germes pathogènes, Activité antimicrobienne.

## ملخص

ونظرًا لتكرار ظهور الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض المقاومة للأدوية المتعددة، فإن اكتشاف مضادات حيوية جديدة وغيرها من المستقبلات الميكروبية النشطة بيولوجيًا يمثل أولوية قصوى. ونتيجة لذلك، يبحث العلماء عن مضادات حيوية جديدة معزولة من الميكروبات في البيئات القاسية مثل الكهوف.

تعد النظم البيئية الجزائرية موطنًا لمجموعة رائعة من الكائنات الحية الدقيقة التي تشكل مصادر مهمة لمجموعة واسعة من الجزيئات المضادة للبكتيريا. في بحثنا، انبهرنا بالبحث عن الفطر الذي ينتج جزيئات نشطة بيولوجيًا من مغارة النوفيقر الواقعة في ولاية غرداية.

بينما تم أخذ عينات من الرواسب والصخور، تم عزل 11 سلالة فطرية بشكل انتقائي. تنتمي العزلات التي تم تحديدها إلى أجناس *Aspergillus* (2/11)، *Penicillium* (4/11)، *Cladosporium* (1/11) و *Trichoderma* (4/11)

أظهر اختبار النشاط المضاد للبكتيريا أن إحدى السلالات أظهرت نشاطًا مضادًا للبكتيريا ضد البكتيريا التي تم اختبارها. هذه السلالة لها نشاط تكاثري ضد *Pseudomonas aeruginosa* و *Klebsiella pneumoniae* و *Escherichia coli* و *Enterococcus faecalis* بقطر منطقة تثبيط يتراوح من 4 إلى 12 ملم.

ويمكن اعتبار مغارة النوفيقر فرصة لإنتاج الكائنات الحية الدقيقة النشطة بيولوجيًا.

**الكلمات المفتاحية:** كهف نوفيقر، الرواسب، العفن، الجراثيم المسببة للأمراض، النشاط المضاد للميكروبات

## Abstract

Given the frequency of emerging multidrug-resistant pathogenic microorganisms, the discovery of new antibiotics and other bioactive microbial metabolites is a top priority. As a result, scientists are searching for new antibiotics isolated from microbes in extreme habitats such as caves. Algerian ecosystems are home to a fascinating variety of microorganisms that constitute important sources of a wide range of antibacterial molecules. In our research, we were fascinated by the search for mushrooms producing bioactive molecules from the Noufigher Cave located in the wilaya of Ghardaïa. While the sediments and rocks were sampled, 11 fungal strains were selectively isolated. The identified isolates belonged to the genera *Aspergillus* (2/11), *Penicillium* (4/11), *Cladosporium* (1/11) and *Trichoderma* (4/11).

The antibacterial activity test showed that one strain exhibited antibacterial activity against the bacteria tested. This strain has reproductive activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* with an inhibition zone diameter ranging from 4 to 12 mm.

The Noufigher cave can be seen as an opportunity for the production of bioactive microorganisms.

**Keywords:** Noufigher Cave, sediments, Mold, Pathogenic germs, Antimicrobial activity.

## *Table de matière*

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Synthèsbibliographique.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Les grottes.....</b>	<b>5</b>
1.1 Introduction.....	6
1.2. Historique de la microbiologie des grottes .....	7
1.3. Ecologie microbienne des grottes.....	7
<b>2. Les champignons.....</b>	<b>8</b>
1. Généralités sur les champignons.....	9
2. Écologie des champignons.....	9
3. Propriétés principales des champignons .....	9
4 Identification des champignons .....	10
4.1. Critères d'identification macroscopique.....	10
4.2 Aspect microscopique.....	10
4.3. Identification génétique .....	10
5. Le genre <i>Penicillium</i> .....	11
6. Le genre <i>Trichoderma</i> .....	12
7. Métabolies secondaires.....	13
8. Mycotoxines.....	14
9. Les antibiotiques.....	14
10. Classification des champignons .....	15
10.1. Les Ascomycota.....	15
10.2. les basidiomycètes.....	15
10.3. Les deutéromycètes .....	15
10.4. les zygomycètes.....	15
10.5. les chytridiomycota.....	15
<b>3. les microorganismes tests .....</b>	<b>17</b>
1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2. <i>Pseudomonas aerogenosa</i> .....	18
3. <i>Klebsilla pneumoniae</i> .....	19
4. <i>Echerichia coli</i> .....	20
5. <i>Bacillus subtilis</i> .....	21

6. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	22
7. <i>Candida albicans</i> .....	23
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>24</b>
1. Echantillonnage.....	25
2. pH du sable .....	27
3. Isolement des moisissures.....	27
4. Repiquage et purification.....	28
5. Identification des moisissures.....	28
5.1. Observation microscopique.....	28
6. test d'activité antimicrobienne .....	29
7. criblage par la technique des cylindres d'agar.....	29
7.1. Test d'activité antimicrobienne.....	29
7.2. Test d'activité antifongique.....	30
8. criblage par la technique des puits .....	30
<b>Résultats et discussion</b> .....	<b>32</b>
1. pH du sable .....	33
2. les champignons .....	33
2.1. isolement des moisissures.....	33
2.2. Purification des moisissures .....	36
3. Identification des mycètes.....	36
4. résultats de l'activité antimicrobienne.....	40
5. La sensibilité des souches pathogènes aux antibiotiques.....	42
<b>Conclusion</b> .....	<b>44</b>
<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>46</b>
<b>Annexe</b> .....	<b>57</b>



## *Liste des Tableaux*

<b>Tableau</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Mycètes producteurs des antibiotiques ( <b>Larpent and Larpent-Gouraud, 1996</b> )	14
<b>2</b>	Classification simplifiée du règne des Fungi présentant les principales classes de champignons avec quelques espèces spécifique ( <b>Ripert, 2013</b> )	15
<b>3</b>	Origines et aspects de l'échantillon du sol prélevé.	25
<b>4</b>	Souches de référence utilisée dans les différents tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne.	29
<b>5</b>	pH des échantillons de la grotte	33
<b>6</b>	Aspect microscopique et identification microscopique des souches isolées.	38
<b>7</b>	Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches (méthode des cylindres d'agar des moisissures).	40
<b>8</b>	Résultats de la sensibilité des bactéries tests aux antibiotiques	42
<b>9</b>	Résultats de la sensibilité à la nystatine de la levure (diamètres en mm).	43

## *Liste des Figures*

<b>Figures</b>	<b>Titre</b>	<b>Page</b>
<b>1</b>	Les stalactites ( <b>König ,2016 ; Antaki-Masson ,2020</b> ).	7
<b>2</b>	Schéma des différentes dispositions de verticilles chez <i>Penicillium sp</i> ( <b>Samson et al., 1980</b> )	11
<b>3</b>	Cinq coupes systématiques de <i>Trichoderma sp.</i> et quelques espèces lui appartenant, <b>Selon Bissett (1991)</b> . * Les espèces agrégées de <b>Rifai (1969)</b> .	13
<b>4</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement ( <b>Delarras, 2007</b> )	18
<b>5</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , vue au microscope électronique et colorée artificiellement ( <b>Delarras, 2007</b> )	19
<b>6</b>	Observation microscopique de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ( <b>Janda et Abbott, 2006</b> )	20
<b>7</b>	<i>Escherichia coli</i> , vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement( <b>Delarras, 2007</b> )	21
<b>8</b>	Observation microscopique de <i>Bacillus subtilis</i> ( <b>www.wisegeek.com</b> )	22
<b>9</b>	Observation microscopique <i>Enterococcus faecalis</i> ( <b>Camille, 2007</b> )	22
<b>10</b>	<i>Candida albicans</i> vue au microscopique et colorée ( <b>Camille, 2007</b> )	23
<b>11</b>	Zone d'échantillonnage. [A] : Prélèvement du sol ; [B] : Entrée de la grotte ; [C] : l'intérieure de la grotte ;[D] : vue de l'extérieure de la région( <b>Photos personnelles, 2024</b> ).	26
<b>12</b>	Prélèvements effectués par l'écouvillonnage	26
<b>13</b>	Mesure du pH du sable.	27
<b>14</b>	Préparation des dilutions des échantillons de la grotte	28
<b>15</b>	Méthode de Scotch. <a href="https://m.youtube.com/watch?v=OWkAZq3I4MQ">https://m.youtube.com/watch?v=OWkAZq3I4MQ</a>	29
<b>16</b>	Antibiotiques testés : Ampicilline (10 µg),	30
<b>17</b>	Culture de <i>Penicillium</i> sur milieu liquide [A] et Filtration du milieu liquide [B].	31
<b>18</b>	Photos des isolements des champignons du sol de la grotte sur les milieux MEA et CDAr	34

<b>19</b>	Nombre des souches isolées des échantillons de la grotte.	<b>35</b>
<b>20</b>	Photos de purification des champignons du sol de la grotte sur le milieu PDAac	<b>36</b>

<b>21</b>	Aspect macroscopique de <i>Penicillium sp</i> [A]; d' <i>Aspergillus niger</i> [B]; <i>Trichoderma</i> [C];. ; <i>Cladosporium</i> [D]	<b>37</b>
<b>22</b>	Observation microscopique de <i>Penicillium sp</i> [A]; <i>Alternaria sp.</i> [B]; et <i>Cladosporum sp</i> [C].	<b>38</b>
<b>23</b>	Nombre de genres isolés à partir de la grotte de Noufigher.	<b>39</b>
<b>24</b>	effet de <i>Cladosporium .sp sur Enterococcus faecalis</i>	<b>42</b>

## *Liste des abréviations*

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µL : Microlitre

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

g : gramme

mm: Milimètre

m : mètre

pH : Potentiel d'Hydrogène

A.T.C.C: American Type Culture Collection

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

Amp:Ampicilline

PDA : Potato Dextrose Agar

CDA : Czapek Dextrose Agar

MEA : Malt Extract Agar

# *Introduction*

## Introduction

---

Pour certains, les grottes sont un refuge pour les créatures et les monstres, une cible pour les chercheurs d'or, et même pour les biologistes, ce milieu étant un laboratoire pour étudier les facteurs qui déterminent l'évolution et l'adaptation des espèces.

Cependant, ils négligent ce que cet environnement peut apporter à l'homme et plus particulièrement à la santé humaine (**Kholkhal, 2006**). En dispose de l'histoire des أصحاب البقرة سورة الكهف

Actuellement, le problème de la résistance aux antibiotiques et de la sensibilité des patients associés à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses conduit à une recherche permanente de nouveaux antibiotiques pour lutter contre les micro-organismes parfois résistants à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses études se sont concentrées sur le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques (**Berdy, 2005**)

Ces dernières années, la compréhension des champignons a fait de grands progrès. La biotechnologie fongique illustre le grand potentiel des champignons pour des applications dans les grands secteurs industriels (**Bouchet, 2005**). Ils ont la capacité de produire différents métabolites secondaires. Ces substances ont été identifiées comme étant importantes pour les processus d'absorption des nutriments fongiques, notamment les enzymes fongiques (**Pasqualatto, 2008**). Malgré les progrès scientifiques, la compréhension de la biologie des moisissures est encore partielle et nécessitera probablement plus de temps dans des environnements extrêmes, car il a été démontré que les moisissures isolées d'environnements extrêmes peuvent synthétiser des métabolites secondaires plus stables biologiquement et chimiquement (**Frisvad, 2005**)., Mais ils peuvent aussi être nocifs en modifiant les propriétés physiques et chimiques du substrat sur lequel ils sont fixés (**Alborch et al. 2011**).

Les métabolites secondaires fongiques occupent diverses molécules et jouent des rôles importants en raison de leurs activités biologiques. Ces molécules complexes peuvent être des composés bioactifs, notamment : des agents antibactériens, des agents anti tumoraux, des agents antifongiques, des agents antiviraux et des inhibiteurs d'enzymes (**Zain et al., 2014**)

Dans cette optique, nous avons étudié de nouvelles molécules bioactives isolées des moisissures comme alternatives aux antibiotiques. L'objectif principal de cette étude était de tester l'activité antimicrobienne (antibactérienne et anti-candida) des substances produites par des souches de moisissures isolées du sol des grottes de la région de Ghardaïa.

## **Introduction**

---

Pour atteindre nos objectifs, l'approche expérimentale est simplifiée à :

- Isoler des moisissures à partir des échantillons prélevés de différents endroits de la grotte
- Purifier et identifier les souches isolées
- Cribler le pouvoir antimicrobien des microorganismes sélectionnés contre des souches pathogènes.

# *Synthèse bibliographique*



# *Chapitre 1*

## *Les Grottes*

## 1. Les grottes

### 1.1. Introduction

Les grottes représentent des écosystèmes souterrains (Baiying, 2015), généralement des habitats pauvres en nutriments, avec des températures basses relativement stables et des concentrations élevées de minéraux. Par conséquent, les grottes peuvent être considérées comme des environnements extrêmes pour la vie et fournissent des niches écologiques à des micro-organismes hautement spécialisés (Schabereiter-Gurtner et al., 2003), est une cavité naturelle creusée dans un rocher, suffisamment vaste pour permettre à un être humain de passer. La plupart des grottes sont situées en terrain calcaire. Le processus de formation des grottes prend des milliers d'années, l'eau de la surface commence à s'infiltrer dans les fissures de la roche. Cette eau contient le dioxyde de carbone présent dans l'air et l'eau continue de s'écouler Éroder les roches pour former des galeries et des grottes (Cianflone, 1996).

L'intérieur de la grotte peut être divisé en quatre zones principales, en fonction de la quantité de lumière qui pénètre à l'intérieur.

- La *zone d'entrée* où se trouvent les environnements aériens et souterrains.
- La *zone crépusculaire*, où la lumière disparaît. Aucune plante ne peut y pousser.
- *Zone de transition* pour ce niveau. Les lumières sont éteintes, mais les effets environnementaux de surface tels que la température et l'humidité peuvent toujours être détectés.
- Une *zone profonde* d'obscurité totale, d'humidité et toujours froide (Ghosh et al., 2016).

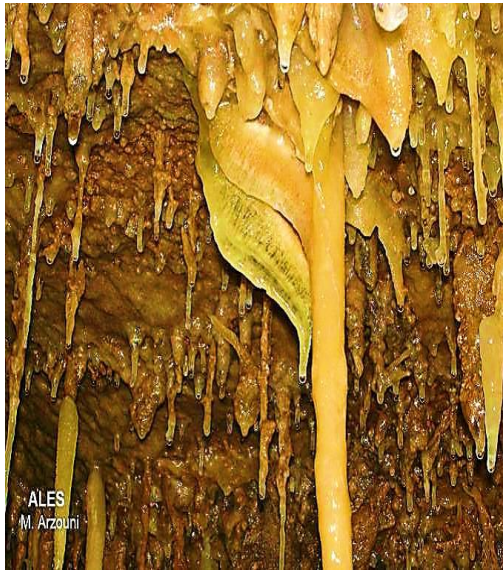


Figure 1 : Les stalactites (König ,2016 ; Antaki-Masson ,2020).

## 1.2. Historique de la microbiologie des grottes

Selon les premières études microbiologiques des grottes basées principalement sur la culture et la microscopie, les micro-organismes étaient répandus dans les sédiments et l'eau. Au début des années 1900, et surtout dans les années 1940, on pensait que de nombreux dépôts souterrains étaient d'origine microbienne. Dans les années 1960, les effets écologiques et géologiques des micro-organismes dans les grottes ont commencé à retenir l'attention et les micro-organismes ont été isolés grâce à des méthodes de culture. On pensait que la matière organique produite par la photosynthèse était vitale à la vie dans les grottes, mais à la fin des années 1980 et jusqu'en 1990, suite à la coïncidence de la découverte de sources hydrothermales en eaux profondes et du développement de techniques de génétique moléculaire, elle a introduit de nouvelles notions de « La production primaire microbienne est basée sur la synthèse chimique plutôt que sur la photosynthèse » (Christiansen, 2012).

## 1.3. L'écologie microbienne des grottes

Les grottes sont considérées comme des environnements extrêmes pour la vie où leurs ressources sont souvent très limitées à cause de l'absence de lumière qui bloque la production primaire de matière organique par les plantes (Northup et al., 2001). La faune et la flore des grottes sont spécifiques et peuvent fluctuer en fonction des apports naturels endogènes ou exogènes, liés aux activités humaines, dans l'espace et le temps. Les cavités naturelles sont des systèmes ouverts qui entretiennent une relation constante avec leur environnement, tant interne qu'externe (Oriol et Mertz, 2006). Cependant, les micro-

organismes des cavernes sont introduits par les humains, les animaux, le débit d'eau et le vent (**Adetutu et Ball, 2014**). D'un autre côté, les créatures aériennes flottant librement peuvent être activées par divers facteurs tels que la lumière du soleil, le vent, la température, l'humidité, etc (**Wang et al., 2011**).

*Chapitre II*  
*Les Champignons*

### 1. Généralités sur les champignons

Les champignons font partie de l'histoire culturelle de l'humanité. Lors que nous parlons de champignons, la première chose qui nous vient à l'esprit est leur caractère comestible ou leur toxicité, et non leurs propriétés curatives (Marie, 2017). Ce sont des eucaryotes dépourvus de chlorophylle et donc hétérotrophes (Kendrick, 2000) Les champignons jouent un rôle essentiel dans le cycle des éléments nutritifs du sol. Ils sont classés comme décomposeurs primaires (Jeffery et al., 2013) et sont divisés en deux catégories principales : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne multicellulaire composée d'hyphes (Redecker, 2002).

Certaines espèces de *Penicillium* sont actives dans le raffinage de certains types de fromages, comme le camembert et le cheddar (Dauda et Zarafi, 2019), changements d'alimentation, altération dans de nombreux autres domaines et sécrétion de mycotoxines (Abdollahi et al., 2019)

### 2. Ecologie des champignons

Les champignons filamenteux ont développé des adaptations très diverses, par exemple on les retrouve donc dans presque tous les environnements du monde. Le plus répandu est *Penicillium* et *Aspergillus* (Florent, 1993). Étant donné que les champignons filamenteux sont capables de se développer dans une large gamme de valeurs d'activité d'eau ( $A_w$ ), de pH et de température et peuvent utiliser de nombreux substrats tels que les sucres, les acides organiques, les protéines et les lipides, ils peuvent détruire une large gamme d'aliments. Les pertes causées par les champignons représentent 5 à 10 % des pertes totales. Ils peuvent contaminer les aliments par différentes voies d'entrée, par exemple par des matières premières contaminées, mais aussi par des spores en suspension dans l'air pendant la production ou le stockage. On pense que les masses massives de spores constituent l'une des stratégies de dispersion de nombreux champignons filamenteux d'altération, tels que *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp. et *Aspergillus* spp. (Pitt et Hocking, 2009). Cependant, de nombreuses moisissures n'ont pas besoin de lumière pour former des spores (Botton et al., 1990).

### 3. Propriétés principales des Champignons

Les champignons sont généralement filamenteux, ramifiés, sporulés (Agrios, 2005; Horst, 2013; Richardson et Warnock, 2012).

La plupart des champignons sont des micro-organismes strictement aérobies ou aérobies-anaérobies facultatifs. Ils sécrètent des enzymes qui dégradent divers substrats organiques en nutriments solubles. Les cellules fongiques ont au moins un noyau avec une membrane nucléaire. Ces eucaryotes ont des parois cellulaires dures qui déterminent leur forme et les protègent de l'osmose et d'autres stress environnementaux. La paroi cellulaire est principalement composée d'une couche de glucides, de polysaccharides à longue chaîne (chitine, glucane, mannane, polymères de mannose) ainsi que de glycoprotéines et de lipides (**Ridel, 2019**). La plupart des champignons sont des saprophytes, mais de nombreuses espèces sont de terribles parasites, prospèrent dans des conditions de pH acide et micro aérophiles (**Pichard et al., 2006**).

Les champignons jouent un rôle écologique important dans les écosystèmes naturels. De ce fait, ils influencent le cycle des éléments nutritifs, la dynamique et la succession des plantes et stabilisent les sols. Ils participent à l'équilibre biologique plus que tout autre être vivant (**Bon, 2004**).

#### **4. Identification des champignons**

L'identification des champignons repose principalement sur des critères morphologiques liés au mode de reproduction. Traditionnellement, on distingue deux modes de reproduction chez les champignons, l'un est dit reproduction sexuée car il intègre un mode de reproduction. Les processus de fusion cytoplasmique, de caryogamie et de méiose. au sein d'une même espèce. Ainsi, on peut observer une reproduction sexuée résultant d'un stade morphologique spécifique appelé le morphotype, et une reproduction asexuée résultant d'un autre type de développement appelé le stade métamorphique (**Chabasse, 2008**).

##### **4.1. Critères d'identification macroscopique**

Les champignons levuriformes produisent des colonies lisses, glabres et humides, d'aspect brillant ou mat, parfois rugueux. En revanche, les champignons filamenteux ont Différentes textures : moelleuse, coton, velours, poudrée ou granuleuse (**Chabasse et al., 2002**)

##### **4.2. Aspect microscopique**

Lors de l'analyse microscopique des colonies, plusieurs structures de champignons filamenteux peuvent être observées, telles que les organes végétatifs, les fructifications et les spores :

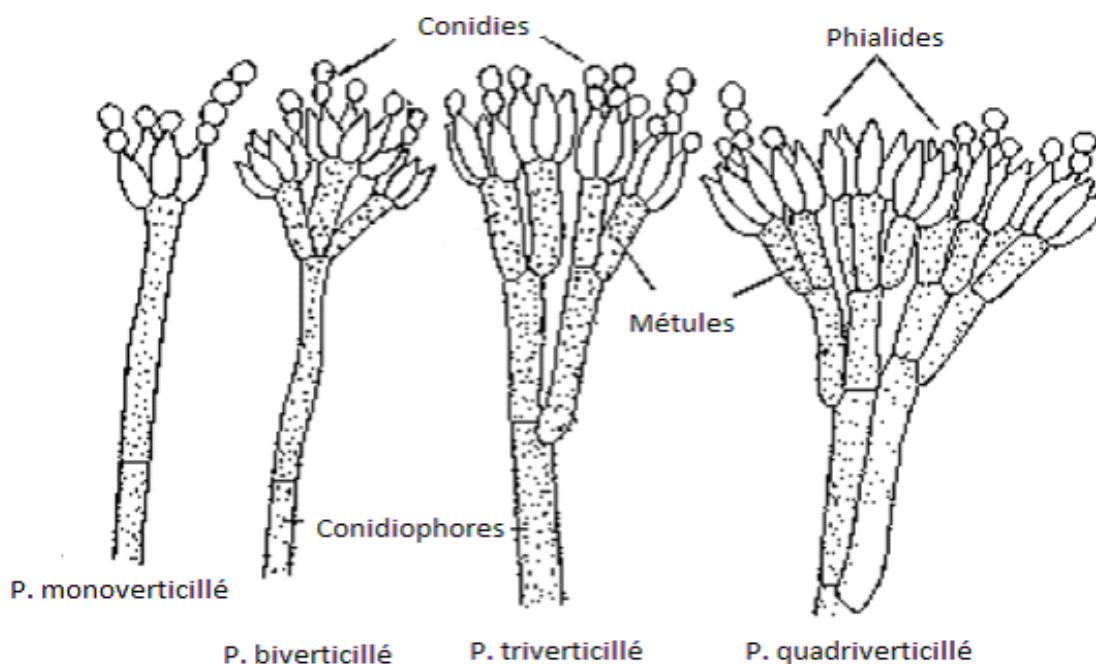
- Thalle végétatif : en forme de cloison ou de siphon, à parois colorées ou incolores.
- Spores : endogènes (sporangiospores) ou exogènes (conidiospores)(**Lecellier,2013**)

##### **4.3. Identification génétique**

De nombreuses études visent à développer des outils et des méthodes d'identification basées sur des études d'acide nucléique (ADN et ARN), non requises plus besoin d'examen morphologique (Peterson, 2006)

Actuellement, l'identification moléculaire des espèces fongiques est principalement utilisée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En fait, les infections fongiques invasives sont de plus en plus reconnues comme une cause majeure de morbidité et de mortalité, en particulier chez les populations immunodéprimées (Aguire et al., 2004)

### 5. Le genre *Penicillium*



**Figure 02 :** Schéma des différentes dispositions de verticilles chez *Penicillium* sp (Samson et al., 1980)

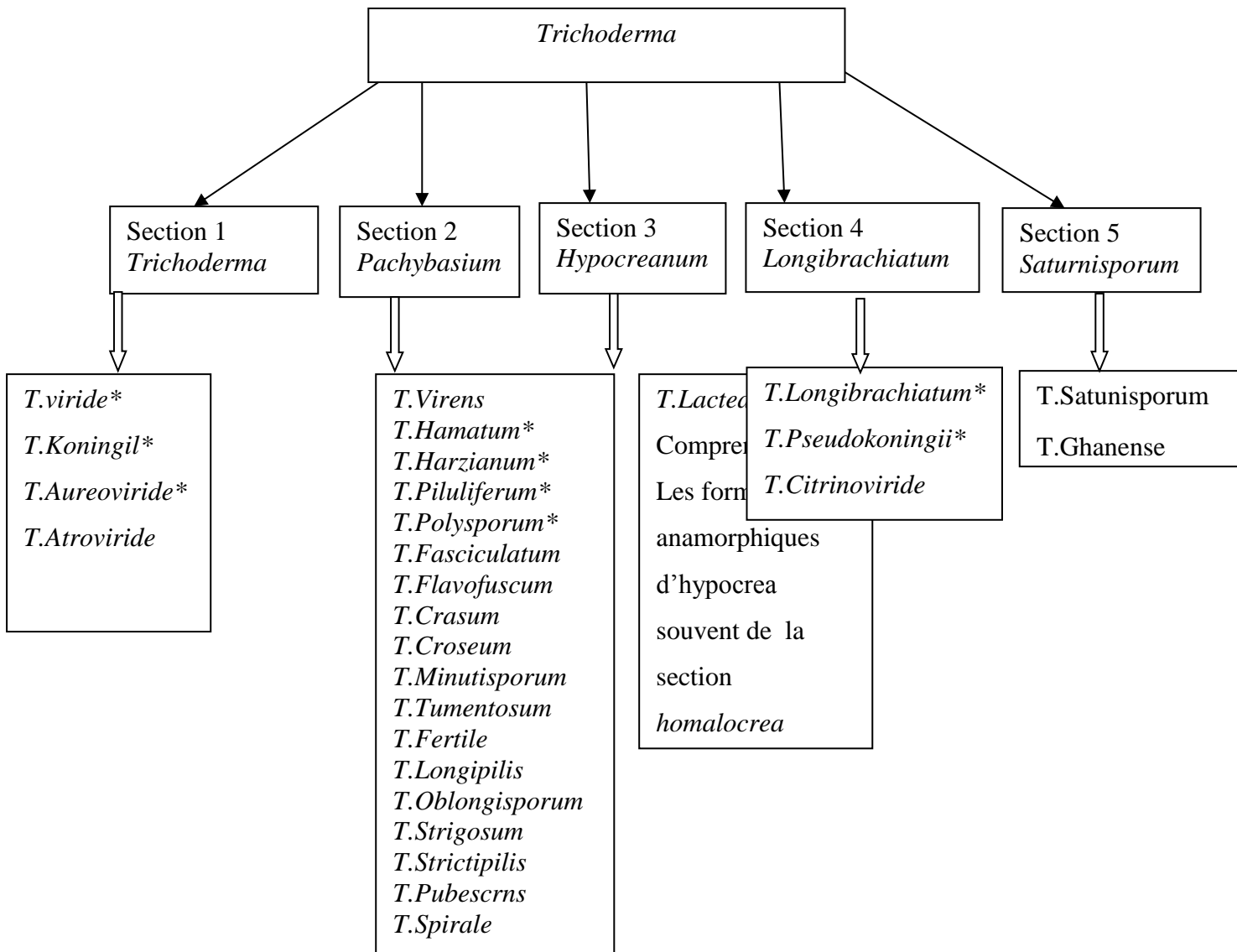
Ce genre regroupe des champignons filamenteux et appartient au phylum Ascomycota (Pitt, 1988) est caractérisé par des filaments verticaux, ou stipes, qui portent des cellules formant des conidies (épingles à fioles) qui se regroupent en forme de brosse (d'où le nom *Penicillium*) pour former des chaînes de conidies. Des éléments intermédiaires peuvent être insérés entre le pédoncule et le pétiole, ce qui rend l'organisation de la brosse plus complexe. En général, on distingue les *P. monoverticillates* les plus simples des biverticillates, dans lesquels les cellules sporulées sont portées en rangée (verticilles). Cellules intermédiaires (métules) et triverticilles à branches tertiaires. L'organisation des



pinceaux a permis de définir un groupe de 45 espèces de *Penicillium*, dans lesquelles des déterminations spécifiques ont été obtenues par des caractéristiques microscopiques (forme, taille et décor) et physiologiques (couleur des colonies, pigments, taux de croissance dans différents milieux, à différents températures)(**Roquebert et al.,1998**), les moisissures à *Penicillium* sont très courantes dans l'environnement ; leurs habitats sont le sol, la nourriture, la matière organique en décomposition, le compost, les céréales(**Pitt et Hocking,1999**) . La majorité des *Penicillium* sont très répandus, polyphages et causent de nombreuses dégradations (**Botton et al., 1985**), les colonies de *Penicillium* peuvent avoir une forme allant de plates, poudreuses à des formes surélevées et empilées. La texture des colonies peut être veloutée, laineuse ou granuleuse. La couleur des colonies varie du blanc au vert, en passant par le bleu ou le jaune (**Pitt et Hocking, 2022**).

#### **6. Genre *Trichoderma***

*Trichoderma* est un champignon cosmopolite caractérisé par une croissance rapide, sa capacité à utiliser une variété de substrats et sa résistance aux agents chimiques nocifs (**Klein et Eveleigh, 1998**), *Trichoderma* sp. Se développent sous forme d'hyphes jaunes, septés et ramifiés avec des parois d'hyphes fongiques lisses et des diamètres d'hyphes ramifiés de 5 à 10  $\mu\text{m}$ . Les spores asexuées se forment par la formation de conidies unicellulaires (de 3 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre), généralement de couleur verte et libérées en grand nombre (**Ghorri, 2015**). *Trichoderma* est abondant dans le sol en raison de sa capacité à produire diverses substances et enzymes biologiquement actives (**Mohamed-Benkada, 2006**).



**Figure 3** : Cinq coupes systématiques de *Trichoderma* sp. et quelques espèces lui appartenant, Selon Bissett (1991). \* Les espèces agrégées de Rifai (1969).

## 7. Métabolites secondaires

Les champignons synthétisent de nombreux métabolites secondaires (Verscheure et al., 2002), certains métabolites secondaires, tels que la mélanine, ont été identifiés comme pigments de spores qui les protègent des rayons UV, des températures extrêmes et du clivage enzymatique (Butler et Day, 1998). Ils sont divisés en plusieurs grands groupes, parmi les quels les composés phénoliques, les terpènes et les composés azotés, dont les plus abondants sont les alcaloïdes (Krief, 2003). D'autres sont toxiques, cancérigènes voire

mutagènes et peuvent donc menacer la santé humaine, animale et végétale. On les appelle souvent les mycotoxines (Binder, 2007).

## 8. Mycotoxines

Ce sont des métabolites secondaires produits après le stade de croissance fongique (Sidhu, 2002), La présence de champignons ne doit pas être systématiquement liée à la présence de toxines. Par ailleurs, il convient de noter que différentes espèces fongiques peuvent produire les mêmes toxines, mais pas nécessairement toutes les souches appartenant à la même espèce. De même, dans certains cas, une même espèce de moisissure peut produire plusieurs mycotoxines (Bryden, 2012). Les mycotoxines présentent des risques potentiels pour la santé humaine et animale (Pitt, 2000).

## 9. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des composés produits par des micro-organismes (bactéries ou champignons) ou par synthèse chimique qui inhibent certains processus importants d'autres micro-organismes (Euzéby, 2004), Selon leur concentration et le temps de contact avec les microorganismes, ils peuvent être micro biocides ou microbiostatiques (Robert, 2000).

En 1887, le Français Ernest Duchesne fut le premier à remarquer la capacité antibactérienne des moisissures, mais sa découverte n'eut pas de suite. La pénicilline a été officiellement découverte par hasard : en 1928, le médecin, biologiste et pharmacologue britannique Alexander Fleming a remarqué que la croissance de *Staphylococcus aureus* était affectée par un champignon appelé *Penicillium notatum*. Suppression des colonies de moisissures qui contaminent la boîte. Il a ensuite émis l'hypothèse que le champignon produisait une substance qui empêchait le développement bactérien et l'appelait pénicilline (Muller, 2017)

**Tableau 01 : Mycètes producteurs des antibiotiques (Larpen and Larpen-Gouraud, 1996)**

Organismes producteurs	Antibiotiques
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremoniumu</i>	Céphalosporine
<i>Cephalosporium caerulens</i>	Cérulinine

<i>Fusidium coccineum</i>	Acide fusidique
<i>Helminthosporium siccans</i>	Siccanine
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Griséoflavin

## 10. Classification des champignons

Historiquement, les champignons étaient classés en cinq ordres en fonction de leurs caractéristiques morphologiques. Selon le mécanisme de reproduction sexuée, quatre ordres sont définis : les Zygomycètes, les Chytridiomycètes, les Ascomycètes et les Basidiomycètes. Cependant, certaines moisissures pour lesquelles la reproduction sexuée n'a pas encore été observée sont classées parmi les Deutéromycètes. Ou champignon imparfait (**Chabasse et al., 2002**).

Les Ascomycota : peuvent avoir des fructifications qui produisent des spores sexuées à l'intérieur et des conidiophores qui produisent des spores asexuées aux extrémités (**Meyer et al., 2020**).

Basidiomycètes : Champignons parfaits caractérisés par la production de basidiospores externes aux extrémités ou sur les côtés de la baside.

Deutéromycètes : rassemble temporairement des champignons imparfaits jusqu'à ce que leur stade sexuel soit découvert (**Bousid, 2015**)

Zygomycètes : On retrouve plusieurs modes de vie, les plus courants étant le saprophytisme et le parasitisme (principalement d'insectes) (**Hawksworth 1991 ; Hawksworth & Rossman, 1997 ; Hawksworth, 2001**).

Chytridiomycota : est une branche de champignon qui se reproduit en produisant des spores mobiles (zoospore), généralement propulsé par un seul flagelle dirigé vers l'arrière. Ces organisme, communément appelé chytrides (**Bartnicki, 1970**)

**Table 2** : Classification simplifiée du règne des Fungi présentant les principales classes de champignons avec quelques espèces spécifique (**Ripert, 2013**)

Champignons imparfi	Deuteromycotina	L'espèce des blastomycètes (thalle
---------------------	-----------------	------------------------------------

		<p>levuriformes, blastospores)</p> <p><i>Hyphomycètes</i> (hyphes spores septes qui se forment directement sur les hyphes)</p> <p>Les coelomycètes sont des spores hyphes septées qui se forment dans des cavités de type pycnide ou acervule.</p>
Champignons perfï	<p>Zygomycotina (Zygomycètes : hyphes coenocytiques zygosporés)</p>	<p><i>Mucorales</i> : <i>Rhizopus</i>, <i>Absidia</i></p> <p>Les entomophthorales comprennent <i>Entomophthora coronata</i> et <i>Basidiobolus hapto sporus</i>.</p>
	<p>Ascomycotina (Ascomycètes : hyphes septés, ascospores)</p>	<p>Les taphrinomycètes comprennent <i>Taphrina neoformans</i> (Cloque du pécher).</p> <p><i>Saccharomycetes</i> : <i>Candida</i>, <i>Torula</i>, <i>Saccharomyces</i> etc.</p> <p><i>Euascomycetes</i> :</p> <p>Le <i>Tuber melanosporum</i> (Truffe) est un tubercule. La léotiale : <i>Sclerotinia fuckeliana</i> (<i>Botrytis</i> de la vigne) est présente.</p>
Champignons perfï	<p>Basidiomycotina (Basidiomycètes : hyphes septés, basidiosporés)</p>	<p>Urédinales : <i>Puccinia graminis</i></p> <p>Ustilaginales: <i>Ustilago tritici</i></p> <p>Trémellales: <i>Cryptococus syn.</i></p> <p>Polyporales : <i>Fistulina hepatica</i> (Langue de beeu)</p> <p>Clavariales : <i>Clavaria pistillaris</i></p>
	<p>Chytridiomycotina (Chytridiomycètes) :</p> <p>thalle réduit, limité à des zoosporocystes contenant des spores uniflagellées</p>	<p>Chytridiales : <i>Rhinosporidium seeberi</i></p>

## *Chapitre III*

### *Les microorganismes tests*

### 1. *Staphylococcus aureus*

C'est une bactérie en forme de coquille, sphérique fixe, à Gram positif, associé en grappes (grappes de raisin) ou en populations en forme de chaîne (**Belaidouni, 2017**). On a identifié *Staphylococcus aureus* comme une bactérie aérobie-anaérobie avec la capacité de produire de la catalase et de la coagulase, et qui peut supporter de très faibles activités de l'eau (**Alioua, 2015**). La sécrétion de toxines dans l'organisme lors d'une infection à *Staphylococcus aureus* peut entraîner des pathologies graves comme le syndrome de choc toxique, une maladie rare mais mortelle (**Accarias, 2014**)

*Staphylococcus aureus* est l'agent causal d'une intoxication alimentaire suite à l'ingestion d'entérotoxines préformées thermostables dans des aliments contaminés (**Vincenot et al., 2008**).



**Figure 4 :** *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et colorée artificiellement G ( $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ) (**Delarras, 2007**)

### 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Ce bacille à Gram négatif est présent partout, notamment dans le sol et dans les milieux aquatiques. Il n'a pas de spores, il n'a pas de capillaires, il a une forme droite ou légèrement courbée. Plusieurs isolats ont démontré leur capacité à se développer en milieu anaérobie en aérobie stricte. Il s'agit d'une bactérie mobile qui possède un flagelle mono triche polaire (**Van Alst, Wellington et al., 2009**), il se distingue par sa couleur verdâtre et son parfum doux, à l'origine de nombreuses infections dans les hôpitaux. C'est un bacille pigmenté qui est généralement vert fluorescent en raison de la présence de deux pigments la pyoverdine et la pyocyanine, il y a aussi des souches produisant des pigments rouges ou noirs (**Morand.A**

et Morand.J ,2017). Ce pathogène opportuniste peut provoquer des infections aiguës graves comme des infections urinaires, cutanées et oculaires (kératite des porteurs de lentilles de contact), des pneumonies et des septicémies (Obritsch et al., 2004)



**Figure 5:** *Pseudomonas aeruginosa*, vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Delarras, 2007)

### 3. *Klebsiella pneumoniae*

C'est un bacille Gram négatif (BGN), qui reste immobile (Freney et al., 2000)

Ils sont omniprésents, c'est-à-dire partout, notamment dans les milieux forestiers, les sols, les eaux de surface, les eaux usées (Janda et Abbott, 2006) Ces bactéries ont une oxydase négative, une nitrate réductase positive, une uréase positive, une réaction de Vogues-Proskauer positive (VP+), fermentent le glucose et produisent des gaz(Lagha,2015), *Klebsiella pneumoniae* est le chef de file d'un groupe d'entérobactéries opportunistes fortement associées aux infections nosocomiales et est responsable d'infections diverses : infections purulentes, infections urinaires, infections des voies respiratoires, infections des voies biliaires, infections hépatiques intra-abdominales, bactériémie, sepsis, site opératoire. Infection (Sekhri, 2011).



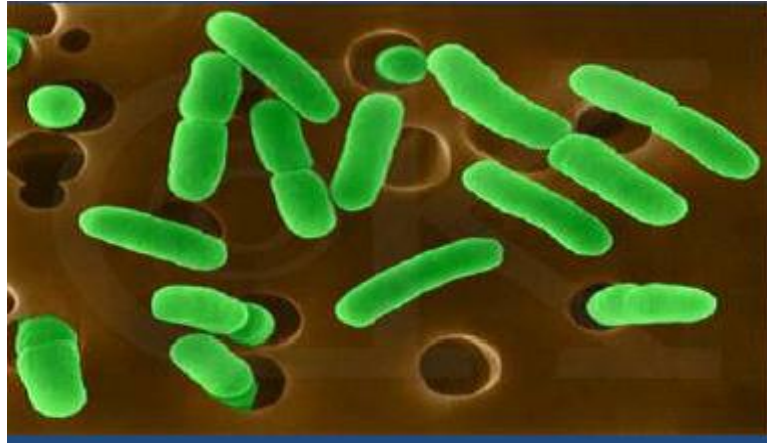


**Figure 6** : Observation microscopique de *Klebsiella pneumoniae* (Janda et Abbott, 2006)

#### **4. *Escherichia coli***

Sont bactéries anaérobies facultatives Gram négative sont des indicateurs de contamination fécale et d'un mauvais assainissement (Sugrue et al., 2019)

*Escherichia coli* est présent naturellement dans le tube digestif des humains et de nombreux animaux (Université P et Marie , 2003). Les souches pathogènes d'*Escherichia. Coli* sont capables de se multiplier et de persister dans le tube digestif de l'hôte en échappant aux défenses immunitaires et en induisant des dommages cellulaires. L'étude de différents modèles d'interaction entre l'hôte et les bactéries au cours de l'infection permet de diviser les souches pathogènes d'*Escherichia coli* en deux pathotypes principaux, les agents pathogènes extra-intestinaux (Ex PEC), qui provoquent des infections des voies urinaires et des méningites chez les nouveau-nés ou des septicémies, et les Agents pathogènes(InPEC) causant des maladies entériques. (Dobrindt et al., 2003, Dobrindt 2005, Kern Benaibout 2006).

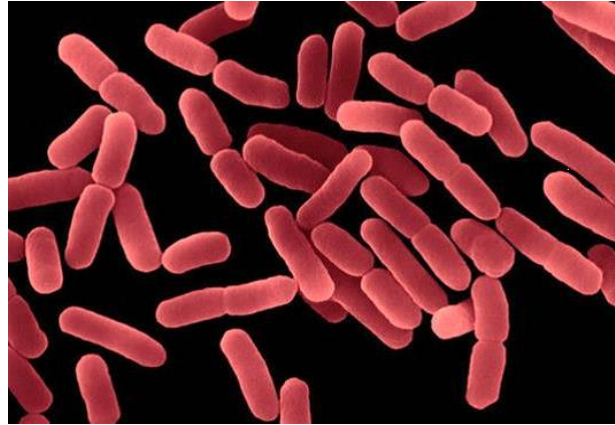


**Figure 7 :** *Escherichia coli*, vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement (Delarras, 2007)

### 5. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* (BS) est une bactérie à Gram positif, ce qui signifie que sa membrane est composée d'un peptidoglycane (polymère) et d'une couche lipidique, qu'elle est en forme de bâtonnet et qu'elle est aérobie (Fkunst et al.,1997) .Les bactéries du groupe *Bacillus subtilis* produisent un grand nombre d'enzymes extracellulaires, dont certaines peuvent provoquer des modifications des propriétés sensorielles de nombreux produits transformés dans l'industrie alimentaire.

Parmi ces enzymes extracellulaires on retrouve notamment les protéases, les lipases et l'amylase (Harwood and Kikuchi, 2022), une bactérie qui forme des spores capables de survivre dans des conditions extrêmes, se trouve à la surface du sol. Des anomalies peuvent provoquer une intoxication alimentaire (Kunst et al.,1997). Cependant, le pouvoir pathogène de *B. subtilis* est très faible, et c'est l'extraction et la purification d'enzymes protéolytiques qui ont permis de se concentrer sur certaines pathologies professionnelles allergiques (Mezni et al., 2010).



**Figure 8 :** Observation microscopique de *Bacillus subtilis* [www.wisegeek.com](http://www.wisegeek.com) consulté le novembre 2011

### 6. *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus faecalis* est un coque Gram positif, anaérobie facultatif et non sporulé (Jain et al., 2016), les cellules d'*Enterococcus faecalis* sont sphériques ou ovales. Sont regroupées en cellules simples ou en paires. ou chaînes courtes, et souvent allongées dans le sens de la chaîne. La plupart des souches d'*Enterococcus faecalis* sont non hémolytiques et immobiles (Isabela et al., 2004). La bactérie *Enterococcus faecalis* est souvent détectée lors d'infections endodontiques. Elle est responsable de plus de 90 % des infections à entérocoques chez les humains (Kayaoglu et Orstavik, 2004)



**Figure 9:** Observation microscopique *Enterococcus faecalis* (Camille, 2007)

### 7. *Candida albicans*

La levure *Candida albicans* est un champignon unicellulaire microscopique capable de former des filaments. Leurs cellules sont ovoïdes avec un seul bourgeon de plusieurs microns de diamètre. Les filaments, en revanche, sont des cellules allongées qui sont attachées de bout en bout. Bien qu'elle soit généralement présente en quantité relativement limitée dans l'organisme humain, elle peut provoquer des pathologies graves dont la fréquence reste constante (Pfaller et al., 2007). C'est une levure commensale dans les muqueuses vaginales et digestives (Samaranayake et al., 2005 ; Irimés et al., 2008). La candidose superficielle implique des infections affectant les muqueuses de la peau et est principalement causée par *Candida albicans* (Hay, 1999). La candidose profonde est causée par la colonisation du tube digestif par *Candida* également connue sous le nom de candidose viscérale, est l'infection nosocomiale la plus courante et est préoccupante en raison de sa morbidité et de sa mortalité élevées. Elle est généralement causée par des mutations endogènes ou exogènes (Nicolas, 2016).



**Figure 10:** *Candida albicans* vue au microscopique et colorée (Camille, 2007)

# *Matériel et Méthodes*

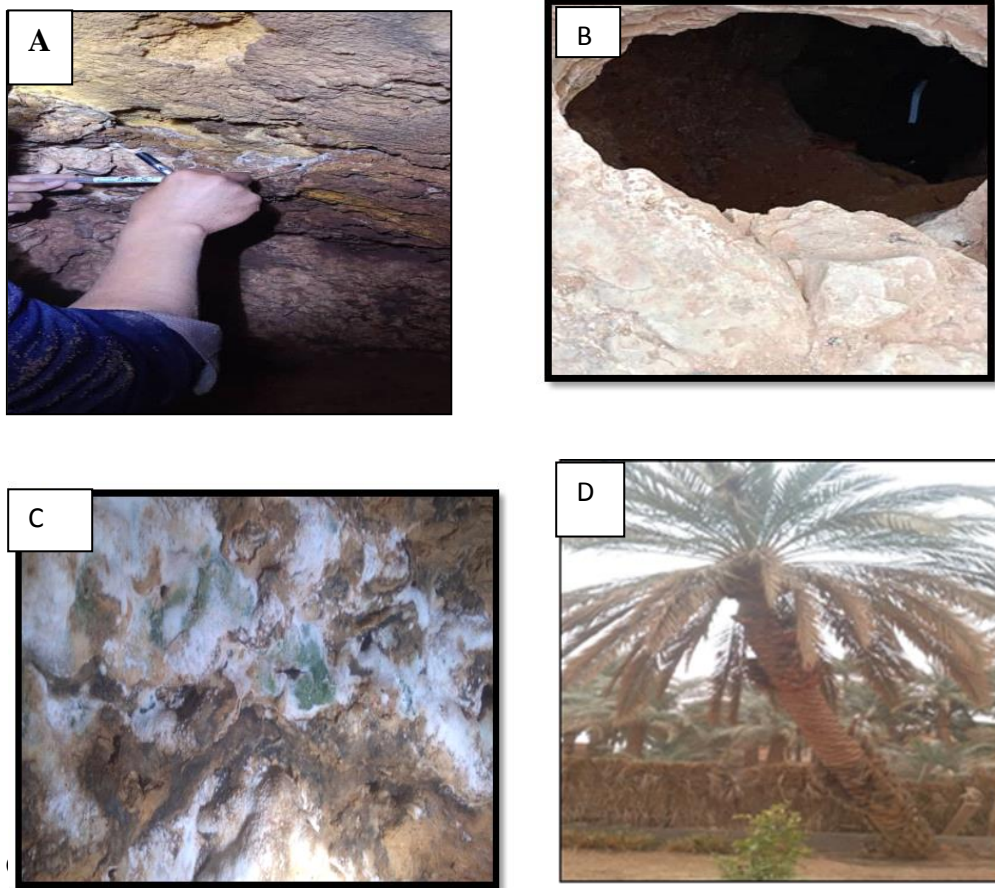
### 1. Échantillonnage

Le prélèvement du sol a été réalisé à partir d'une grotte de Noufigher dans la wilaya de Ghardaïa le 23 février 2024 dans des conditions d'asepsie à l'aide d'une spatule stérile. Le sol a été récupéré dans des sacs en plastiques stériles soigneusement fermés puis conservées au laboratoire à 4°C avant les analyses. De plus un écouvillonnage a été réalisé à partir des roches de la grotte recouvert de moisissures (**figure1**)

**Tableau 03** : Origines et aspects de l'échantillon du sol prélevé.

Echantillon	Origine	La distance entre l'entrée de la grotte et le site d'échantillonnage	Description	Date
C1	Sol de la grotte	50m	Sol brun et granuleux abondant en matière organique	23/02/2024





**Figure 11** : Zone d'échantillonnage. [A] : Prélèvement du sol ; [B] : Entrée de la grotte ; [C] : l'intérieure de la grotte ; [D] : vue de l'extérieure de la région(Photos personnelles, 2024).



**Figure 12** : Prélèvements effectués par l'écouvillonnage

### 2. pH du sable

20 g de sol sec de chaque échantillon de sol ont été traités avec 50 ml Eau distillée. Le mélange doit être agité à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 2 minutes. (**Institut de Génie Rural, 1973**), à l'aide d'un pH-mètre (HANNA pH 209), où l'électrode a été insérée dans chaque échantillon, trois répétitions ont été effectuées.



**Figure 13:** Mesure du pH du sable.

### 3. Isolement des Moisissures

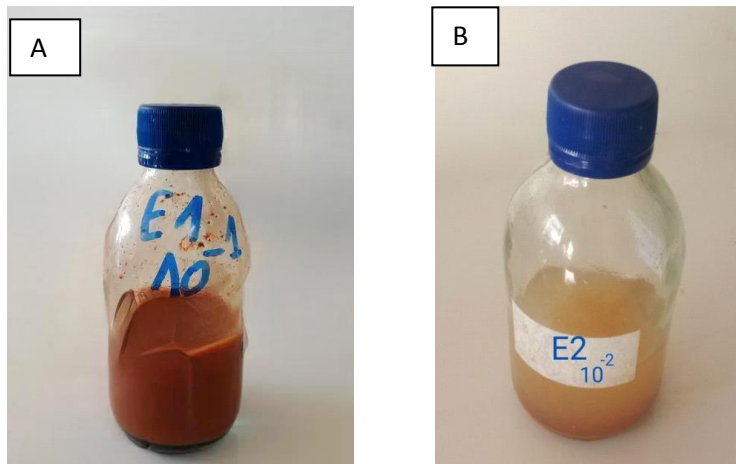
Les ensemencements sont réalisés par la méthode de suspension-dilutions, On suspendre 10g de terre fraîche dans 90mL d'eau physiologique stérile (NaCl 9 g.L-1), ce qui représente la dilution  $10^{-1}$ . Après homogénéisation au vortex, on effectue des dilutions décimales dans l'eau physiologique stérile jusqu'à  $10^{-5}$ , puis on étale 100  $\mu$ L de chaque dilution se produit à la surface des milieux de culture telque: CDAr., CDA, PDAacidifié, PDAr et MEA.

Après ensemencement, les boites sont incubées à  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 5 à 7 jours. . Les colonies ont été repiquées et purifiées sur milieu PDAacidifié.

-Isolement par ecovillions des moisissures :

Isolement des moisissures a partir des ecovillions des moisissures a été réaliser sur les milieux de cultures : CDAr., CDA, PDAacidifié, PDAr et MEA.





**Figure 14:** Préparation des dilutions des échantillons de la grotte

#### 4. Repiquage et purification

Une fois les colonies bien développées, nous avons repiqué chaque colonie pour purifier le champignon et minimiser le risque de contamination jusqu'à ce que nous parvenions à isoler une seule colonie d'un champignon donné sur chaque boîte de Pétri (**Guiraud, 1998**)

Le repiquage est réalisée en prélevant des fragments de colonies à l'aide d'une anse stérilisée en évitant tout contact avec d'autres colonies adjacentes dans la même boîte sur une nouvelle boîte pendant six jours jusqu'à l'obtention d'une souche pure.

#### 5. Identification des moisissures

L'identification des champignons filamenteux repose sur des critères de culture, de température et de vitesse de croissance, mais surtout sur des critères morphologiques qui combinent l'aspect macroscopique et la morphologie microscopique de la culture (**Tikour, 2018**).

##### 5.1. Observation microscopique

L'identification microscopique a été réalisée par culture de moisissures sur des lames de verre en utilisant la méthode Scotch (**Barnett et Hunter, 1972**), qui consiste à placer un fragment du ruban adhésif à la surface de chaque thalle fongique requis pour l'identification. Après cela, le ruban est enveloppé sur une lame avec une goutte de bleu de coton ou lactophénol. Ensuite, la lame est examinée par microscopie optique (grossissement  $\times 10$ ,  $\times 40$ ,  $\times 100$ ). **Figure15**



**Figure15** : Méthode de Scotch.

## 6. Test d'activité antimicrobienne

Après avoir cultivé les souches des moisissures pendant 14 jours à 28 °C, elles ont été inoculées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu PDA pour étudier la production de substances inhibitrices contre les bactéries testées Gram-positives et Gram-négatives.

**Tableau4** : Souches de référence utilisée dans les différents tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

	Microorganismes	Gram	Code
<i>Bacteries</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 29213
	<i>Bacillus Subtilis</i>		ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 700603
Levures	<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231

ATCC : American Type Culture Collection

## 7. Criblage par la technique des cylindres d'agar

### 7.1. Test d'activité antibactérienne

Les isolats de moisissures ont été inoculés en strie serrées à la surface d'un milieu PDA et incubés à 25°C pendant environ 7 jours. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont ensuite été retiré à l'aide d'un l'emporte-pièce à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement

inoculé avec les bactéries testées. Par la suite, la boîte a été mise à 4°C pendant 2 heures afin de favoriser la diffusion des substances (Kitouni, 2007) Elles sont ensuite incubées à une température de 37 °C pendant une durée de 24 heures. On mesure alors les zones d'inhibition qui se forment autour des cylindres (Belyagoubi *et al.*, 2018).

### 7.2. Test d'activité antifongique

La méthode de test d'activité antibactérienne est similaire à celle utilisée pour *Candida albicans*. sauf que la pré-culture est réalisée sur bouillon Sabouraud et la gélose est celle de Sabouraud au lieu de Muller-Hinton, et l'incubation des levures se fait 48 heures à 30°C.

On a utilisé des disques d'antibiotiques comme des molécules de référence : antibactériens (Ampicilline (10 µg) et antifongique (Nystatine, 100µg)(Belyagoubi,2014)

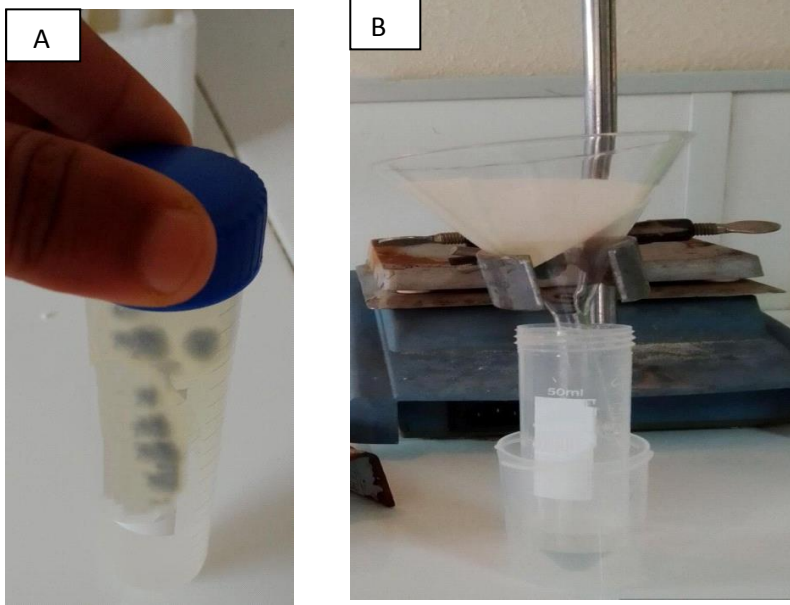


**Figure16:** Antibiotiques testés : Ampicilline (10 µg),

**Remarque :** Un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 24 heures et a été suspendu dans un milieu Muller-Hinton stérile afin d'obtenir une densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm pour chaque bactérie-test(Normes CLSI, 2012 ; Normes CLSI, 2014).

### 8. Criblage par la technique des puits

La culture des champignons en milieu liquide a été réalisée sur bouillon PDAac. (Bosco, 2016), incubation à 25°C pendant 14 jours. On Préparer les bactéries d'essai dans une boîte de Pétri avec une couche de gélose Mueller-Hinton et Sabouraud pour *candida albicans* . Après le séchage, des puits de 6 mm sont creusés au cutter. Les puits préparés sont prêts à recevoir 100 µL de filtrat. La boîte est ensuite laissée à 2h pendant 4 °C puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres de la zone d'inhibition sont mesurés (Lemriss *et al.*, 2003 ; Valanarasu *et al.*, 2010).



**Figure17** : Culture de *Penicillium* sur milieu liquide [A] et Filtration du milieu liquide [B].

# *Résultats et Discussion*

### 1. Le pH du sol

Le Tableau 8 résume le pH des échantillons du sable de la grotte, selon la composition de sol saharien, le sol a une couleur marron légèrement jaune, avec facilité de dessèchement, sol est humide. Ils se distinguent par un pH légèrement alcalin.

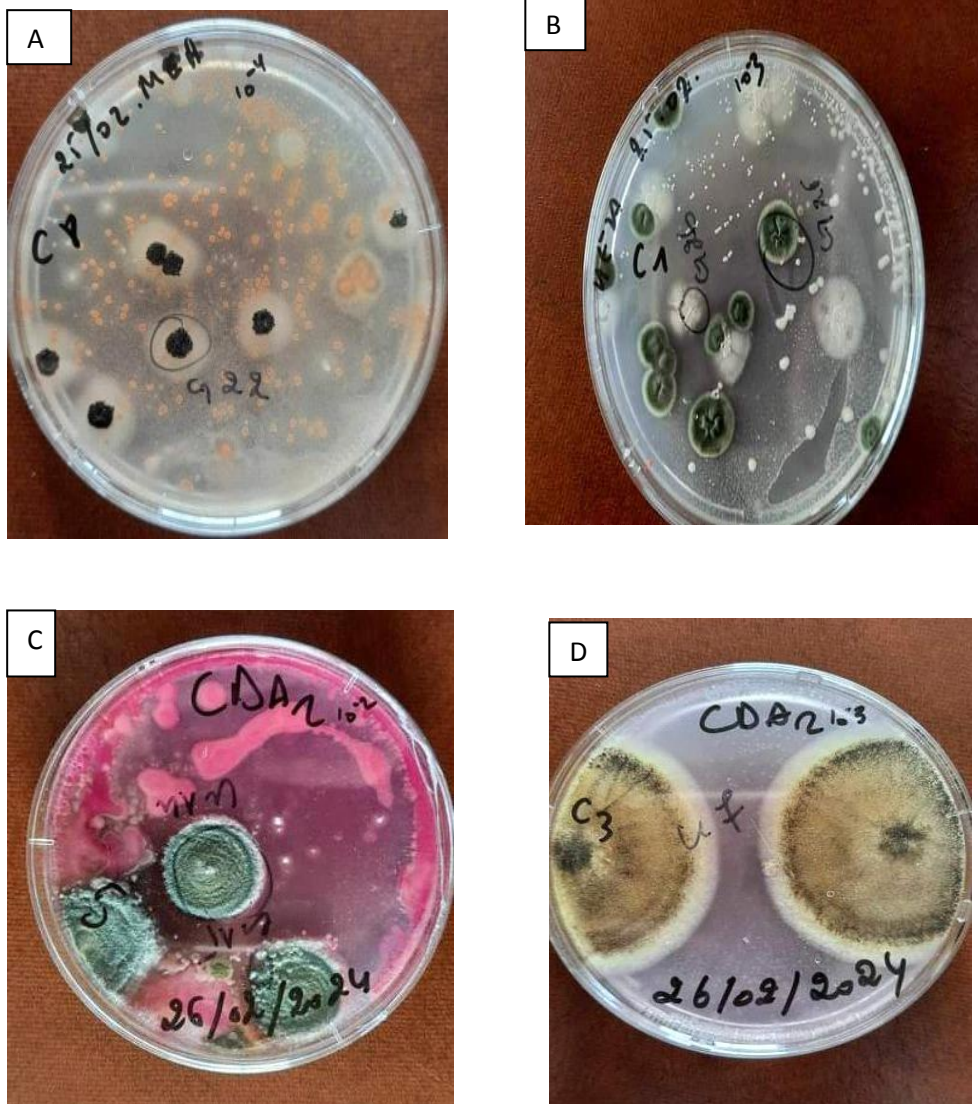
**Tableau 05** : pH des échantillons de la grotte

Echantillon	pH
pH du sol	8,82 ± 0,4

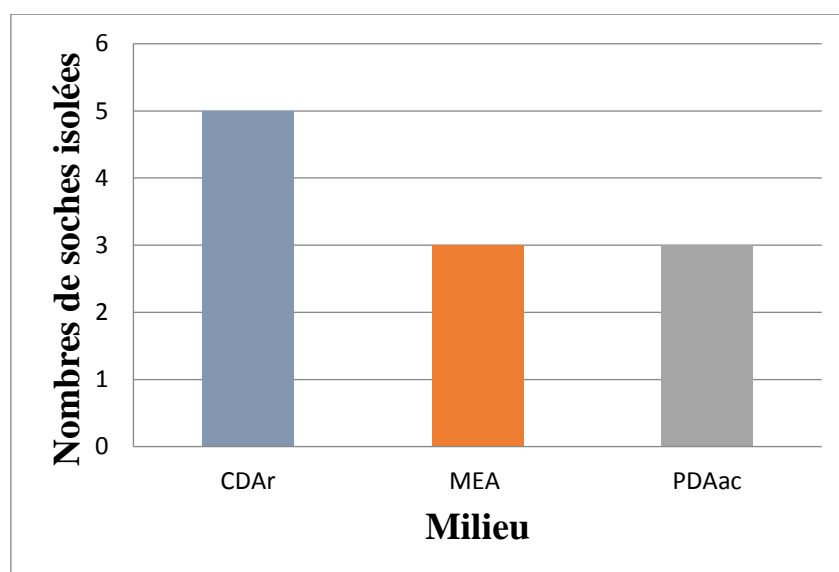
### 2. Les champignons

#### 2.1. Isolement des moisissures

11 souches de moisissures ont été isolées à partir de sol. La purification a été effectuée en repiquant la souche sur le milieu PDAac jusqu'à l'obtention d'une souche pure (**Figure 17**).



*Figure 18 : Photos des isollements des champignons du sol de la grotte sur les milieux MEA : [A]; [B]; et CDAR : [C] ; [D]*



**Figure 19:** Nombre des souches isolées des échantillons de la grotte.

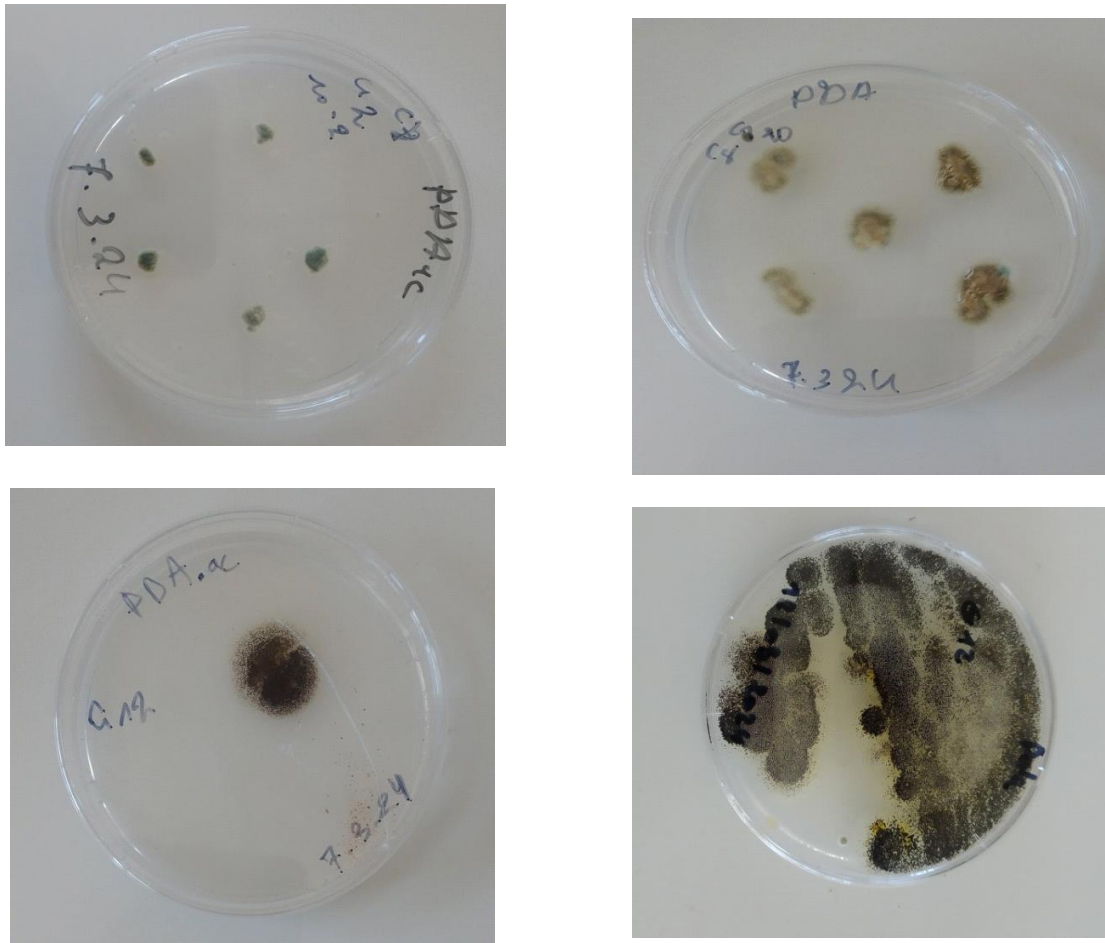
Le graphe montre le nombre de souches isolées d'échantillons de grottes sur différents milieux, avec un grand nombre de souches fongiques sur milieu CDAr (05/11), suivi des milieux MEA et PDAac où nous avons obtenu 3 souches fongiques.

La figure 19 révèle les valeurs moyennes des différentes souches fongiques présentes dans les différents milieux avec des charges plus élevées dans les milieux CDAr.

Depuis toujours, le criblage a joué un rôle crucial dans l'obtention de nouvelles molécules antibactériennes. Son rendement a diminué ces dernières années, mais il est encore pratiqué par de nombreux laboratoires jusqu'à présent. Ceux-ci ont cherché à varier les sources de microorganismes en utilisant des échantillons issus des habitats les plus exotiques et en développant des méthodes de sélection qui promouvoient des espèces rares (**Abdelaziz, 2006**).

### 2.2. Purification des moisissures

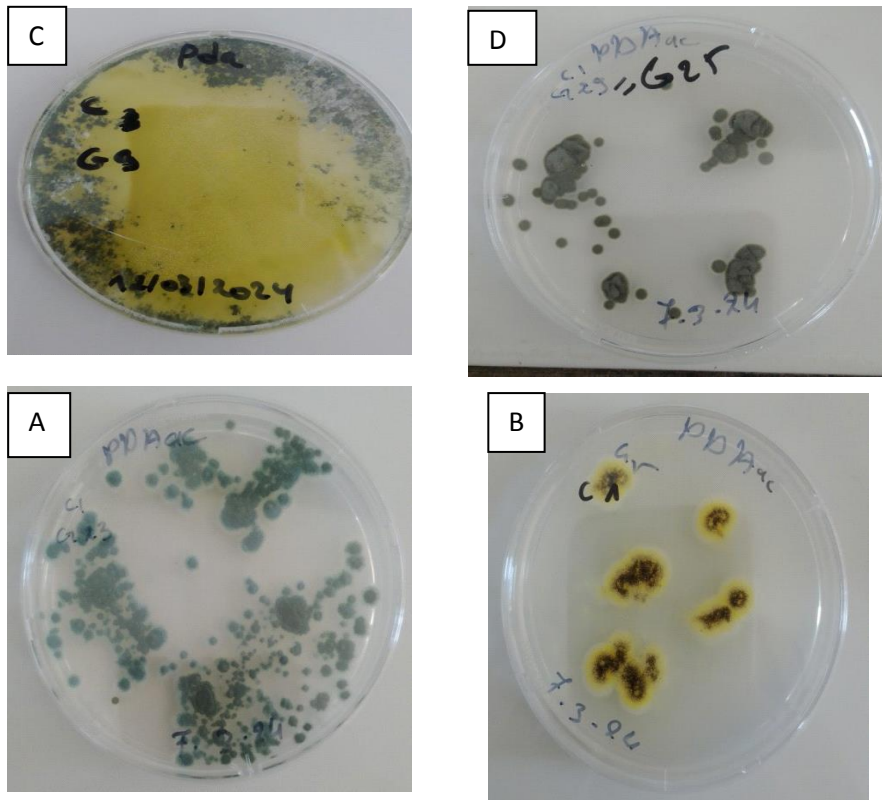




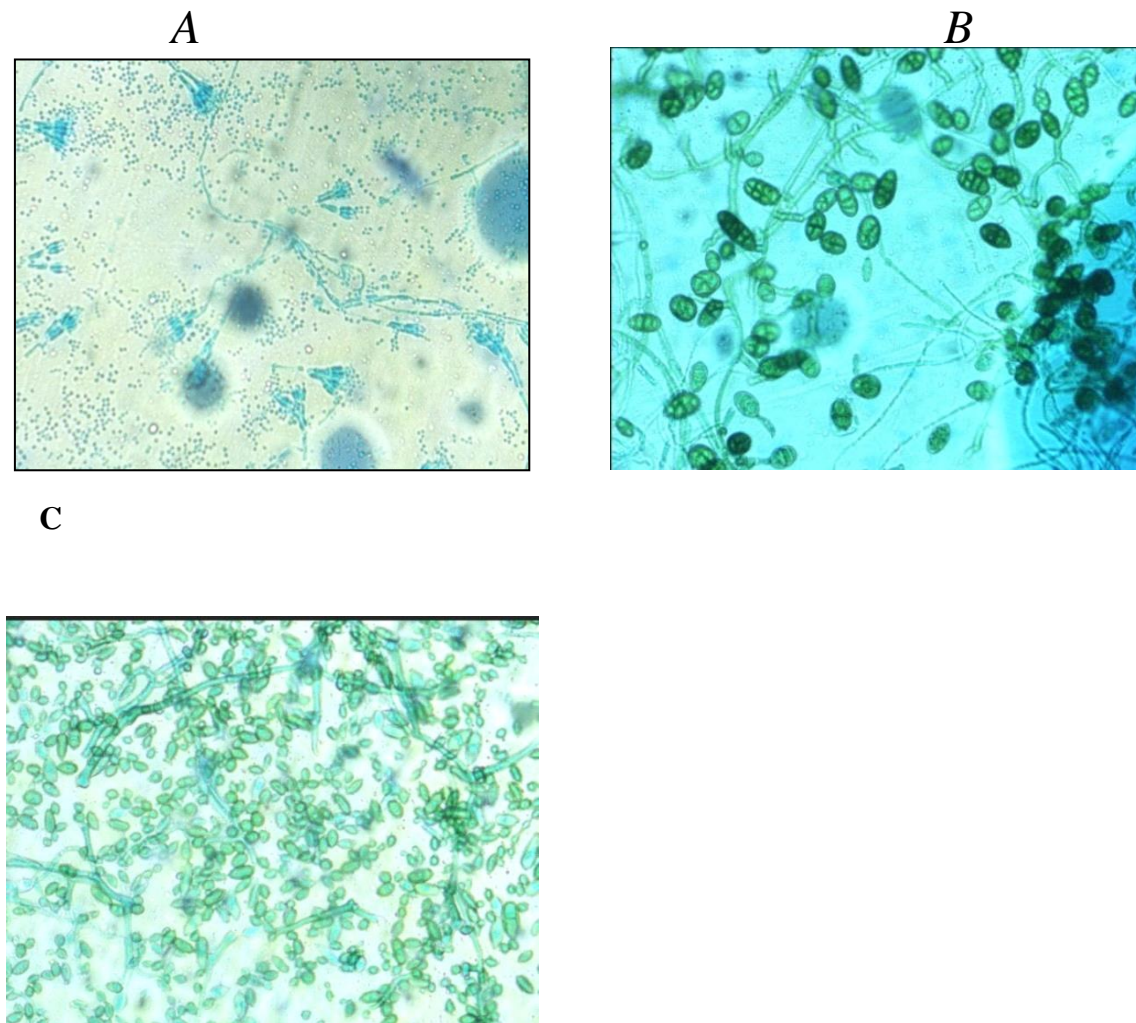
**Figure 20:** Photos de purification des champignons du sol de la grotte sur le milieu PDAac

### 3. Identification des mycètes

Les espèces fongiques sont identifiées en se basant sur l'étude de critères cultureux tels que la température et le taux de croissance, ainsi que sur des critères morphologiques. Ce dernier est constitué de paramètres macroscopiques (aspect de la colonie, son revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, de phialide, des conidiophores) (Tabuc, 2007)



**Figure 21:** Aspect macroscopique de *Penicillium* sp [A]; d' *Aspergillus niger* [B]; *Trichoderma* [C]; ; *Cladosporium* [



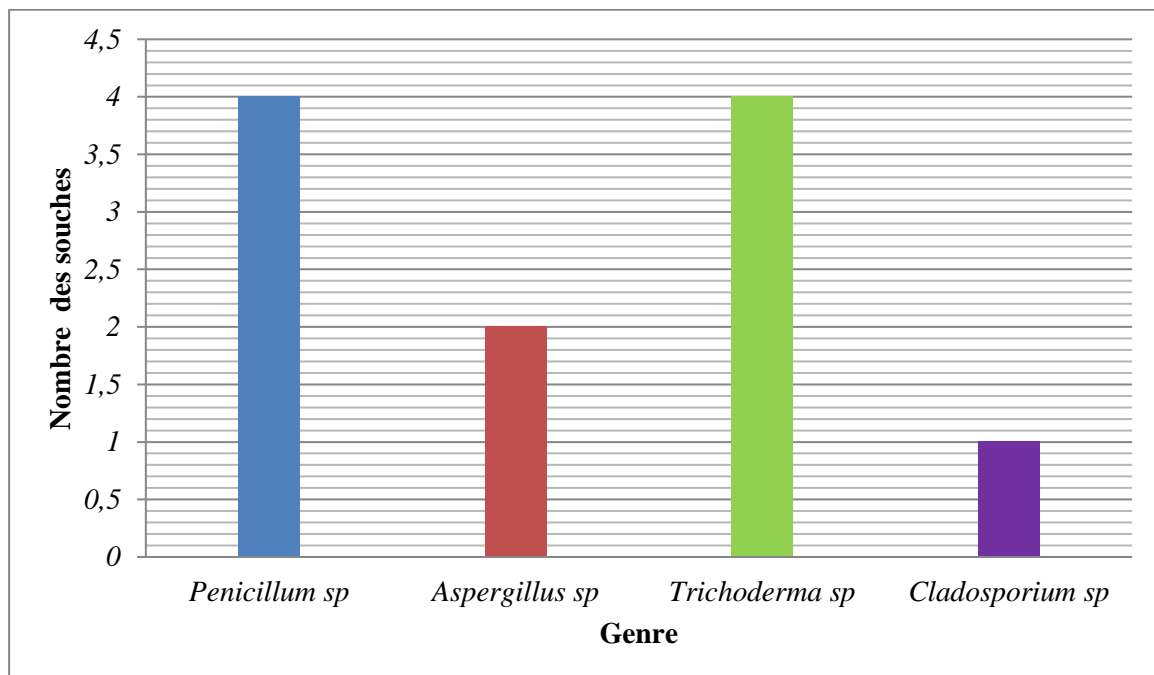
**Figure 22:** Observation microscopique de *Penicillium* sp [A]; *Alternaria* sp. [B]; et *Cladosporium* sp[C].

**Tableau 06:** Aspect microscopique et identification microscopique des souches isolées.

Code de la souche	Milieu / Dilution	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1	CDAr/10 <sup>-1</sup>	Rond grand périphérique noire	<i>Asprgilusniger</i>
S2	PDA ac/10 <sup>-3</sup>	Rond noir	<i>Cladosporum</i>

## Résultats et Discussion

<b>S3</b>	MEA/10 <sup>-3</sup>	Rond verte cotonné	<i>Trichoderma</i>
<b>S4</b>	CDAr/10 <sup>-3</sup>	Rond verte	<i>Trichoderma</i>
<b>S5</b>	PDAac/10 <sup>-3</sup>	Rond noir	<i>Aspergillus niger</i>
<b>S6</b>	PDAac/10 <sup>-4</sup>	Rond vert cotonné	<i>Penicillium</i>
<b>S7</b>	CDAr. 10 <sup>-3</sup>	Gris cotonné	<i>Penicillium</i>
<b>S8</b>	E3 MEA. 10 <sup>-2</sup>	Rond vert petit	<i>Trichoderma</i>
<b>S9</b>	E1MEA. 10 <sup>-2</sup>	Rond vert	<i>Trichoderma</i>
<b>S10</b>	CDAr. 10 <sup>-3</sup>	Grand vert	<i>Penicillium</i>
<b>S11</b>	CDAr. 10 <sup>-2</sup>	Petit Rond vert	<i>Penicillium</i>



**Figure23:** Nombre de genres isolés à partir de la grotte de Noufigher.

## Résultats et Discussion

---

La figure montre que les genres dominant sont *Penicillium Sp* et *Trichoderma Sp* avec un pourcentage égaux par ordre de 4 isolats sur 11 souches, suivi par le genre d'*Aspergillus Sp* de pourcentage d'ordre de 2 isolats sur 11 souches, tandis que le dernier genre *Cladosporium* est les moins répondu.

Nos travaux coïncident avec les travaux de **Baiying Man( 2015)** Les genres sont (dans l'ordre d'abondance relative) *Penicillium* (54%), *Paecilomyces* (22%), un genre non classé (9%), *Cladosporium* (7%), *Beauveria* (4%), *Botrytis* (2 %) et *métacordyceps* (2 %).

Nos travaux sont cohérents avec ceux de **ZEKRI ( 2017)** qui a révélé que le genre le plus élevé était *Penicillium* avec 6 souches sur 9 isolats, c'est donc le plus rencontré dans les sédiments.

Selon les recherches menées par **Rahmani ( 2017)** dans la grotte Kaws (Honaine), il a été constaté que la majorité des souches sont de *Penicillium*, avec un total de 3 souches sur 9 isolats.

Selon les résultats de **Kholkhal (2006)**, la majorité des isolats du sol de la grotte d'Ain fezza ont été identifiés comme des *Penicilliums*

On retrouve sur la plupart des terrains des espèces fongiques telles que les *Aspergillus*, *Penicillium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Mortierella*, *Zygorhynchus*, *Chaetomium*, *Gymnoascus*, etc. Elle abrite également des *Oomycetes* et des *Chytridiomycetes* (**Boiron, 1996**).

Selon les travaux de **Djebbah en 2016**, il a été démontré que la majorité du genre est *Penicillium*, avec 6 isolats sur 8, c'est donc le plus rencontré dans le sol, tandis que les autres espèces réagissent le moins.

### 4. Résultats de l'activité antimicrobienne

**Tableau 7:** Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches (méthode des cylindres d'agar des moisissures).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur les bactéries test							
souches	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
1	-	-	-	-	-	-	-
2	7±0	10,50±2,12	4,50±0,71	0±0	0±0	5,5±7,71	0±0
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-

(-) : Pas d'activité.

**Remarque :** concernant la méthode des puits aucun résultat positif n'a été marqué.

Sur la base des résultats des travaux de **Rahmani (2017)**, des souches de *Cladosporium* ayant une activité microbienne contre *Bacillus subtilis* ont été obtenues. En revanche, dans notre étude, il semble être actif contre 4 espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*

Ces résultats concordent avec les résultats de ceux de **Abdelkhalek(2017)** qui a obtenu que la souche de *Cladosporium* a présenté une activité antibactérienne appréciable. et développé l'activité antibactérienne la plus importante sur 4 bactéries testées, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *M.Luteus*

Les résultats du test d'activité antibactérienne des isolats ont montré que certaines souches avaient une activité antibactérienne contre les bactéries testées, parmi les quelles la souche S2 (*Cladosporium*) était active contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* (Tableau 10).



Figure 24 : effet de *Cladosporium .sp* sur *Enterococcus faecalis*

### 5. La sensibilité des souches pathogènes aux antibiotiques

Tableau 08: Résultats de la sensibilité des bactéries tests aux antibiotiques

Méthode	Puits						
Souches de référence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
Amp	3,5±4,95 (R)	3,5±4,95 (S)	0±0 (R)	4,5±6,36 (S)	5,5±7,78 (R)	3±4,24 (S)	0±0 (R)

Amp : Ampicilline. **S** : Sensible, **I** : Intermédiaire, **R** : Résistante : Selon les recommandations du **Comite de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie en 2022**.

Les résultats obtenus montrent que l'ampicilline a un effet sur les microorganismes pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition varient entre 6 et 11 mm (Tableau 11)

Tableau 09: Résultats de la sensibilité à la nystatine de la levure (diamètres en mm).

## Résultats et Discussion

Méthode	Puits
antifongique	Nystatine
<i>Candida albicans</i>	10,5±0,71 (S)

**S** : Sensible, **R**: Résistante : Selon **Drouhet et Dupont (1976 ; 1978) ; Drouhet et al, 1981**).

Les résultats montrent que la souche *Candida albicans* présente une sensibilité à la nystatine

Suite aux travaux de **Belyagoubi et al. (2018)**, un total de 23 souches de *Penicillium* ont été sélectionnées pour le dépistage de l'activité antibactérienne contre les micro-organismes pathogènes Testé par la méthode du cylindre d'agar et a montré une activité antibactérienne contre au moins un des micro-organismes testés (à l'exception de *Pseudomonas aeruginosa*, qui était l'espèce la plus résistante), indiquant que ces champignons produisent un certain type de substance antibactérienne. Responsable de l'inhibition des micro-organismes testés. Les souches actives sont montrés une forte activité inhibitrice contre les micro-organismes pathogènes et le diamètre de la zone d'inhibition variait de 7,5 à 26 mm. Il présente la meilleure activité contre *Candida albicans*, avec un taux d'inhibition de 43,38 % (10/23).

Suite aux travaux **d'Isuru Priyaranga Silva al. (2021)**, seuls trois isolats sur huit (SKW 301, SKW 404 et SKW407) de tous les isolats fongiques testés ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un agent pathogène. Ainsi, les isolats fongiques du plafond de la grotte SKW 301 et de la paroi de la grotte SKW 404 ont montré une activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* à Gram positif, tandis que l'isolat fongique de la paroi de la grotte SKW 407 a montré une activité antibactérienne contre *Pseudomonas aeruginosa*. Ces isolats ont pu présenter une activité antimicrobienne contre *Escherichia coli*, *Candida albicans* et *Candida parapsilosis*.



# *Conclusion*

## Conclusion

---

La résistance aux antibiotiques constitue actuellement l'une des menaces les plus graves pour la santé mondiale où elle augmente rapidement. La conception de ce travail est basée sur la recherche des souches et de moisissures à activité antibactérienne et antifongique dans les roches et sédiments de la grotte Noufigher dans la région de Ghardaïa.

L'étude des caractéristiques macroscopiques et microscopiques des moisissures a permis d'identifier 11 souches de genres différents, les champignons les plus dominants appartenant aux genres *Penicillium* (04/11) et *Trichoderma* (4/11).

Les moisissures synthétisent un grand nombre de substances complexes économiquement importantes, notamment des antibiotiques, dont les principaux producteurs sont *Penicillium*.

Pour sélectionner les souches productrices de métabolites antimicrobiens, différents milieux de production d'agents antimicrobiens ont été utilisés, tels que PDA, MEA, CDA, et différentes techniques (technique du cylindre d'agar et technique du puits) ont été utilisées pour démontrer leurs capacités inhibitrices.

Les isolats ont été testés pour leur activité antibactérienne, et il a été constaté que certaines souches ont une activité antibactérienne sur au moins une des bactéries testées, avec des zones d'inhibition allant de 4 à 12 mm.

Afin de compléter cette discussion sur la flore fongique, nous suggérons :

- ✓ une analyse plus approfondie de la diversité biologique du site de prélèvement.
- ✓ Analyse moléculaire des souches trouvées, Repérage des composés produits.
- ✓ Recherche d'espèces qui produisent des métabolites d'intérêt industriel et biotechnologique (enzymes, antibiotiques, etc.).

# *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

---

- Abdelaziz, W. (2006). Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magister, option Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri de Constantine, Département des Sciences de la nature et de la Vie. 100 p.
- Abdelkhalek, M(2017). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte *Kaws* – Honaine. Mémoire de Master en Microbiologie, Algérie, Inst. de Biologie - Faculté des Sciences, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen. 127p.
- Abdoulahi, H. O., Tidjani, A., Sawadogo, A., Tarnagda, B., Abakar, L. I., Cissé, H., ... & Savadogo, A. (2019). Isolement et caractérisation de souches fongiques à partir de poissons fumés/séchés du lac Fitri au Tchad. *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*, 2(4), 155-160.
- Accarias, S. (2014). Impact du phénotype des macrophages résidents sur la nature de la réponse inflammatoire précoce lors d'une infection par *Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Université de Toulouse, Université Toulouse III-Paul Sabatier).
- Adetutu, E. M., & Ball, A. S. (2014). Microbial diversity and activity in caves. *Microbiology Australia*, 35(4), 192-194.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology fifth edition*. Ed Elsevier Academia Press. San Diego Calif. USA.
- Aguire.(2004). Effet de la composition du substrat sur la culture des champignons comestibles du genre *Pleurotus* (*Pleurotus ostreatus*). Mémoire de Magister, Option Production Végétale. Algérie, Inst. de Biologie - Faculté des Sciences, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen.88p.
- Alborch L., Bragulat M.R., Abarca M.L., Cabañes F.J. Temperature and incubation time effects on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus sclerotioniger* and *Aspergillus laticoffeatus* on culture media. *Letters in Applied Microbiology* (2011) 52, 208-212.
- Alioua, M.A. (2015). Les Staphylocoques : sensibilité aux antibiotiques et profil moléculaire de *Staphylococcus aureus* Résistant à la Méricilline. Thèse de doctorat. Faculté des Sciences. Université Badji Mokhtar – Annaba, Algérie. 223p
- Antaki-M.(2020). étude de l'antagonisme in vitro de *penicillium* isolée des grottes vis-à-vis des champignons phytopathogènes de la pomme de terre. Mémoire de Master en Microbiologie et Contrôle de Qualité, Algérie, Inst. de Biologie - Faculté des Sciences, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen.85p.
- Baiying, M., Hongmei, W., Xing, X., Ruicheng, W., Yuan, Y., and Linfeng, G.(2015).Phylogenetic diversity of culturable fungi in the Heshang Cave,central China. . *Front. Microbiol.* 6:1158.

## Références bibliographiques

---

Barnett, H. L. and Hunter, B.B.(1972).Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota(USA):3emeedition.

Bartnicki-Garcia S. 1970. Cell wall composition and other biochemical markers in fungal Phylogeny. In: Harborne JB, ed. Phytochemical Phylogeny. London: Academic Press. p 81–103

Belaidouni N-W. (2017). Interactions des bactéries lactiques vis-à-vis à des bactéries Pathogène, Université abdelhamid ibn badis-mostaganem faculté des sciences de la nature et de la vie .16-17p.

Belyagoubi, L.(2014) Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Th. doctorat : biologie : Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.

Belyagoubi L., Belyagoubi-Benhammou N., Jurado V., Dupont J., Lacoste S., Djebbah F., Ounadjela F.Z., Benaïssa S., Habi S., Abdelouahi D.E. and Saiz-Jimenez C( 2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. International Journal of Speleology, 47 (2), 189-199.

Berdy J.(2005) Bioactive microbial metabolites. J Antibiot. 58 :1-26.

Binder, E.M. (2007) Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Animal Feed Science and Technology*, Feed Safety, 133, 149–166.

Bissett J., 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Pachybasium*. Can. J. Bot., 69: 2373-2417.

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

Bon, (2004). Inventaire des champignons supérieurs dans la région de Tlemcen. Mémoire de Magister, en Génétique. , Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen. 57p.

Bosco Jouda, J. Kanga Mawabo, I. Augustin, N. Djama Mbazona, C. Nkenfou, J. Wandji, C. Nkenfou, N.(2016). Anti-mycobacterial activity of polyketides from *Penicillium sp.* endophyte isolated from *Garcinia nobilis* against *Mycobacterium smegmatis*. Elsevier. Cameroon

Botton, (1985).Les moisissures utiles et nuisibles : importance industrielle. Masson-Paris. p. 265.

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

## Références bibliographiques

---

Bouchet, P ; Guignard, J-L ; Pouchus, Y-F ; Villars, J. les champignons, mycologie fondamentale et appliquée. Paris : Masson, 2005. ISBN : 2-294-02116-9.

Bousid N., 2015. Les champignons et pseudo-champignons pathogènes des plantes cultivées biologie, nouvelle systématique, interaction pathologique, publication de l'inat.p34

Bryden, W.L.(2012) Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*.173, 134–158.

Butler M.J.et Day A.W. 1998. Fungal melanins : a review. *Canadian Journal of Microbiology*, 44, 1115-1136.

Cahagnier B., Melcion D., Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Letters in Applied Microbiology* (1995) 20, 247–251.

Camille Delarras (2007); microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle Sanitaire, 476 page. (p 320,341, 296,248, 250, 358,359).

CA-SFM / EUCAST, Société Française de Microbiologie : « Communiqué 2022 du CA-SFM ».

Chabasse, D., Bouchara, J.P., de Gentile, L., Brun, S., Cimon, B., Penn, P. 2002. Les moisissures à intérêt médical. Cahier de formation N° 25. Bioforma 230 bd raspail 75014 Paris.

Chabasse D., bouchara J.P., de gentile L., bruns S., cimon B. et penn P. (2002). les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, bioforma. 159 p.

Chabasse D.(2008). Classification des champignons d'intérêt médical. Encycl Méd Chir (Editions scientifiques et Médicales Elsevier SAS, PARIS), Maladies infectieuses, 8-088-B-10,9p.

Christiansen, K. (2012). Morphological adaptations. In *Encyclopedia of caves* (pp. 517-528). Academic Press.

Cianflone.(1996).Lecture coopérative :les grottes.Québec français,(103),49-57.

CLSI. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition, M02-A11, Vol. 32 No. 1.

CLSI. (2014). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement, M100-S24.

Dauda, w., et Zarafi, A. (2019). Exploring the importance of fungi in agricultural biotechnology. *International Journal of Agricultural Sciences and Veterinary Medicin*, 7(1), 6-7.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

Djebbah F.(2016). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de

## Références bibliographiques

---

Tlemcen (Tagma). Mémoire de Master en Microbiologie, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen. 127p.

Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch, and J. Hacker. 2003. Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology*. 185 (6):1831-1840

Dobrindt, U. 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. 295(6-7):357-371.

Drouhet E., DUPONT B. Bull. Soc. Fr. Mycol. Med. 1978, 2, 165-170 – Antibiogramme des champignons aux antifongiques.

Drouhet E., DUPONT B. Encyclopédie médico-chirurgicale (Paris. 1976, 9. La. Infect. 8004 M10: Traitements antifongiques.

Drouhet E. et al., Standardization of the antifungal sensitivity tests. Report of the Study Group of the French Society for Medical Mycology, Bull. Soc. Fr. Mycol. Med., 1981, 10, n°1, 131-134.

Euzéby JP. (2004). Evaluation in vitro de la sensibilité des bactéries aux antibiotiques. Dictionnaire de la Bactériologie vétérinaire, pp. 1-10.

F Kunst, N Ogasawara, I Moszer, a M Albertini, G Alloni, V Azevedo, M G Bertero, P Bessières, a Bolotin, S Borchert, R Borriss, L Boursier, a Brans, M Braun, S C Brignell, S Bron, S Brouillet, C V Bruschi, B Caldwell, V Capuano, N M Carter, S K Choi, J J Codani, I F Connerton, and a Danchin. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*, 390(6657) :249–56, November 1997.

Florent.J.(1993).Microbiologieindustrielle,Lesmicroorganismed'intérêtindustriels.

Freney J., Renaud F., Hansen W. & Bollet C., 2000. *Precis de bacteriologie clinique*. Editions ESKA, France, 1692 p.

Frisvad, Jens- C. Halotolerant and halophilic fungi and their extrolite production.

Ghorri S., 2015: Isolement des microorganismes possédant une activité anti- *Fusarium*. *Thèse de Doctorat, Université frères Mentouri constantine*. Algérie. 154.

Ghosh, N., Kuisiene, N. (2016). Cheeptham, The cave microbiome as a source for drug discovery: reality or pipe dream, *Biochemical Pharmacology*

Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Paris : Dunod. Chapitre, Milieu et réactif. P :522. ISBN : 2 10 003666 1-Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L . Brun S. and Penn P. (2002). Cahier de formation biofarma : les moisissures d'intérêt médical. Labo Analy de biomédicale.

Harwood, C. R., and Kikuchi, Y. (2022). The ins and outs of *Bacillus* proteases: activities, functions and commercial significance. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 1–20.

## Références bibliographiques

---

- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655. (8th ed.) CAB International, Wallingford. 1-616.
- Hawksworth D.L., Rossman A.Y. 1997. Where are all the undescribed fungi? *Phytopathology*. 87: 888-891.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.
- Hay, R. J. (1999). *The management of superficial candidiasis*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(6), S35–S42.
- Horst, R. K. (2013). *Westcott's plant disease handbook*: Springer Science & Business Media.
- Institut de Génie Rural, (1973). *Travaux pratiques Guide de laboratoire*. Suisse, 50 pages.
- Irimes C., Séguin J., Roy S., Barbeau J. (2008). *Investigations on farnesol lower sponsiveness in Candida albicans: Influence of CO2, temperature and expression of selected genes*.
- Isabela, N. R., Jose, F.S., Katia, R.N.S. (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with Different forms of periradicular diseases. *J.Endodon.*, 30, 315 -320.
- Isuru Priyaranga Silva al. (2021), Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Grotte d'Ighzer – Timimoun. mémoire de maser en Microbiologie Fondamentale. Université Aboubekr Belkaid – Tlemcen.85p.
- Jain H., Mulay S., Mullany P. (2016). "Persistence of endodontic infection and *Enterococcus faecalis*: Role of horizontal gene transferl." *Gene reports* 5: 112-116.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2006). *The Genera Klebsiella and Raoultella. The Enterobacteria* (2nd ed., pp. 115-129). Washington, USA: ASM Press.
- Jeffery S ., Gardi C., and Jones A .2013. *Atlas Européen de la biodiversité des sols*. Publications Office p : 90-95.
- Kayaoglu, G., Orstavik, D. (2004) Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit.Rev.Oral. Biol. Med.*, 15, 308 – 320.
- Kendrick B. *The fifth kingdom*. Troisième Eds (2000).
- Kern Benaibout M. 2006. *Escherichia coli* potentiellement pathogènes pour l'Homme: Synthèse bibliographique sur le portage par les animaux domestiques et la transmission à l'Homme par la contamination de l'environnement. Thèse d'exercice, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse 7 ENVT.
- Kholkhal, W (2006). *Recherche de nouvelles souches fongiques productrices D'antibiotiques à partir du sol et des concrétions sédimentaires des grottes de Aïn Fezza*. Mémoire de magister, option activité biologique et synthèse. Université ABOU BAKR BELKAID – Tlemcen, Département de biologie.84p



## Références bibliographiques

---

- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation Préliminaire des substances élaborées. Th doctorat : Microbiologie : Université Mentouri-Constantine.
- Klein D., Eveleigh D.E., 1998. Ecology of Trichoderma In Trichoderma and Glicoladium; Basic biology, taxonomy and genetics, pp.57- 74. Taylor and Francis Ltd, London, UK.
- König. (2016). Étude De L'antagonisme In Vitro De *Penicillium* Isolée Des Grottes Vis-À-Vis Des Champignons Phytopathogenes De La Pomme De Terre. Mémoire de Master en Microbiologie et Contrôle de Qualité, Algérie, Inst. de Biologie - Faculté des Sciences, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen.85p.
- Krief, S. (2003). Métabolites secondaires des plantes et comportement animal : Surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées [PhD Thesis]. Museum national d'histoire naturelle-Mnhn Paris.
- Kunst ,( 1997). Potentiel enzymatique et antimicrobien des bactéries des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*
- Lagha N. E. B.2015. Etude de la résistance aux antibiotiques des entérobactéries productrices de  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) isolées de l'hôpital de Laghouat. Thèse de doctorat d'état, université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, 84p.
- Larpant J.P. and Larpant –Gourguand M. (1996). Mémento Technique de microbiologie, 2 éme edn. Technique et Documentation .Lavoisier. *Les risques à la santé associés à la Présence de moisissure en milieu interieur, (edn)*
- Lecellier,(2013). Etude de l'activité antifongique des bactéries lactiques vis-à-vis des champignons phytopathogènes. Thèse de Doctorat.Spécialité : Sciences Biologiques. universite abdelhamid ibn badis mostaganem.157p.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D., Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49(11): 669–674.
- Marie,(2017). Contribution à l'inventaire et la caractérisation macro et microscopique des différentes espèces de champignons comestibles et médicinales. Mémoire de magister, Spécialité : Biochimie Appliquée. Université Ahmed DRAÏA – Adrar.87p.
- Mateo J.J., Mateo R., Jimenez M. Accumulation of type A trichothecenes in maize, wheat and rice by *Fusarium sporotrichioides* isolates under diverse culture conditions. *International Journal of Food Microbiology* (2002) 72, 115-123.

## Références bibliographiques

---

Meyer V, Y. Basenko E, Benz J, H. Braus G, X. Caddick M, Csukai M, P De Vries R, Endy D, C. Frisvad J, Gunde-Cimerman N, Haarmann T, Hadar Y, Hansen K, I. Johnson R, P. Keller N, Kraševc N, H. Mortensen U, Perez R, F.J Ram A, Record E, Ross P, Shapaval V, Steiniger C, Brink H, Munster J, Yarden O And A.B. Wösten H. (2020). Growing a circular economy with fungal biotechnology: a white paper. *Fungal Biology and Biotechnology*. 7, 5.

Mezni, A. B., Mhiri, N., Beji, M., & Jemaa, A. B. (2010). Pneumopathie d'hypersensibilité aux enzymes protéolytiques du *Bacillus subtilis* dans l'industrie de délavage des Jean. Présentation d'un cas. *Revue Française d'Allergologie*, 50(2), 77-81.

Mohamed-benkada Mustapha. 2006. Evaluation du risque fongique en zones conchylicoles : substances toxiques de souches marines du genre *Trichoderma*. Th. : Pharmacie : Nantes : 9, 10, 11, 12, 13, p.

Morand, A., & Morand, J. J. (2017, November). *Pseudomonas aeruginosa* en dermatologie. In *Annales de Dermatologie et de Venereologie* (Vol. 144, No. 11, pp. 666-675). Elsevier Masson.

Muller, A. (2017). *Bon usage des antibiotiques: résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé* (Doctoral dissertation, Université Bourgogne Franche-Comté).

Nicolas, C. (2016). Epidémiologie des candidoses profondes au Centre Hospitalier Universitaire de Rouen. these pour le diplôme d'état de docteur en pharmacie : ufr de médecine et de pharmacie. à Pessac: universite de rouen, 200 pages.

Northup E. Kathleen H. Lavoie, D. (2001). Geomicrobiology of caves: a review. *Geomicrobiology journal*, 18(3), 199-222.

Obritsch, M.D., Fish, D.N., MacLaren, R., and Jung, R. (2004) National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive Care unit patients from 1993 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4606-4610.

Orial, G., & Mertz, J. D. (2006). Lascaux: une grotte vivante. Étude et suivi des phénomènes microbiologiques. *Monumental*, 2, 76-87.

Pasqualotto, Alessandro - C. Differences in pathogenicity and clinical syndromes due to *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Medical Mycology* : SI-S10. IFirst article, 2008.

Peterson S.W., (2006), Multilocus sequence analysis of *Penicillium* and *Europicillium* Species, *Rev. Iberoam Micol.*, 23(3), 134-8.

Pfaller M.A. et Diekema D.J. (2007). Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 20: 133-163 , DOI:10.1128/CMR.00029-06.

Pichard G. et Rolland B. (Octobre 2006). Les champignons, éléments essentiels dans L'écosystème forestier.

## Références bibliographiques

---

- Pitt,( 1988). Production des protéases extracellulaires des moisissures du sol : effet du pH et de la température. Mémoire de Master. Spécialité : Biotechnologie Fongique / Fermentation et production de substances fongiques. Université des Frères Mentouri Constantine.104p.
- Pitt, J. I., Hocking, A. D., (1999). Fungi and food spoilage, 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Pitt, J.I. (2000) Toxigenic fungi: which are important? Medical Mycology 38: 17-22 Suppl. 1
- Pitt, John, et Ailsa Hocking. 2009. *Fungi and food spoilage*. 3rd éd. New York, USA: Springer Science & Business media.
- Pitt, J.I. and Hocking, A.D. (2022) Fungi and Food Spoilage, Cham: Springer International Publishing.
- Rahmani, N.(2017). Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte *kaws* –Honaine. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen.122p.
- Redecker(2002). Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien Kristel et Stidia. Mémoire de Master. Spécialité: Ressource halieutique et exploitation durable. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.87p.
- Richardson, M. D., & Warnock, D. W. (2012). Fungal infection: diagnosis and management: John Wiley & Sons.
- Ridel S, Jeffery A.M., Mietzner T., et Miller S., (2019). Medical Microbiologie. United states. Mc graw Hill Lange. 821 Pages.
- Rifai M. A., 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycol. Papers, 116: 1-56.
- Ripert, C. (2013). Mycologie médicale. Lavoisier.
- Robert O. (2000). Résistance aux antibiotiques. Fondation pour la recherche médicale.
- Roquebert, M.F. (1998) Moisissures des aliments peu hydrates. *Lavoisier Tec&Doc*, France.
- Samaranayake Y.H., Ye J., Yau J.Y.Y., Cheung B.P.K., Samaranayake L.P. (2005). *In Vitro Method to Study Antifungal Perfusion in Candida Biofilms*. *J. Clin. Microbiol*, 43, 818–825.
- Samson R.A, Hoekstra E.S, Oorschot C.A.N. Compendium of spoil fungi. Volume 1. London : Academic Press, 1980.
- SchabereiterGurtner,C.,SenzJimenez,C.,Pinar,G.,Lubitz,W.,Rolleke,S.(2003). Phylogenetic diversity of bacteria associated with Paleolithic paintings and surrounding rock in two Spanish caves (Llonin and la Garma ).*Microbiology ecology* 47 (2004).pp235-247

## Références bibliographiques

---

Sekhri –Arafa N., Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse Pour l'obtention du Grade de Docteur en Sciences (2011).

Sidhu,(2002). Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers. Evaluation de la toxicité sur des cellules épithéliales respiratoires *in vitro*. Thèse de Doctorat. Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé Ecole doctorale : Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnement et Santé. Université Paris EST.185p.

Sugrue I., Tobin C., Ross R.P., Stanton C. & Hill C., 2019: Foodborne Pathogens and Zoonotic Diseases. *In: Raw Milk*. Elsevier, p259-272.

Tabuc Cristina.2007.flore fongique de differents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de docteur de l'institut national polytechnique de Toulouse et de l'universite de Bucarest.

Tikour S. (2018). Biodiversité Fongique De La Moule *Mytilus Galloprovincialis* (Lamarck, 1819) Elevée Dans Deux Fermes Conchylicoles De l'Ouest Algérien Kristel Et Stidia. Mémoire De Fin D'études, Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

Université Pierre et Marie Curie.(2003).Bactériologie-Niveau DCEM1-2002-2003-Service De Bactériologie-Mise à jour : 24 mars 2003-122 pages (69-70).

Valanarasu, M., Kannan, P., Ezhilvendan, S., Ganesan, G., Ignacimuthu, S., Agastian, P. (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Med Mycol*,20(4): 290–297.

Van Alst, N. E., M. Wellington, et al. (2009). "Nitrite reductase NirS is required for type III Secretion system expression and virulence in the human monocyte Cell line THP-1 by *Pseudomonas aeruginosa*." *Infect Immun* **77**(10): 4446-4454.

Verscheure, M., Lognay, G., & Marlier, M. (2002). Revue bibliographique: les methodes chimiques d'identification et de classification des champignons. *Biotechnologie, agronomie, société et environnement*, 6(3).

Vincenot F, Saleh M, Prévost G. Les facteurs de virulence de *Staphylococcus*

Wang, W., Ma, X., Ma, Y., Mao, L., Wu, F., Ma, X., ... & Feng, H. (2011). Molecular characterization of airborne fungi in caves of the Mogao Grottoes, Dunhuang, China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(5), 726-731.

Warnock.(2012). Recherche d'agents de lutte biologique d'origine microbienne contre des champignons phytopathogènes. THESE DE DOCTORAT. Spécialité : Microbiologie. Université Mohamed Khider de Biskra.133p.

Wellington.(2009). *Pseudomonas aeruginosa* : Facteurs de virulence et évaluation de la résistance aux bêta-lactamines et aux quinolones. These de Doctorat.Spécialité : Microbiologie Appliquée. UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA.233p.

Zain, M.E., Awaad, A.S., Al-Othman, M.R., Alafeefy, A.M., El-Meligy, R.M. (2014).Biological activity of fungal secondary metabolites. *Int. J. Chem. Appl. Biol. Sci.* 1, 14.

## Références bibliographiques

---

Zekri ,A.(2017). Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws –Honaine. Mémoire de Master en Microbiologie, Université Abou Bekr belkaid de Tlemcen.120p.

[www.wisegeek.com](http://www.wisegeek.com)

<https://m.youtube.com/watch?v=OWkAZq3I4MQ>



# *Annexes*

## Composition des milieux de culture

### Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Eau distillée	1000mL
pH	5,6

### Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Agar	17g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

### PDA (Potato Dextrose Agar) :

Pour la préparation, laver et couper en petits morceaux 200 g. de pomme de terre. Les mettre dans 700ml d'eau distillée et porter à ébullition, après filtrer et compléter à 1 litre:

Saccharose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

### CDA (Czapek Dextrose Agar) :

NaNO <sub>3</sub>	3 g
Saccharose	30 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
KCL	0,5 g
FeSO <sub>4</sub>	0,01 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

### MEA (Malt Extract Agar) :

Extrait de malt	20 g
Peptone	1 g
Glucose	20 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

### Bleu de coton

Lactophénol	
bleu de méthylène	0,5 g

### Rose bengal:

Rose bengal	1 g
-------------	-----



Eau distillée 100 ml

**Lactophénol:**

Phénol 20 g

Acide lactique (25%) 20 ml

Glycérol 20 ml

Eau distillée 40 ml

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur les bactéries test

souches	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
1	-	-	-	-	-	-	-
2	7-7	9-12	5-4	0±0	0±0	6-5	0±0
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-

Méthode	Puits						
Souches de référence	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
ATB							
Ampicilline	7 (R)	7 (S)	0 (R)	9 (S)	11 (R)	6 (S)	0 (R)