

DEDICACES

- A mes chères parent
- Sœurs et frères
- Ma famille
- Les personnes que je connais



REMERCIEMENTS

A NOTRE DIEU

ملخص

نظرا لانتامي خطر البكتيريا المقاومة للمضادات الحيوية، ركزنا في دراستنا على البحث عن مواد طبيعية مضادة للبكتيريا من أصل فطريات مغارات عين فزة.

حيث قمنا بأخذ عينات من التربة و التشكيلات الترسيبية لثلاث مغارات هن على التوالي: غار الصخران، غار أولاد أجيدي و غار بني عاد، و ذلك ما بين شهر نوفمبر و مارس. أخضعت هذه العينات لعمليات العزل التفاضلي للفطريات.

العزلات المستبقى عليها هي فطريات البينيسليوم، حيث عددهم 151 عزلة. و التي تم عزلها في معظمها من تربة غار الصخران و نقطة الأخذ (أ₂) الواقعة على بعد 185 م من المدخل الرئيسي لمغارة بني عاد.

بالموازاة مع عزلات البينيسليوم، اكتشفنا وجود عزلة تكتشف لأول مرة في مختبرنا. و التي تم عزلها فقط من عينات نقطة الأخذ أ₂ لغار بني عاد. تم تشخيصها من طرف المتحف الوطني الفرنسي للتاريخ الطبيعي على أنها

من نوع « *Beauveria felina* »

تم فحص فعالية 80 عزلة بينيسيلوم ضد بعض الأنواع من البكتيريا، 38 منها أظهرت فعاليتها ضد البكتيريا المستهدفة. الانتقاء الثانوي لـ 14 منها كشف ظهور فعالية كابحة ضد بكتيريا مستهدفة واحدة على الأقل.

العزلة التابعة لنوع « *Beauveria felina* » أظهرت أيضا فعالية تجاه البكتيريا

Pseudomonas aeruginosa.

زرع هذه العزلة في وسط سائل سمح لنا في نفس الوقت بدراسة الناتج من المضادات الحيوية المتواجدة في بيئة التغذية، الهيفات الهوائية و الهيفات القاعدية.

فيما يخص السائل أثبتت الدراسة على مدى ثلاثة أشهر عدم وجود فعالية تذكر، بالمقابل صارت فعالية الهيفات بعد عمليات الاستخلاص عن طريق مذيبات ذات قطبيات مختلفة جد معتبرة خصوصا تلك الناتجة عن الايتانول مقارنة بتلك الناتجة عن مستخلص البترول.

RESUME

En vue du risque augmenté jour après jour des bactéries résistantes aux antibiotiques, nous nous sommes intéressés dans notre travail à la recherche de nouveaux produits naturels antibactériens d'origine les champignons des grottes de **Aïn Fezza**.

Afin d'atteindre notre objectif, on a procédé à des prélèvements d'échantillons de sol de trois grottes (**Ghar Sokhrane**, **Ghar Ouled Djaâdi** et **Ghar Beni Aâd**), ainsi que des concrétions sédimentaires. Ces prélèvements effectués entre le mois de novembre et mars (2004-2005), ont été suivis par des isolements sélectifs des champignons.

Les isolats retenus sont ceux qui appartiennent au genre «*Penicillium*» et qu'ils sont du nombre de 151 souches. La source principale de ces isolats était les échantillons du sol du prélèvement du mois de décembre du **Ghar Sokhrane** et le point de prélèvement **P₂** (situé à 185 m de l'entrée du **Ghar Beni Aâd**).

Parallèlement des souches de «*Penicillium*», on a révélé la présence d'une souche observée pour la première fois dans notre laboratoire. Cette souche était isolée seulement des échantillons du point de prélèvement **P₂** de **Ghar Beni Aâd** (sol et concrétions sédimentaire). D'après l'identification réalisée par le **Muséum National d'Histoire Naturelle de France**, la souche appartient à l'espèce «*Beauveria felina*».

Le test d'antibiose de 80 souches de «*Penicillium*» a été effectué, seul 38 présentent une activité contre les bactéries-cibles utilisées, le criblage secondaire de 14 entre eux a révélé l'exhibition de 7 souches d'une activité inhibitrice contre aux moins une bactérie-cible. La souche appartenant à l'espèce «*Beauveria felina*» a présenté aussi une activité intéressante contre la bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa*.

La culture en milieu liquide de cette souche, nous a permis d'étudier la production des substances antibactériennes dans le liquide, le mycélium aérien et enfin le mycélium du substrat. Concernant le surnageant, l'activité antibactérienne étudiée durant les trois mois d'incubation n'était pas exprimé, cependant l'activité antibactérienne du mycélium (aérien et substrat) effectuée après l'extraction par des solvants de polarité différentes était très intéressantes dans le cas de l'extraction par l'éthanol par rapport à l'extraction par l'éther de pétrole éthylique.

ABSTRACT

Bacterial resistance to the actual antibiotic is mostly in dangerous progress, why we have interest to research new natural antibacterial product that **Ain Fezza's** grottos fungi contains.

To attempt our objective, samples were taken from the soil of three grottos (**Ghar Sokhrane, Ghar Ouled Djaâdi** and **Ghar Beni Aâd**), and from there stalactite. This sampling was been taken place between November and March, continued by selective isolation of these fungi.

The restrains of this operation were one of the «*Penicillium*» genera, with a number of 151 strains. The principal sources of these restrains were from the **Ghar Sokhrane's** samples which are taken place in December, and **P₂** point situated at 185 m from the entrance of **Ghar Beni Aâd**.

With the «*Penicillium*» strains, we were isolated one never seen in our laboratory, which was from samples of **P₂** point.

Muséum National d'Histoire Naturelle de France was identify this strain as «*Beauveria felina*» species.

Antibacterial activity's test has been effectuated over 80 strains. Only 38 of there have an activity against bacteria. The secondary screening of 14 from them revealed that 7 were an antibacterial activity. Moreover, «*Beauveria felina*»'s strain showed a good antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*.

Submerged culture for this strain permit to investigate the production of antibacterial substances in linger, aerial mycelium and submerged mycelium.

For three months, the study of linger's antibacterial activity did not be express, but after extraction with a different polarity solvents , it was more interesting for aerial mycelium and submerged mycelium by using ethanol compared with petrol ethylic ether .

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Description des stations de prélèvements.

Tableau 2 : Isolement des souches de « *Penicillium* ».

Tableau 3 : Origine de la souche 23 B.

Tableau 4 : Caractéristiques culturaux de la souche 23 B.

Tableau 5 : Criblage primaire des souches de *Penicillium*.

Tableau 6 : Origine des souches du groupe (3).

Tableau 7 : Criblage secondaire des souches de *Penicillium*

Tableau 8 : Identification de la souche 27G₁.

Tableau 9 : Activité antibactérienne des extraits étheriques et éthanoliques du mycélium (aérien et substrat).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Protée (*Proteus anguinus*).

Figure 2 : *Isaria guignardi* sur *Quedius mesomelinus*.

Figure 3 : Situation des stations de prélèvements.

Figure 4 : Les stations de prélèvements.

Figure 5 : Aspect microscopique du *Beauveria felina*.

Figure 6 : *Beauveria felina* sur différent milieu de culture.

Figure 7 : Activité antibactérienne de la souche 29S₂ dans le deuxième criblage.

Figure 8 : Aspect cultural de la souche 27 G₁.

Figure 9 : *Beauveria felina* sur milieu liquide.

Figure 10 : Activité antibactérienne de la souche 23B « *Beauveria felina* » contre la bactérie-cible *Enterobacter cloacea* (5).

Figure 11 : *Isaria felina*.

LISTE DES ABREVIATIONS

USA : United States America.

% : pourcentage.

°C: degré celsius.

m : mètre.

n° : numéro.

Gr : grossissement.

Diam : diamètre.

Km : kilomètre.

v/an : visiteurs par année.

g : gramme.

mn : minute.

ml : millilitre.

a_w : activité de l'eau.

nm : nanomètre.

mm : millimètre.

pH : nombre d'hydrogène.

al : collaborateurs.

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
1- les Champignons :.....	2
1-1- Généralité:.....	2
1-2- Caractéristiques générales :.....	2
1-3 - Classification :.....	3
1-4- Écologie des champignons :.....	4
1-5-les principaux producteurs d'antibiotique :.....	5
2- La grotte:.....	6
2-1- l'homme préhistorique :.....	6
2-2- L'homme musulman :.....	6
2-3- L'homme Algérien :.....	8
2-4- Les historiens :	8
2-5- Un préhistorien :.....	9
2-6-Un spéléologue :	9
2-7- Un biospéléologue :	9
2-8- Un microbiologiste :.....	11
2-9- Un botaniste :	11
2-10- Un mycologue :	12
3-De nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques:.....	14

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES

1- Le site d'étude :.....	15
2- MATERIELS ET METHODES :.....	16
2-1- Isolement et identification :.....	16
2-2- Test d'antibiose :.....	19
2-3- Production des substances antibactériennes :.....	21

CHAPITRE 3 : RESULTATS ET INTERPRETATION

1- Description des stations de prélèvement :	24
2- Isolement et dénombrement :.....	26
3- La souche 23 B :.....	27
3-1- Origine d'isolement :.....	27
3-2- Identification :.....	27
3-3- Identification de l'espèce :.....	32
4- Test d'antibiose :.....	33
4-1- Les souches de <i>Penicillium</i> :.....	33
4-2- <i>Beauveria felina</i> :.....	38
5- Productions des substances antibactériennes:.....	38
5-1- Activité antibactérienne du surnageant :.....	38
5-2- Activité antibactérienne du mycélium (aérien et substrat) :.....	40

CHAPITRE 4 : DISCUSSION :.....43

CONCLUSION :.....59

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....60

Annexe

INTRODUCTION

Les infections bactériennes étaient depuis l'antiquité la cause principale des mortalités (choléra, peste, tuberculose...); mais depuis 1928 le monde a changé, enfin on a une arme contre ces bactéries, un antibiotique sécrété par *Penicillium notatum* nommé la pénicilline.

On croyait, que le problème de ces infections était résolu jusqu'au 1947, dont les premiers cas de la résistance acquise au traitement à la pénicilline d'infections aux staphylocoques furent remarqués. Ces phénomènes de résistance ne firent pas grande impression à l'époque (LOMBARD, 2005).

En 1999, aux USA, le premier cas de résistance totale aux 12 grandes familles d'antibiotiques est remarqué. La situation est particulièrement grave dans les hôpitaux nord-américains, où, selon la Food and Drug Administration, 20% des cas d'infections nosocomiales, sont dus à des bactéries multi-résistantes (LEEB, 2004).

Alors, les scientifiques ne cessent de chercher des armes plus puissantes, utilisant ainsi différentes méthodes; l'isolement des souches fongiques à partir de différents milieux naturels allant des sommets montagneux aux profondeurs des océans. Cependant, l'un des milieux naturels négligés dans ce combat était les grottes.

Ces grottes constituent pour certain, si on dit pas la plupart, l'abri des créatures et des monstres, le cible des chasseurs d'Or, et mêmes pour les biologistes ce milieu était un laboratoire d'étude de l'évolution des espèces et le facteur d'adaptation.

Or, ils ont négligé ce que peut donner ce milieu à l'humanité et plus spécifiquement à la santé humaine. En partant de l'histoire des « أصحاب الكهف », et les phénomènes d'antagonistes qui peuvent être intenses par l'effet des conditions extrêmes de ce milieu, on a une grande chance de trouver les champignons les plus producteurs d'antibiotiques.

Alors, pour isoler ce type de champignon, notre programme de travail a consisté à :

- 1- Choisir le site de prélèvement, les stations, ainsi les points de prélèvement.
- 2- Effectuer des prélèvements à partir du sol et des concrétions sédimentaires.
- 3- Faire des isollements sur différents milieux de culture.
- 4- Réaliser le test d'antibiose des souches fongiques sélectionnées sur une gamme de bactéries-cible par utilisation de différente méthode.
- 5- Identifier les souches fongiques les plus performantes.
- 6- Essai d'étudier la production des substances antibactériennes par la souche fongique la plus puissante.

CHAPITRE I
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1- LES CHAMPIGNONS :

1-1- Généralité:

Les Champignons, encore appelés "Fungi" (contraction du latin "funus", funéraille, et d'ago", produire) ou mycètes (du grec mukês, champignon), sont aujourd'hui érigés en règne autonome, au même titre que les Procaryotes (Archéobactéries, bactéries, Cyanobactéries), les Protistes, les Végétaux et les Animaux. Leur nombre est évalué à ce jour à environ 80.000 espèces (PURVES *et al*, 1994 ; BOIRON, 2005).

1-2- Caractéristiques générales :

D'après Bouchet *et al* (1999) et Boiron (2005) :

- Ils sont eucaryotes ;
- Ils ont une paroi cellulaire chitineuse ;
- Thallophytes : ils ne possèdent ni feuilles, ni tiges, ni racines. Leur appareil végétatif, ou thalle, est constitué de cellules allongées qui peuvent se présenter de deux façons:

- * Cloisonnées et articulées entre elles, et sont alors appelées hyphes (c'est le cas le plus fréquent);

- * Pas de cloison les séparant les unes des autres. On parle alors de structure coenocytique et de siphon.

- Ils peuvent être pluricellulaire ou unicellulaire (levure). Les filaments ou (hyphes) s'associent pour former le mycélium, ces hyphes restent généralement indifférenciés et inorganisés. Seuls quelques groupes fongiques sont capables de produire certaines structures différenciées de leurs filaments végétatifs (vésicules, chlamydospores, boucles, des corémies ou « synnémas », ou des sclérotés).

- Se reproduisent par des spores, selon un mode asexué et/ou sexué.

- Hétérotrophes : la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matières organiques préformées, ce qui conditionne, suivant les circonstances, leur vie saprophytique, parasitaire ou symbiotique.

- Ils exploitent pour cela leur environnement immédiat, absorbant les matières organiques de trois façons différentes:

- * Les champignons saprophytes exploitent la matière organique morte ou en décomposition (feuilles mortes, débris végétaux ou animaux, excréments).

- * Les champignons parasites exploitent la matière organique vivante, qu'il s'agisse de végétaux, d'animaux (y compris les hommes).

* D'autres champignons préfèrent la symbiose, association avec un végétal autotrophe, chacun des deux organismes tirant profit de cette association. La symbiose permet parfois de créer des êtres nouveaux, comme les lichens.

1-3 - Classification :

Les champignons ont fait l'objet de classifications complexes (BARNETT et BARRY, 1972 ; BOTTON *et al*, 1990 ; BOUCHET *et al*, 1999 ; BOIRON, 2005) :

Division 1 : GYMNOZYCOTA (cellule dépourvu de paroi. présence de myxamibes et de plasmodes).

Division 2 : MASTIGOMYCOTA (présence de spore mobile).

Division 3 : AMASTIGOMYCOTA (pas de cellule mobile).

Elle est divisée en quatre Sous embranchement :

a- ZYGOMYCOTINA : Elle est présentée essentiellement par les zygomycètes, elles comprennent environ 200 espèces, rassemblent des champignons saprophytes, ainsi que des champignons parasites d'insectes (Entomophthorales), de Nématodes et d'Amibes (Zoopagales), et de plantes.

Les Zygomycètes : Ils sont caractérisés par

- Un mycélium siphonné ou coenocytique.
- Reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospore.
- Reproduction sexuée par fusion de gamétocyste.

b- ASCOMYCOTINA: Les Ascomycètes comprennent environ 15.000 espèces, auxquelles il faut ajouter un nombre à peu près équivalent d'espèces lichénisantes. Ils sont caractérisés par :

- Un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure) ;
- Reproduction asexuée par des conidies ;
- Reproduction sexuée par formation de spore méiotique (ascospores) dans des asques.

c- BASIDIOMYCOTINA: Il existe environ 20.000 espèces, sont les champignons que l'on peut considérer comme les plus perfectionnés. ils sont caractérisés par :

- Un mycélium cloisonné ou unicellulaire (levure).
- Reproduction asexuée par des conidies.
- Reproduction sexuée par formation de méiospore (basidiospore) dans des basides.

d- DEUTEROMYCOTINA (Deutéromycètes ou champignons imparfaits) :

Encore appelés Adélomycètes, les Deutéromycètes ne constituent pas un groupe naturel, mais d'un ensemble artificiel regroupant environ 15.000 espèces (plus du quart des champignons actuellement connus).

- Thalle en général cloisonné ou unicellulaire.
- Ne présentant jamais, ou très exceptionnellement, de forme de reproduction sexuée.
- La plupart présentent, néanmoins, des affinités d'Ascomycètes.
- Ils se reproduisent uniquement par voie végétative au moyen de spores asexuées (conidie) ou par simple fragmentation du mycélium (arthroconidie).

Les **Deutéromycètes** se divise en trois classes :

- Les **Blastomycètes** : Levures avec ou sans pseudomycélien.
- Les **Hyphomycètes** : Champignons filamenteux, stériles (**Agonomycétales**) ou produisant leurs spores directement sur les hyphes ou sur des conidiophores simple ou agrégés (**Moniliales**).
- Les **Coelomycètes** : Conidies produites dans des pycnides (**Sphaeropsidiales**) ou dans des acervules (**Mélanconiales**).

1-4- Écologie des champignons :

Les champignons ont développé des adaptations très diverses, de telle sorte qu'on les trouve dans pratiquement tous les milieux du monde. Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus*. On les trouve sous tous les climats et sous toutes les latitudes (FLORENT, 1993 ; TACHENON, 1999).

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

Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur intense, manque d'eau), ce sont des spores particulières qui constituent les formes de résistance (pouvant régénérer un mycélium plusieurs dizaines d'années après sa formation). Étant donné leur mode de nutrition, les champignons peuvent, à la différence des autres végétaux, pousser dans une obscurité

complète (grotte). Ils peuvent aussi vivre à des profondeurs de 3200 m dans le sol (LOCQUIN, 1984 ; TACHENON, 1999).

1-5-les principaux producteurs d'antibiotique :

Depuis, la quête de nouveaux antibiotiques se poursuit de plus belle. Quelque 10 000 antibiotiques d'origine naturelle sont connus à ce jour, dont la majorité sont issues de « simples » micro-organismes, tel que les champignons. Tous ne sont pas employés, les effets toxiques de certains d'entre eux empêchent leur utilisation en médecine humaine et vétérinaire. (GAUTHIER, 1993 ; LOMBARD, 2005).

Il s'en suit que très peu d'antibiotique provient des champignons appartenant aux *Basidiomycotina* ; par contre environ (20 %) provient des champignons imparfaits *Deuteromycotina* (*Penicillium*, *Cephalosporium* et *Aspergillus*). (TURNER, 1975 ; DEMAIN, 1981 ; BERDY, 1985 ; BRETON et al 1989 ; BOUCHET et al, 1999).

En revanche, le développement de deux seulement de ces antibiotiques (la pénicilline G et la céphalosporine), notamment par le biais de leurs dérivés d'hémisynthèse, a été tel qu'ils représentent aujourd'hui environ 60 % du marché mondial des antibiotiques (FLORENT, 1993).

**Penicillium* : Ce champignon ubiquiste connu dans l'histoire des antibiotiques par l'espèce *Penicillium notatum* n'est que la forme conidienne imparfaite de champignons du genre *Eurotium* (BOUCHET et al ; 1999).

Sa classification dans le monde des champignons selon Bouchet et al (1999).

Règne	: <i>Mycète</i> ;
Embranchement	: <i>Amastigomycota</i> ;
Sous-embranchement	: <i>Deuteromycotina</i> ;
Classe	: <i>Hyphomycete</i> ;
Ordre	: <i>Moniliales</i> ;
Famille	: <i>Moniliaceae</i> ;
Genre	: <i>Penicillium</i> .

2- LA GROTTTE :

La grotte pour l'homme signifie beaucoup ; qu'il soit un préhistorique, un musulman, un algérien (citoyen simple ou un révolutionnaire), un préhistorien, un historien, un spéléologue, un biospéléologue, un microbiologiste, un botaniste ou un mycologue. Ce qu'elle signifie alors ?

2-1- l'homme préhistorique :

Il y a bien fort longtemps que les grottes existent. Nos ancêtres ont les utilisées comme des abris ; d'abord refuges, se sont transformées en lieux d'inhumation, en centres culturels, et sont devenues le support des premières œuvres d'art de l'humanité. La plus ancienne trace humaine dans un milieu souterrain date de 47 600 ans, dans la grotte de Bruniquel (ANONYME 1, 2001).

2-2- L'homme musulman :

Chez les musulmans, les événements les plus importants qu'a connu l'**Islam** ont été liés à trois grottes (Hira, Thaur et enfin sourate « El kahf »).

a- La grotte de « Hira » : Elle est attachée à trois événements.

- Avant la révélation, elle était le refuge de **Mohammed (SAW)**, où il effectuait ses retraites spirituelles ;

- La révélation des premiers versets du **Qoran** (sourate **Alaq** n° 96 du **Qoran**)

- Le premier mot révélé dans cette grotte, était une invitation de l'humanité à la science, la recherche et la connaissance de notre créateur « **ALLAH** » : « اقرأ »

b-la grotte « Thaur » : Cette grotte témoigne

- La fin de la période **mecquoise** et le début de la période **médinoise** : le départ d'une nouvelle ère de l'**Islam**.

- Le soutien du prophète **Mohammed (SAW)** et son compagnon **Abou Baker** dans la grotte par dieu. **Allah** le Très Haut a dit dans sourate « **El Taouba** » : «

(39) **إِلَّا تَنْصُرُوهُ فَقَدْ نَصَرَهُ اللَّهُ إِذِ أَخْرَجَهُ الَّذِينَ كَفَرُوا ثَانِي اثْنَيْنِ إِذْ هُمَا**

فِي الْغَارِ إِذْ يَقُولُ لِصَاحِبِهِ لَا تَحْزَنْ إِنَّ اللَّهَ مَعَنَا فَأَنْزَلَ اللَّهُ سَكِينَتَهُ عَلَيْهِ وَ أَيْدُهُ

بِجُنُودٍ لَّمْ تَرَوْهَا وَ جَعَلَ كَلِمَةَ الَّذِينَ كَفَرُوا السُّفْلَى وَ كَلِمَةَ اللَّهِ هِيَ الْعُلْيَا وَ اللَّهُ

عَزِيزٌ حَكِيمٌ (40)

c- Sourate « El kahf » : Cette sourate raconte l'histoire des hommes avec leur chien qu'ils sont refugés avec leur foi à l'unique dieu dans une grotte. Allah le Très Haut a dit : «

الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي أَنْزَلَ عَلَى عَبْدِهِ الْكِتَابَ وَ لَمْ يَجْعَلْ لَهُ عِوَجًا (1) قِيَمًا لِيُنذِرَ
بِأَسَا شَدِيدًا مِنْ لَدُنْهُ وَ يُبَشِّرَ الْمُؤْمِنِينَ الَّذِينَ يَعْمَلُونَ الصَّالِحَاتِ أَنْ لَهُمْ أَجْرًا
حَسَنًا (2) مَا كَثَبْنَا فِيهِ أَبَدًا (3) وَ يُنذِرَ الَّذِينَ قَالُوا اتَّخَذَ اللَّهُ وَلَدًا (4) مَا لَهُمْ بِهِ مِنْ
عِلْمٍ وَ لَا لِآبَائِهِمْ كَبِرَتْ كَلِمَةٌ تَخْرُجُ مِنْ أَفْوَاهِهِمْ إِنْ يَقُولُونَ إِلَّا كَذِبًا (5) فَلَعَلَّكَ
بَاخِعٌ نَفْسِكَ عَلَى آثَرِهِمْ إِنْ لَمْ يُؤْمِنُوا بِهَذَا الْحَدِيثِ أَسَفًا (6) إِنَّا جَعَلْنَا مَا عَلَى
الْأَرْضِ زِينَةً لَهَا لِنَبْلُوهُمْ أَيُّهُمْ أَحْسَنُ عَمَلًا (7) وَ إِنَّا لَجَاعِلُونَ مَا عَلَيْهَا صَعِيدًا جُرُزًا
(8) آمَ حَسِبْتَ أَنْ أَصْحَابَ الْكَهْفِ وَ الرِّقِيمِ كَانُوا مِنْ آيَاتِنَا عَجَبًا (9) إِذْ آوَى
الْفِتْيَةَ إِلَى الْكَهْفِ فَقَالُوا رَبَّنَا إِنَّا أَتَيْنَا مِنْ لَدُنْكَ رَحْمَةً وَ هَيَّئْ لَنَا مِنْ أَمْرِنَا رَشَدًا (10)
فَضْرَبْنَا عَلَى آذَانِهِمْ فِي الْكَهْفِ سِنِينَ عَدَدًا (11) ثُمَّ بَعَثْنَاهُمْ لِنَعْلَمَ أَيُّ الْحِزْبَيْنِ
أَحْصَى لِمَا لَبِثُوا أَمَدًا (12) نَحْنُ نَقُصُّ عَلَيْكَ نَبَأَهُمْ بِالْحَقِّ إِنَّهُمْ فِتْيَةٌ آمَنُوا بِرَبِّهِمْ وَ
زِدْنَاهُمْ هُدًى (13) وَ رَبَطْنَا عَلَى قُلُوبِهِمْ إِذْ قَامُوا فَقَالُوا رَبُّنَا رَبُّ السَّمَاوَاتِ وَ
الْأَرْضِ لَنْ نَدْعُوا مِنْ دُونِهَا إِلَهًا لَقَدْ قُلْنَا إِذًا شَطَطًا (14) هَؤُلَاءِ قَوْمُنَا اتَّخَذُوا مِنْ

دُونَهُ ءَ آلِهَةً لَّوَلَا يَأْتُونَ عَلَيْهِم بِسُلْطَانٍ بَيْنِ يَمِينٍ فَمَنْ أَظْلَمُ مِمَّنِ افْتَرَىٰ عَلَىٰ اللَّهِ كَذِبًا (15) وَإِذِ اعْتَزَلْتُمُوهُمْ وَ مَا يَعْبُدُونَ إِلَّا اللَّهَ فَأَوْأَىٰ إِلَىٰ الْكَهْفِ يَنْشُرُ لَكُمْ رَبُّكُمْ مِنْ رَحْمَتِهِ وَيُهَيِّئُ لَكُمْ مِنْ أَمْرِكُمْ مَرْفَقًا (16) وَ تَرَىٰ الشَّمْسَ إِذَا طَلَعَتْ تَزَاوَرُ عَنْ كَهْفِهِمْ ذَاتَ الْيَمِينِ وَإِذَا غَرَبَتْ تَقْرِضُهُمْ ذَاتَ الشَّمَالِ وَ هُمْ فِي فَجْوَةٍ مِنْهُ ذَلِكَ مِنْ آيَاتِ اللَّهِ مَنْ يَهْدِ اللَّهُ فَهُوَ الْمُهْتَدِ وَ مَنْ يُضِلِلْ فَلَنْ تَجِدَ لَهُ وَلِيًّا مُرْشِدًا (17).

Plus tard, les grottes ont représenté pour beaucoup de savants et Imam la Mosquée où il est bon de s'y rendre afin de se retirer de ce monde matérialiste et donner ainsi à leur âme sa nourriture spirituelle.

2-3- L'homme Algérien :

Chez les algériens, elle signifie :

- * Les dessins de l'homme préhistorique du Tassili ;
- * Le refuge des algériens au cours des invasions ;
- * Le refuge des combattants révolutionnaires ;
- * Les enfumades et les emmurements des grottes pendant la colonisation française

de l'Algérie.

2-4- Les historiens :

Elle signifie la rédaction de la célèbre Muqadima d'Ibn Khaldoun, dont elle était réalisée dans une des grottes de l'ouest algérien (la grotte de Sidi Khaled). La Muqadima est le témoin du déclin de la civilisation musulmane et le début de la colonisation de l'Afrique par les espagnols et les européens.

Cette Muqadima qu'elle a fait d'Ibn Khaldoun selon Arnold Toynbee : « *il a conçu et formulé une philosophie de l'Histoire qui est sans doute le plus grand travail qui ait jamais été créé par aucun esprit dans aucun temps et dans aucun pays* »

2-5- Un préhistorien :

Pour l'homme préhistorien l'intérêt de l'étude des sites préhistoriques et paléontologiques des grottes a été montré après la découverte des spécimens d'*Ursus speleus* en 1774, par l'Allemand Esper, dans une grotte de Westphalie

C'est en effet dans les dépôts d'alluvions dans les grottes que la contemporanéité de l'homme et d'espèces disparues est établie par Édouard Lartet, au 19^e siècle, et qu'ont été instaurées la chronologie et la classification des industries du paléolithique (ANONYME 1, 2001).

2-6-Un spéléologue :

Pour le spéléologue, les grottes constituent son terrain d'étude. Pour cela il recouvre de nombreux domaines scientifiques dont la finalité est la connaissance de ce milieu spécifique, le monde souterrain.

La grotte pour eux est un système apparaît quand un courant d'eau chargé de gaz carbonique creuse une roche calcaire fissurée, le plus souvent par des contraintes (tectonique des plaques par exemple). Cette dissolution du calcaire forme les grottes. Le bicarbonate de calcium $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ est un composant en équilibre : quand la température de l'eau ou la pression partielle de l'oxyde de carbone CO_2 diminuent l'équilibre chimique évolue dans le sens de la précipitation « la formation de concrétions » (DUBOIS et GRELLET, 1997).

Pour le géologue, les concrétions sédimentaires renseignent sur les climats et les séismes anciens (DUBOIS et GRELLET, 1997).

2-7- Un biospéléologue :

Pour un biospéléologue ; les grottes, et la vie qui s'est développée dans ce milieu très particulier, ont reçu un intérêt grandissant depuis quelques décennies pour des recherches faunistiques, génétique et physiologique. Cette recherche (la biospéléologie) est un domaine scientifique a connue la lumière grâce à la découverte d'une espèce cavernicole *Thyphlocirolana moraguesi* en 1904 par E.G.Racovitza (GRAUR, 2001).

Les recherches faites avant celles du savant roumain n'attribuaient au milieu souterrain que peu de chances d'existence de la vie. Partant de la découverte du cavernicole dans la grotte de Cueva del Drach, il a cherché avec son collègue R. Jeannel à démontrer, et il l'a réussi d'une façon brillante, que la faune des cavernes est beaucoup plus riche et variée que l'on pensait et que son étude peut aboutir à des résultats intéressantes (GRAUR, 2001).

En 1986, une découverte remarquable a été retenue l'attention : un réseau souterrain étanche de 240m et à 25m de profondeur en Roumanie, partiellement noyé, abritant une faune

d'invertébrés isolés depuis plusieurs millions d'années, comprenant 46 espèces dont 28 nouvelles, vivant dans une atmosphère pauvre en oxygène (POMEROL et RENARD, 1997).

Les animaux cavernicoles sont classés en trois catégories : les trogliphiles, espèces fréquentes dans les grottes ; les troglaxènes, hôtes occasionnelles des cavernes ; les troglobies, espèces permanents des cavernes (JEANNEL, 1937 ; TERCAFS, 1997).

Sur les parois stalagmitées vivent de nombreuses espèces troglobies appartenant surtout aux insectes. Ils présentent des caractères morphologiques en rapport avec leur adaptation à ce milieu. Tous sont aveugles, dépigmentés, de taille plus grande que les espèces similaires du domaine épigé ; leurs formes sont grêles, les membres démesurément allongés (JEANNEL, 1937; TERCAFS, 1997).

Les troglobies aquatiques ; se trouvent dans les systèmes aquifères endogènes ; on ne les rencontre que dans les systèmes hydrographiques d'une certaine importance. Les crustacés sont les plus représentés (des crevettes aveugles) ; les vertébrées dont le protée le cavernicole le plus anciennement décrit (1768) ; des poissons aveugles (JEANNEL, 1937; TERCAFS, 1997) (Fig. 1).

Les guanobies constituent un autre groupe d'animaux cavernicole (insectes, acariens, vers, mollusque...etc.) qu'ils ne présentent aucun caractère d'adaptation au milieu souterrain : tous sont pigmentés, ailés, pourvus d'yeux (JEANNEL, 1937).

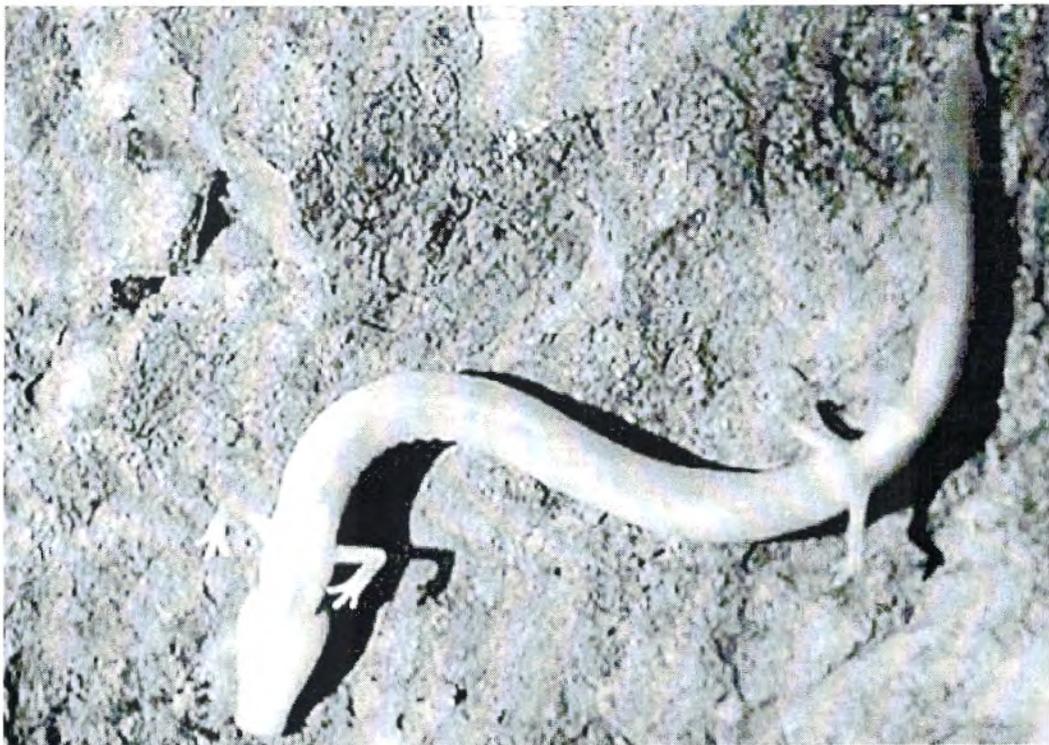


Fig 1 : Protée (*Proteus anguinus*) (ANONYME 2, 2005).

2-8- Un microbiologiste :

Pour un microbiologiste l'étude de la microflore des cavernes a plusieurs voies :

a- Recherche des peuplements permanents des sédiments de grottes et étudier leurs activités métaboliques ; comme il a dit Caumartin (1959) « Un sédiment de grotte est abondamment et originalement peuplé ; il n'est jamais stérile ; les sondages effectués dans des masses sédimentaires importantes ont montré qu'il est illusoire d'espérer atteindre une zone rigoureusement stérile », et il a ajouté « des organismes inférieurs, non photosynthétisants et non hétérotrophes, ferrobactériales et thiobactériales par exemple, peuvent parfaitement tirer d'un milieu minéral carbonaté ou sulfuré bien équilibré, l'énergie nécessaire à leur métabolisme ».

b- Isolement de la flore bactérienne des cavernes (sol, eau et air) et l'étude de l'origine de cette flore. D'après Mason-Williams et Benson-Evans, (1967) « la composition de la flore bactérienne de l'air des cavernes est liée aux facteurs externe comme les excréments animaux, les vêtements et les torrents »

c- L'analyse microbiologique des cavernes afin d'évaluer l'effet des microorganismes sur la détérioration des dessins d'homme préhistorique (ARROYO et *al*, 1997).

2-9- Un botaniste :

Maheu (1906) a constaté, en examinant la flore des cavernes, qu'elle est restreinte. Elle l'est d'autant plus qu'on s'éloigne davantage des conditions normales de la surface

L'ordre de décroissance de la flore à partir de la surface du sol est identique à la classification de la série végétal ce sont d'abord les Phanérogames qui disparaissent, les Cryptogames vasculaires ensuite, puis les Muscinées. Le facteur le plus important qui influence sur cette flore est la lumière (MAHEU, 1906 ; MASON-WILLIAMS et BENSON-EVANS, 1967). Sous ce rapport, elle peut se diviser en quatre zones :

a- Zone des ouvertures et de la surface ;

b- Zone des parois ;

Ces deux zones, mieux éclairées, sont abondamment pourvues de végétaux, notamment de Mousses.

c- Zone du fond des gouffres (obscurité partielle) : Elle montre un certain nombre d'espèces généralement modifiées ;

d- Zone des galeries (obscurité absolue) : Elle n'est habitée que par certaines Algues pauvre en chlorophylle.

2-10- Un mycologue :

Tandis que depuis fort longtemps la faune des cavernes était étudiée ; la flore souterraine était par contre à peu près délaissée (VALVASOR, 1689). C'est la fin du 16^{ième} siècle qu' a connu la première étude sérieuse des champignons cavernicoles ; Scopoli (1760) les décrit et fut frappé par leurs déformations : « elle prend la forme de Lithophytes et des coraux du fond de la mer ».

Depuis cette époque, les recherches se sont multipliées ; la curiosité des mycologues fut mise en éveil par les champignons nombreuses, déformées, d'aspect et de structure bizarres, qui peuplent les parois souterraines des galeries de mines. C'est de cette époque que datent les célèbres travaux de Bulliard (1791), Humboldt (1793) et de Bolton (1795) qui fourmillent déjà d'observations intéressantes (MAHEU, 1906).

Par ailleurs plusieurs chercheurs (De Candolle, Charneaux, Fries, Roumeguère) ont été occupés par l'étude des champignons cavernicoles en les comparant aux espèces de la surface (MAHEU, 1906).

Une étude systématique des espèces souterraines par Maheu (1906) a classé les espèces récoltées dans deux embranchements *Ascomycètes* et *Basidiomycètes* et dont certaines d'entre eux sont classés actuellement parmi les *Deutéromycètes*.

**Ascomycètes* : Ces champignons sont représentés par des espèces peu variées.

- *Isaria guignardi* : Espèce a été trouvée en parasite sur un insecte « *Quedius mesomelinus* » récolté à l'obscurité totale dans les catacombes de Paris, sous la rue de la Tombe-Issoire. (Fig 2).

- *Hypocrea* : Ce genre présente un dimorphisme (ATKINSTON, 1891) dont sa forme conidienne *Trichoderma* est la plus répandue dans les cavités souterraines par rapport à l'autre forme ; une espèce de ce même genre rapprochant à *Hypocrea rufa* a été trouvée dans les mines de Loire et dont sa forme conidienne *Trichoderma viride* se trouve dans la plupart des mines ou cavernes.

**Basidiomycètes* : Ils sont plus nombreux que les *Actinomycètes* et parmi eux ce sont les espèces *porées* qui dominent ; dont *Polyporus sulfureus* est une des plus répandues.

Dans les classifications actuelles, certains genres ont été classés autrement comme le cas du « *Isaria* », dont elle est classée d'après (BARNETT et BARRY, 1972) parmi les *Deutéromycètes*.

Hypocrea/ Trichoderma appartient aux Sous-embranchement des *Ascomycètes*, Ordre des *Hypocreales*, Famille des *Hypocreaceae* (CHAVERRI et SAMUELS, 2004).

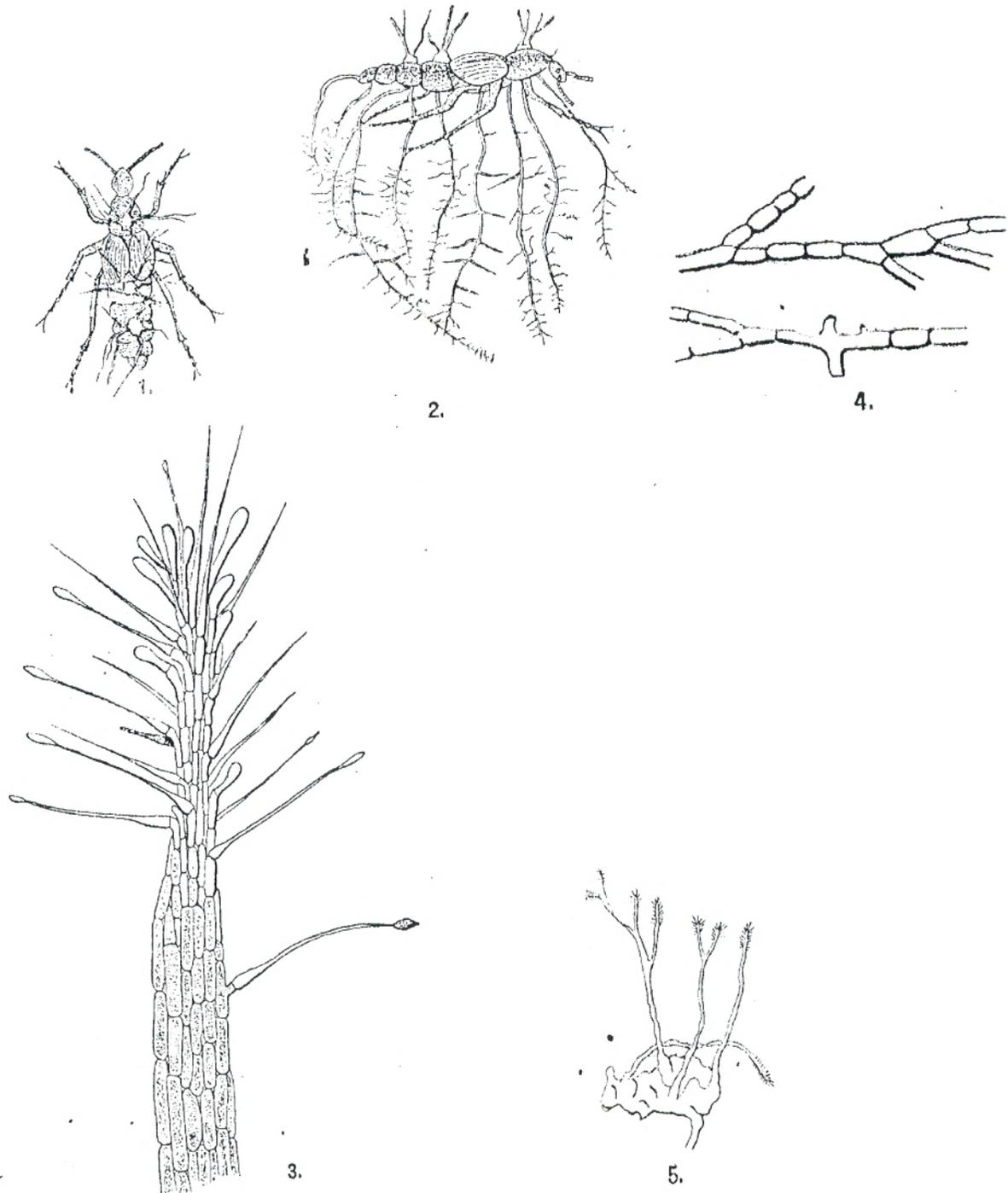


Fig. 2. *Isaria guignardi* sur *Quedius mesomelinus*. 1. Touffes mycéliennes sur la partie dorsale de l'animal. 2. Localisation des filaments fertiles et mycéliens. 3. Eléments coremiés portant les conidiophores. Gr. 800 diam. 4. Constitution des hyphes aux points d'insertion sur la cuticule du Coléoptère. Gr. 800 diam. 5. Une des touffes supérieures. Gr. 20 diam (MAHEU, 1906).

Plus des travaux de Maheu ; d'autre recherches ont été réalisées afin d'étudier les champignons cavernicoles :

Went (1969) a trouvé régulièrement l'espèce *Cephalosporium lamellaecola* dans les extrémités des stalactites. Ses hyphes prennent une part active à la croissance épitaxiale des cristaux de calcite.

L'analyse et l'étude des moisissures responsable de la biodétérioration des dessins préhistoriques des cavernes (CANEVA et SALVADORI, 1988 ; ARROYO et al, 1997).

3- De nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques :

L'obtention de nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques d'après Bouchet et al (1999) nécessite :

- Un grand échantillonnage à partir d'un milieu naturel : l'air, sol, d'eau douce ou salée, provenant des contrées les plus diversifiées, allant des sommets montagneux aux profondeurs des océans.

- Isolement, purification et sélection des souches fongiques.

- Les études de criblage primaire « screening » en utilisant des souches cibles (bactérie ou champignons) ; parfois on passe à un deuxième criblage.

- Isolement, purification et identification des molécules actives par le biais des différentes techniques de la chimie extractive.

MATERIES ET METHODES
CHAPITRE II

1- LE SITE D'ETUDE :

Le village Aïn Fezza, le lieu de nos prélèvements, se situe à 12 Km à l'est du centre ville de Tlemcen, à altitude 860 m par rapport au niveau de mer. Son ancien nom Ifri désigne sa nature montagneux et qui englobe plusieurs grottes et cours d'eau.

Dans notre travail, on a choisi trois stations (grottes) (Fig. 3).

***Station 1 « Ghar Sokhrane » :** Grotte nom explorée, elle était utilisée comme un refuge des combattants de libération pendant la colonisation française dont son ouverture était explosée durant cette période. Actuellement, l'accès à cette grotte est devenu difficile à cause de cet incident.

Cette grotte est liée à l'histoire d'un combattant de libération qu'était jeté dans cette grotte, après qu'il était torturé par l'armée française, après 12 jours de jeûne et de gaz toxique envoyé par l'armée, il était sorti avec un état stable.

***Station 2 « Ghar d'Ouled Djaâdi » :** Elle était exploitée auparavant pour l'utilisation humaine (l'élevage des bétails, stockage des fourrages). Elle a une longueur qui dépasse 20 m et une largeur 5 m et une profondeur géologique 3 m.

***Station 3 « Ghar Beni Aâd » :** La plus grande grotte visitable en monde, elle est caractérisé par une longueur de 700 m, et une profondeur qui dépasse 18 m, situé à 7 Km du sud-est du chef-lieu de la commune de Aïn Fezza.

Cette grotte s'insère dans un relief montagneux chahuté avec un affleurement rocheux très net. De l'intérieur, c'est une importante cavité creusée dans la roche calcaire du massif de Tlemcen et qui s'incruste dans un ensemble de jurassique supérieur (dolomie) donnant ainsi une gamme de formes karstiques.

Elle existe depuis 65000 ans, elle a été découverte par les berbères une ou deux années avant Jésus Christ. Pendant la guerre de libération algérienne, elle a servi comme un refuge des combattants qui accédaient non pas par l'ouverture principale mais par une faille qui fut bombardée par la suite. Durant les années 70, elle était l'attraction principale des touristes où la fréquentation a atteint 4500 v/an en 1971 (ANONYME 3, 2006).



Fig. 3. Situation des stations de prélèvements. 1. Ghar Sokhrane. 2. Ghar d'Ouled Djaâdi.

Grottes. **Ghar Beni Aâd.**

Carte d'état major : Terny

Echelle : 1/50000

Source : Parc National de Tlemcen.

2- MATERIELS ET METHODES :

2-1- Isolement et identification :

2-1-1- Echantillonnage :

On a réalisé au niveau de chaque station, 1 à 3 points de prélèvements « P » au moyen de 10 échantillons par point. Ces prélèvements effectués entre le mois de novembre et mars (2004-2005) ont été pris à partir du sol et des concrétions sédimentaires.

Ceux du sol, ont été effectués par des spatules stériles ; et ceux des concrétions sédimentaires, par frottement à la surface avec des écouvillons stériles.

2-1-2- Examen direct :

Cet examen a été réalisé à l'œil nu au moment du prélèvement, afin de détecter la présence du mycélium au niveau des points de prélèvement, ainsi d'autre caractéristiques (la flore, la faune...etc.).

2-1-3- Isolement et sélection des souches :

a- Milieu de culture :

On a utilisé dans nos isolements, différents milieux de culture :

- * **CDA** (Czapek Dextrose Agar)
- * **ISP₂** (International Streptomyces Project)
- * **MEA** (Malt Extract Agar)
- * **MYEA** (Malt Yeast Extract Agar)
- * **PDA_a** (Potatoes Dextrose Agar acidifié)
- * **PDA_R** (Potatoes Dextrose Agar + Rose Bengal)
- * **SGA** (Soil Glucose Agar)
- * **YSA** (Yeast Starch Agar).

Afin d'inhiber la croissance des bactéries, ainsi ralentir la croissance de certains champignons envahissants on a utilisé des milieux additionnés d' Acide lactique, Rose Bengal, Amphotericine B et Ampicilline.

La préparation de ces milieux a été effectuée en référant à Ramirez (1982), Botton et *al* (1990) et Khelil (1997).

b- La mise en culture :

On a additionné 5 g de chaque échantillon de sol à 45 ml d'eau physiologie homogénéisé ensuite, pendant 30 mn à l'aide d'un agitateur magnétique, puis dilué de 10 en 10 (10^{-2} à 10^{-3}).

Les solutions mères des échantillons des concrétions sédimentaires, ont été préparées par l'imprégnation des écouvillons dans 7 ml d'eau physiologie, agitées ensuite, pendant 30 mn à l'aide d'un Vortex.

On a étalé 1 ml des suspensions sur les milieux d'isolements précédemment coulés en boîtes de Pétri. L'incubation a été effectuée à 25°C pendant 7 à 15 jours.

c- Purification et conservation :

Les souches isolées ont été purifiées par repiquage successif sur le même milieu d'isolement. Les souches pures ont été repiquées sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis, puis conservés à 4°C.

2-1-4- Identification :

a- Identification préliminaire :

Les souches pures ont été caractérisées par, leurs aspects cultureux et morphologiques.

- **Les caractéristiques cultureux :** Ils ont été déterminés par le diamètre des colonies, la couleur, la forme et la sécrétion des pigments diffusible.
- **Les caractéristiques morphologiques :** Ils ont été déterminés par la technique de microculture; qui consiste à cultiver les moisissures sur des lames menées de petits carrés de PDA_a solidifié et les couvrir par des lamelles, ensuite les conditionner dans une chambre stérile et humide et les incuber à 25°C pendant 3 à 5 jours. Après l'incubation, on effectue les observations des lames grâce à un microscope de type Zeiss au grossissement × 10, × 40 et × 100.

b- Identification de l'espèce :

Afin d'identifier l'espèce de certaines souches importantes dans notre travail, on a utilisé deux techniques :

* **Technique1 :** C'est la technique de « Single Spore » décrit par Ramirez (1982).

Cette méthode est basée sur la relation entre l' a_w du milieu de culture et la température d'incubation. Elle consiste à l'inoculation des spores de cultures jeunes dans des tubes à hémolyse contenant une suspension à base de 0,2 % d'Agar et 0,05 ml de Tween 80. La culture, ensuite, se fait sur quatre milieux de cultures différents.

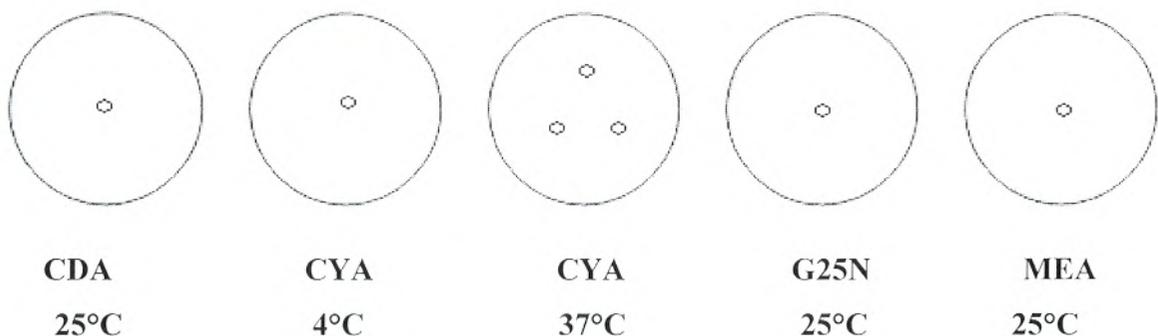
* **CDA** (Czapek Dextrose Agar)

* **CYA** (Czapek Yeast Agar)

* **G25N** (25% Glycérol Nitrate Agar)

* **MEA** (Malt Extract Agar)

Les ensemencements ont été effectués comme indiquée dans le schéma ci dessous :



Après 14 jours d'incubation, les caractéristiques cultureux du souche à identifier sur différents milieux ont été comparées aux guide de Ramirez (1982) afin d'apprécier l'espèce qu'elle appartienne.

* **Technique 2** : Cette technique était utilisée pour certaines souches afin de donner plus d'information sur leurs caractéristiques cultureux suivant la composition du milieu de culture et le temps d'incubation. Pour la réaliser, on a utilisé deux méthodes :

- **Culture en boîte de Pétri** : Elle consiste à l'inoculation des spores de cultures jeunes dans des tubes à hémolyse contenant une suspension à base de 0,2 % d'Agar et 0,05 ml de Tween 80. La culture, ensuite, se fait sur sept milieux de culture :

* **AFPA** (*Aspergillus Flavus / Parasiticus Agar*)

* **ISP₂** (*International Streptomyces Project*)

* **MEA** (*Malt Extract Agar*)

* **MYEA** (*Malt Yeast Extract Agar*)

* **YEA** (*Yeast Extract Agar*)

* **YESA** (*Yeast Extract Starch Agar*): Ce milieu était préparé dans notre laboratoire à base de deux milieux de culture **YEA** et **YSA**. Il n'a aucune référence bibliographique, c'est le résultat de notre travail.

* **YSA** (*Yeast Starch Agar*).

Les ensemencements ont été effectués par un seul point. Après 14 jours d'incubation à 25°C, on a noté les caractéristiques cultureux sur chaque milieu de culture.

- **Culture en récipient** : L'étude des caractéristiques cultureux a été suivie sur le milieu YSA (250 ml du milieu dans un récipient de 2 litre) pendant 30 jours à température fixe 25°C.

- **Identification de l'espèce** : Elle était réalisée à l'aide du « **Muséum National d'Histoire Naturelle. France** ».

2-2- Test d'antibiose :

2-2-1- Microorganisme cible :

Dans notre travail, on a utilisé comme microorganisme cible dix souches bactériennes dont trois provient du laboratoire « **Antibiotiques, Antifongique : Physico-chimie, Synthèse et Activité biologique** » (**Tlemcen**).

- *Escherichia coli* (1') (ATCC 25922)
- *Pseudomonas aeruginosa* (2) (ATCC 27853)
- *Staphylococcus aureus* (3) (ATCC 25923)

Cependant, que les autres souches provient du laboratoire « **Produits Naturels** » (**Tlemcen**).

*** Les souches :**

- *Escherichia coli* (1) 5044172.
- *Citrobacter freundii*
- *Enterobacter cloacea* (5) 1305573.
- *Klebsiella pneumoneae* (6) 5215773.
- *Listeria monocytogenes* (7) (ATCC 19111).
- *Proteus mirabilis* (8) 0536040.
- *Salmonella typhi* (9) 4404540.

2-2-2- Préparation de l'inoculum bactérien :

La préparation d'un lot de « Semences d'essai » des souches bactériennes a été réalisée sur Gélose nutritive en tubes inclinés et conservés à 4°C. Vingt quatre heures avant le test d'antibiose, on a effectué des précultures en Bouillon nutritif à partir des souches bactériennes conservées. Ces précultures ont été incubées à 37°C.

Lors des essais, ces précultures sert à la préparation des suspensions bactériennes dans l'eau physiologie et ajustées, ensuite, à l'aide d'un Spectrophotomètre de type (JEN WAY, 6405 UV/Vis), à 1×10^8 bactéries /ml par mesure de la transmission optique à 640 nm (DE BILLERBECK, 2000).

2-2-3- La réalisation du test :

Le test d'antibiose dépend des résultats d'isolement et d'identification des champignons, qu'ils nous ont posés de faire deux méthodes selon les souches isolées :

- **METHODE 1 :** Utilisée pour le premier groupe de champignons.
 - **Le criblage primaire :** Elle était réalisée par la méthode de culture en milieu liquide inspiré de la méthode décrit par Khelil (1997) et Saadoun et al (1999) et, qui consiste à inoculer des souches fongiques pures dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml du milieu Yeast Glucose Succhrose (YGS) et l'incuber, ensuite, à 25°C. Après 14 jours d'incubation le contenu de chaque flacon, a subi une filtration sur un papier filtre. Le surnagent était récupéré. Afin d'effectuer le test d'antibiose sur une de ces trois bactéries cible *Escherichia coli* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2) et *Staphylococcus aureus* (3), trois disques de papier ont été imprégnés du filtrat et posés en surface du milieu de culture « Gélose nutritif » coulé en boîte de Pétri et ensemencé par la suspension bactérienne par inondation et séchage.

Après 24 heures d'incubation la présence d'une zone claire autour des disques révèle la présence des substances antibactériennes dans le filtrat.

➤ **Le criblage secondaire :** Les souches révélant une activité antibactérienne importante dans le premier criblage, ont subi ce criblage afin de tester leur activité en changeant la méthode et en élargissant la gamme des bactéries-cible (neuf espèces bactériennes). Ce test inspiré de la méthode décrite par Saadoun et *al* (1999), consiste à ensemencer des souches fongiques sur le milieu PDA_a coulé en boîte de Pétri. Après 14 jours d'incubation à 25°C, trois disques d'agar ont été coupés et déposés sur le milieu Mueller Hinton ensemencé préalablement par la suspension bactérienne. Après 24 heures d'incubation à 37°C, la présence d'une zone claire autour des disques révèle la présence des substances antibactériennes dans le disque d'agar.

- **METHODE 2 :** Utilisé pour le deuxième groupe fongique. Cette méthode a été réalisée sous sa forme décrite ci-dessous, après qu'on a remarqué que la formation des hyphes aériens agrégés par ce groupe fongique a arrêté la croissance de certains contaminants fongiques de la culture des souches de ce groupe.

La méthode consiste à inoculer les champignons dans un récipient contenant 100 ml du milieu YSA. Après 20 jours d'incubation à 25°C, les filaments aériens ont été récoltés et homogénéisés dans 50 ml d'eau distillée stérile. Trois disques de papier filtre ont été imprégnés de cette suspension et déposés, ensuite, sur le milieu Mueller Hinton ensemencé préalablement par une suspension bactérienne (*Pseudomonas aeruginosa* (2)). Après incubation à 37°C pendant 24 heures la lecture était effectuée comme la première méthode.

2-3- Production des substances antibactériennes :

Cette partie a été effectuée pour une seule souche fongique sélectionnée en fonction des résultats précédents (isolement, identification et test d'antibiose).

Afin de tester la production des antibiotiques de cette souche, qu'ils soient des antibiotiques exogènes ou endogènes, on a utilisé le milieu de culture YESL_a (Yeast Extract Starch Liquid acidifié) et la méthode suivante :

Tout d'abord, on a désinfecté le récipient du culture qui est de volume 4 l ; on a placé, ensuite, les supports en verre (pipette pasteur) de manière qu'il forme un support du mycélium, puis on a désinfecté l'ensemble (le récipient et les supports) et enfin on a versé 2000 ml du milieu de culture YESL_a.

A ce moment, on a préparé notre inoculum en utilisant la technique de support cellulosique de spores décrit par De Biller Beck (2000).

On a coupé un fil de coton commercialisée en 10 morceaux de 60 cm de long, on les a placés ensuite, dans une boîte en verre et on les a stérilisés à l'autoclave pendant 20 mn.

Après la stérilisation, 30 ml de la suspension fongique ajustée à $(1 \times 10^8 \text{ spore/ml})$ en utilisant la cellule de Thomas a été versée dans la boîte de Pétri, ensuite l'ensemble a subi un séchage pendant deux heure sous hotte à flux laminaire de type (Cytostar 13164).

En dernier lieu, les supports de spores ont été placés dans le récipient de manière qu'ils soient immergés. L'incubation a été effectuée à température ambiante.

Cette méthode était réussite après plusieurs essais, en améliorant à chaque fois la technique par l'analyse des résultats de chaque essai. En plus, elle était réalisée avant l'identification de l'espèce de cette souche par le « **Muséum National d'Histoire Naturelle, France** ».

2-3-1- Activité antibactérienne du liquide :

Elle a été réalisée par la méthode de disque imprégné du liquide décrite dans le criblage primaire, en utilisant comme bactéries cibles (les neuf) bactéries citées précédemment et le milieu de culture Mueller Hinton.

L'étude de l'activité antibactérienne a été suivie pendant trois mois.

2-3-2- Activité antibactérienne du mycélium (aérien et substrat) :

Après trois mois d'incubation, le mycélium total a subi des extractions par les solvants organiques polaire et apolaire (éthanol et éther de pétrole éthylique), afin de tester l'activité antibactérienne du mycélium aérien et celle du substrat.

- **Extraction par l'éthanol :** Cette méthode a été décrite par Ravindra et *al* (2004).
 - **Le mycélium aérien :** On a broyé 0.5g du mycélium aérien dans 50 ml d'éthanol par un broyeur de type (IKA^R WERKE) avec une vitesse 13500 tours / mn pendant 15 mn, la phase liquide a été séparée du culot par filtration. Cette opération a été répétée en additionnant 25 ml du solvant au culot récupéré. Le filtrat a été déshydraté ensuite, par passage sur sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4), puis évaporé sous vide à température 45°C et

avec une vitesse rotatif 150 tour/mn grâce à un évaporateur rotatif de type (Laborota 4000 efficient) . Le résidu ainsi obtenu a été conservé à 4°C.

- *Le mycélium du substrat* : On a broyé 15 g du mycélium dans 150 ml d'éthanol pendant 15 mn par le même type de broyeur et la même vitesse de broyage. après la filtration, l'opération est répétée en additionnant 75 ml ensuite 25ml d'éthanol. Pour les autres étapes le même protocole d'extraction du mycélium aérien.
- **Extraction par l'éther de pétrole éthylique** : Cette méthode a été inspirée de la méthode décrite par Ravindra et al (2004).
 - *Le mycélium aérien* : On a broyé 0.2 g du mycélium aérien dans 25 ml d'eau distillé pendant 15 mn par le même type de broyeur et la même vitesse de broyage, on a ensuite, ajouté 25 ml d'éther de pétrole éthylique afin d'obtenir deux phases de séparation ; la phase aqueuse a subi une deuxième extraction par 20 ml d'éther de pétrole éthylique et la phase étherique a été récupérée. Les phases étheriques récupérées ont été déshydratées par passage sur Na₂ SO₄, ensuite évaporées par le même type d'évaporateur et la même température. Le résidu obtenu est conservé ensuite à 4°C.
 - *Le mycélium du substrat* : On a broyé 20g du mycélium dans 200 ml d'eau distillé pendant 15 mn par le même type de broyeur et avec la même vitesse, ensuite on a ajouté 200 ml d'éther de pétrole éthylique afin d'obtenir deux phase. La phase étherique était récupérée et la phase aqueuse a subi des extractions successifs par l'éther de pétrole éthylique (100 ml, 50 ml et 30 ml). On a ensuite suivie le même démarche d'extraction décrite auparavant.
- **Le test d'antibiose** : On a solubilisé tout d'abord les résidus par 5 ml du même solvant d'extraction ensuite, on a réalisé ce test en utilisant les neufs bactéries-cible et la méthode de disque imprégné. Le control négative (l'éther de pétrole éthylique et l'éthanol).

CHAPITRE III
RESULTATS ET INTERPRETATIONS

1- DESCRIPTION DES STATIONS DE PRELEVEMENT :

Le tableau 1 et la figure 4 illustrent les caractéristiques de chaque station (la faune, la flore, la mycoflore, la profondeur et la surface des points de prélèvement).

Le choix des points de prélèvement de la station 3 était effectué en fonction de l'origine du sol tapissant. On a retenue dans nos prélèvements seulement ceux qui ont un sol tapissant endogène (propre à la grotte).

Tableau 1 : Description des stations de prélèvement.

Station	Point de prélèvement « P _x »	Profondeur	Surface Lar/lon	Faune	Flore	Mycoflore
Station 1	P	10 m	3m/10m	Insectes et chauve-souris	Les algues (l'entrée)	-
Station 2	P	10 m	5m/20m	Porc-épic	-Des arbres (l'entrée). -Détritus végétaux et fourrages (l'intérieur)	-
Station 3	P ₁	76 m	10m/10m	-	-	-
	P ₂	185 m		-		Tapis mycélien foncé en Décembre et atténué en Mars
	P ₃	280 m		-		-
	P ₄	60 m		Pigeons		-

* Les points de prélèvement (P₁, P₂, P₃, P₄) ont été situés en empruntant le chemin aménagé à l'intérieur de la grotte. P₁ à gauche du chemin supérieur. P₂, P₃ et P₄ à droite du chemin inférieur.

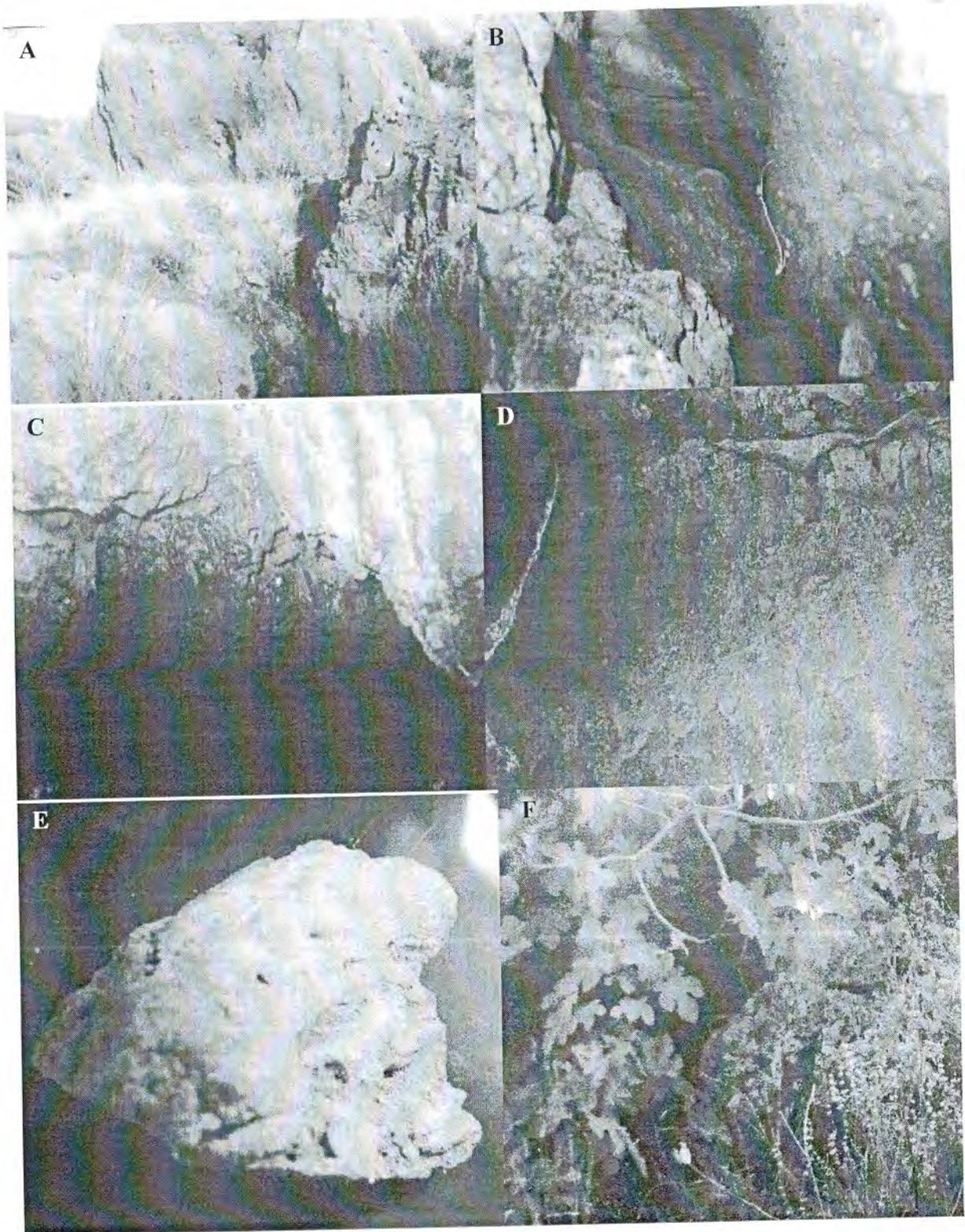


Fig.4. Les stations de prélèvement. A, B et C. Station 1 (Ghar Sokhrane). D. Point de prélèvement P₂ de la station 3 (Ghar Beni Aâd). E. Un échantillon du point de prélèvement P₂ de la station 3. F. Station 2 (entrée).

2- ISOLEMENT ET DENOMBREMENT :

Afin d'atteindre notre objectif (l'isolement des champignons producteurs d'antibiotiques), on a limité notre étude sur le genre *Penicillium*.

Après l'étude des caractéristiques culturaux et morphologiques des souches isolées, 151 souches de *Penicillium* ont été sélectionnées (Tableau 2).

Tableau 2 : Isolement des souches de « *Penicillium* ».

Mois de prélèvement	Station	Point de prélèvement	Type de substrat et dilution	Nombre de souche
Novembre	Station 1	P	Sol (10^{-1})	15
	Station 2			3
Décembre	Station 1	P	Sol (10^{-1})	37
	Station 3	P ₁		4
		P ₂		25
		P ₃		7
Mars	Station 3	P ₂	Sol (10^{-1})	15
			Concrétion	30
		P ₃	Concrétion	12
		P ₄	Sol (10^{-1})	0
			Concrétion	3

D'après le tableau, on a constaté que le nombre de souche de « *Penicillium* » isolé du sol était plus élevé au niveau du station 1 ; 15 isolat en Novembre et 37 isolat en Décembre . Cependant le nombre le plus faible est celui du station 2 (3 isolat).

Concernant la station 3, le nombre de souche de « *Penicillium* » le plus élevé était isolé à partir des échantillons de sol du point de prélèvement P₂ dont on a isolé 25 souches en mois de Décembre et 15 souches en mois de Mars.

Les résultats d'isolement de « *Penicillium* » aux niveau du P₄ ont révélé l'absence total d'isolats.

A propos des souches de « *Penicillium* » isolées des concrétions sédimentaires, on a remarqué que le nombre le plus élevé était à partir des échantillons du point de prélèvement P₂ (30 isolats) suivi par P₃ (12 isolats) et en dernier lieu P₄ (3 isolats).

En résumé, on a constaté que la station 1 et le point de prélèvement P₂ de la station 3 ont été la source principale de nos isolats de « *Penicillium* ».

3- LA SOUCHE 23 B :

Au cours de la sélection des souches de « *Penicillium* », on était attiré par une des souches isolées qu'on l'avait vue pour la première fois dans notre laboratoire, la souche 23 B, alors on a essayé de l'identifier en étudiant les caractéristiques culturaux (**Technique 2**) et morphologiques (**Technique de microculture**).

3-1- Origine d'isolement :

La présence de cette souche dans nos isolements a été répétée dans plusieurs échantillons avec les deux types de substrats (sol et concrétion), pour les deux prélèvements (Décembre et Mars) et en utilisant différents milieux d'isolement.

Les résultats d'isolement de cette souche ont révélés sa présence seulement au niveau du point de prélèvement P₂ de la station 3 (Tableau 3).

Tableau 3 : Origine de la souche 23 B.

Mois	Station	Point de prélèvement	Type de substrat	Milieu d'isolement
Décembre	3	P ₂	Sol	MEA, PDA _a , SGA
Mars			Sol et concrétion	ISP ₂ , MEA, YSA

3-2- Identification :

En étudiant les caractéristiques culturaux, on a remarqué que la coloration et le diamètre du colonie, la couleur des hyphes aériens, leur largeur et leur longueur diffèrent d'un milieu à l'autre (Tableau 4 et Fig. 6).

En plus, on a constaté que cette souche a donné une croissance importante sur milieu YESA par rapport aux autres milieux de culture.

Tableau 4 : Caractéristiques culturaux de la souche 23 B.

Le milieu de culture	Diamètre de la colonie (mm)	Couleur du substrat	Couleur des hyphes aériens	Autre caractéristique
ISP ₂	25	Rose	Rose	Des hyphes aériens agrégés minces et très condensés
YEA	35	Beige	Blanche	Des hyphes aériens agrégés très minces, la longueur 6mm, arrangées en cercle.
MEA	70	Marron	Blanche	Des hyphes aériens agrégés très courts
MYEA	42	Marron	Blanche	Des hyphes aériens agrégés condensé au centre de la colonie
AFPA	22	Marron	Marron	Des hyphes aériens agrégés non observés
YSA	35	Beige	Blanche	Des hyphes aériens agrégés dressés, recouverts la colonie, longueur 7mm
YSEA	40	Beige	Blanche	Colonie recouverte d'hyphes aériens agrégés embranchés, ont une largeur de 1mm, une longueur 10mm

La culture en récipient, nous a permis de suivre les caractéristiques de la souche 23B durant un mois (Fig. 6).

- Après une semaine de l'ensemencement, les hyphes aériens ont une longueur de 8 mm, ensuite ils donnent des embranchements 1 à 3 d'un seul point.
- Après un mois, les hyphes aériens agrégés ont dépassé 55 mm de longueur.
- On a révélé aussi la sécrétion d'exsudat et l'absence d'une odeur caractéristique.

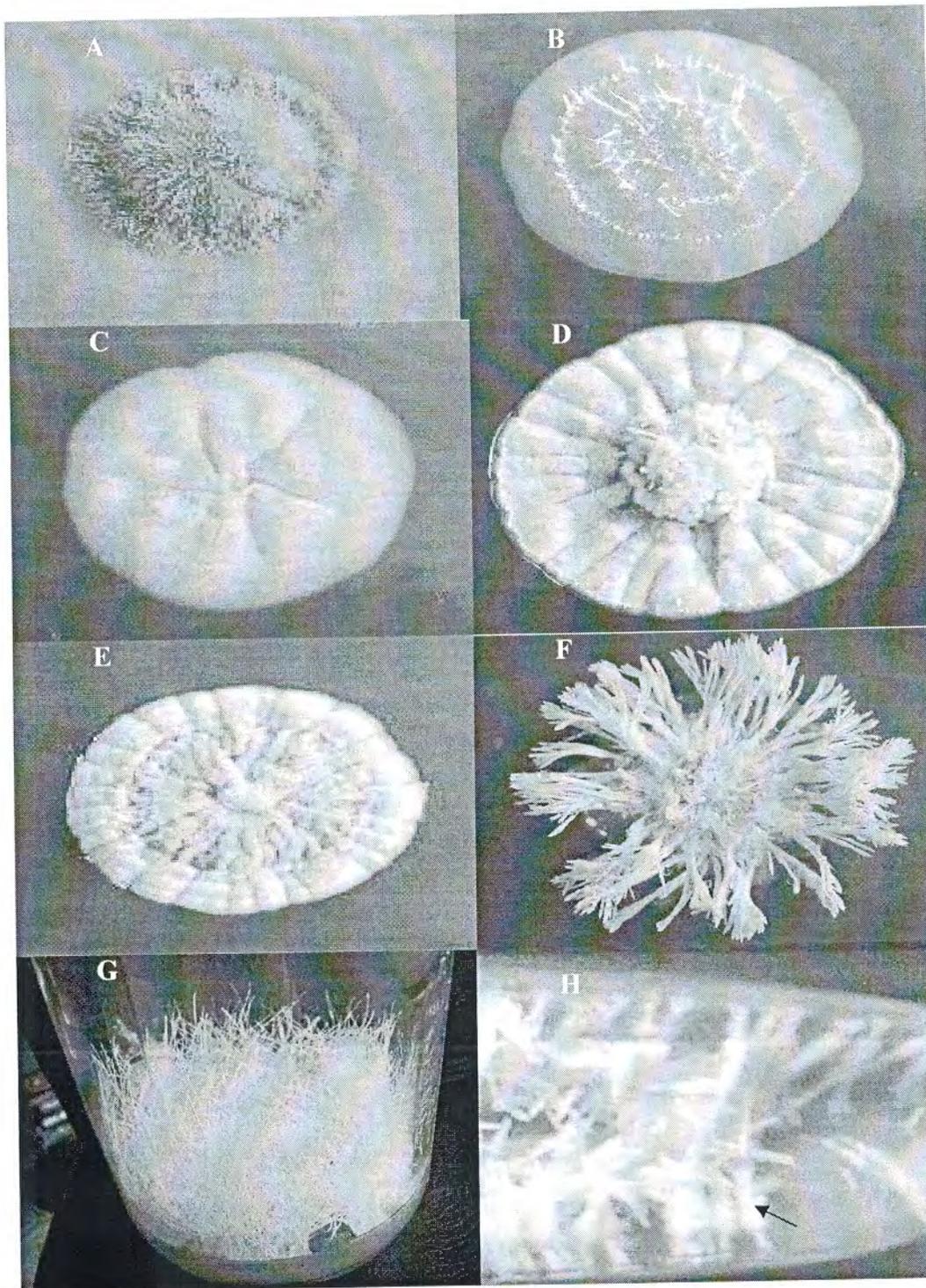


Fig. 6. *Beauveria felina* sur différent milieu de culture, coulé

-En boîte de pétrie : A. ISP₂. B. YEA. C. MEA. D. MYEA. E. AFPA. F. YESA ;

-En récipient : G. YSA ;

-En tube à essai : H. YSA. La présence d'exsudat.

L'observation microscopique des lames (Fig. 5), nous a permis d'observer au grossissement $\times 100$:

- * Des hyphes cloisonnés.
- * Les hyphes aériens s'allongent et se condensent, alors les conidiophores sont érigés en faisceaux.
- * Les cellules conidiogènes (1 à 2 cellules) sont portées par une cellule légèrement enflée.
- * Ces cellules comprennent 2-4 denticules.
- * Les conidies ont la forme d'une morula.

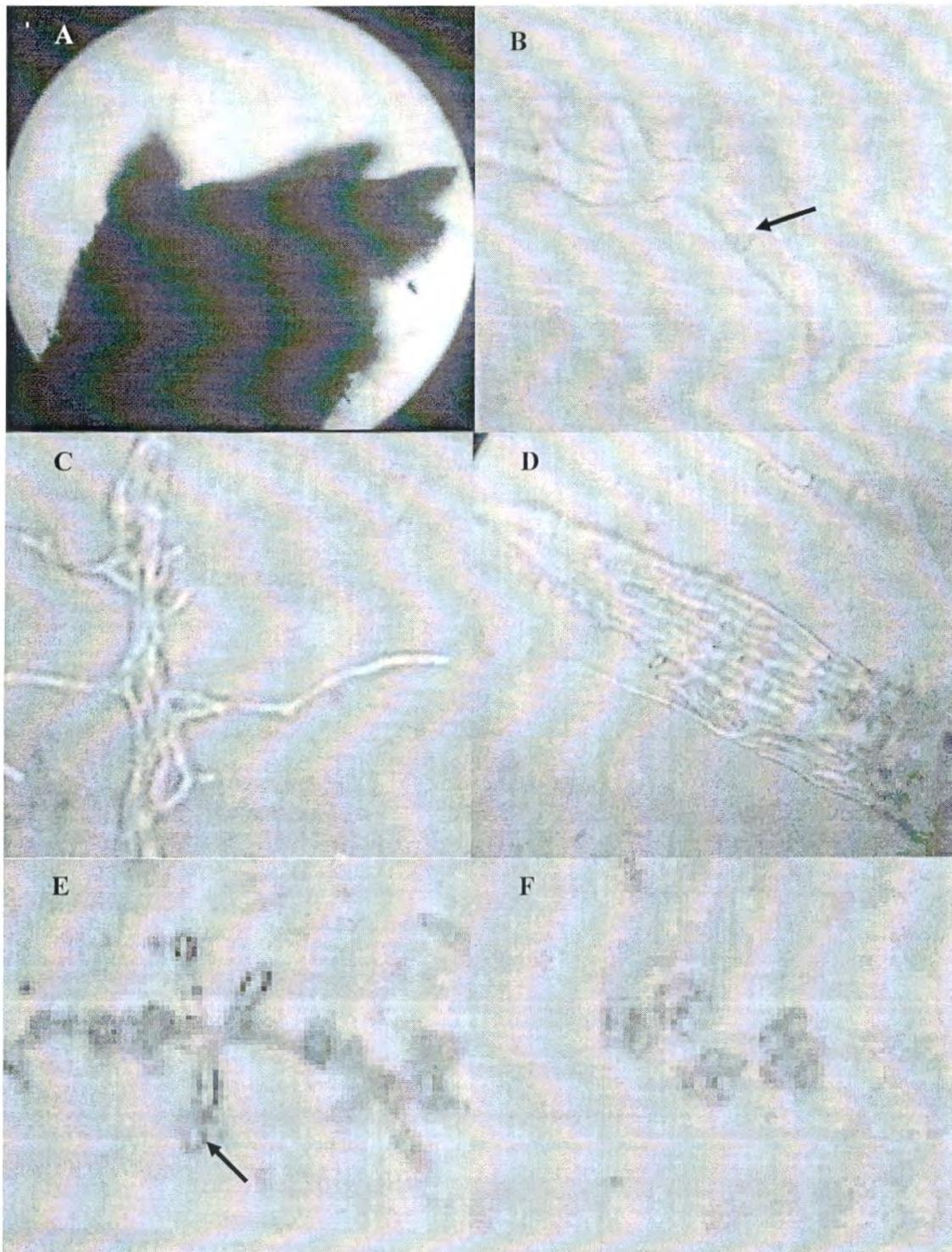


Fig. 5. Aspect microscopique du *Beauveria felina*.

-Au grossissement $\times 10$: A. Les hyphes aériens agrégés en synnemata.

-Au grossissement $\times 100$: B. Un hyphe cloisonné. C. Les hyphes enchevauchés.

D. L'agrégation des hyphes en synnemata. E. Les cellules conidiogènes.

F. Les conidies en morula.

3-3- Identification de l'espèce :

Après cette étude réalisée dans notre laboratoire « **Produits naturels** », on est passé à un autre laboratoire afin d'identifier l'espèce de cette souche « **Muséum National d'Histoire Naturelle. France** ».

L'espèce est alors « *Beauveria felina* » (Decandolle : Fries) J.W Carmichael (autrefois *Isaria felina*). **La Lettre du muséum.**

Cette lettre a été accompagnée d'un article qui décrit les caractéristiques de cette espèce.

Notre recherche bibliographique, a révélé que cette espèce appartient à la famille des « *Stilbaceae* », caractérisée par l'association des conidiophores en un synnemata , ordre des « *Moniliales* », classe des « *Hyphomycetes* », groupe « *Deuteromycotina* », Division 3 des champignons « *Amastigomycota* » (Barnett et Barry, 1972).

4- TEST D'ANTIBIOSE :

4-1- Les souches de *Penicillium* :

Afin de réaliser le test d'antibiose des souches de *Penicillium* on a utilisé la méthode 1.

4-1-1- Criblage primaire :

Parmi 151 souches isolées, on a réalisé le criblage primaire sur seulement 80 souches. Les résultats de ce criblage ont montré que 38 souches présentent une activité contre une des trois bactéries-cible (*Escherichia coli* (1), *Pseudomonas aeruginosa* (2) et *Staphylococcus aureus* (3)). Le tableau 5 représente les résultats du criblage.

Tableau 5 : Criblage primaire des souches de *Penicillium*.

Bactéries -cible	Zone d'inhibition	Nombre de souches
<i>Escherichia coli</i> (1)	Groupe (1)	7
	Groupe (2)	4
	Groupe (3)	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2)	Groupe (1)	6
	Groupe (2)	14
	Groupe (3)	2
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	Groupe (1)	2
	Groupe (2)	3
	Groupe (3)	0

*Les diamètres des zone d'inhibition sont englobés dans des groupes :groupe (1) de 6 mm à 10 mm ; groupe (2) de 10 mm à 14 mm ; le groupe (3) de 14 mm à 16 mm .

D'après le tableau, on a constaté que la plupart des souches de *Penicillium* testées ont exercé une activité inhibitrice entre 11 mm et 14 mm dont 14 souches uniquement dans le cas de la bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa*.

Le nombre des souches du groupe (1) était moins important par rapport au groupe (2). D'après ce même tableau, on a remarqué que certaines souches ont présenté une activité importante « le groupe (3) » dont la zone d'inhibition était entre 14 mm et 16 mm. Pour cette raison, on a essayé de présenter l'origine d'isolement de ces souches (Tableau 6).

Tableau 6 : Origine des souches du groupe (3).

Souche	Station	Point de prélèvement	Le type de substrat	Le mois de prélèvement	La zone d'inhibition et bactérie cible
31S ₂	Station 1	P	Sol	Décembre	15 mm <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
27G ₁	Station 3	P ₂	Sol	Décembre	16mm <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6G ₁	Station 3	P ₂	Sol	Décembre	16mm <i>Escherichia coli</i>

D'après ce tableau, on a remarqué que les souches du groupe (3) proviennent toutes des prélèvements du sol du mois de Décembre, et dont l'origine du prélèvement était différente : la souche 31S₂ provient du station 1 et les deux autres souches 27G₁ et 12 G₁ proviennent du point de prélèvement P₂ de la station 3.

4-1-2- Criblage secondaire :

Nous avons retenu pour ce test 14 souches de *Penicillium* révélant une activité antibactérienne plus ou moins importante par rapport aux autres souches testées dans le premier criblage.

Les résultats du deuxième criblage ont montré que seules 7 souches ont présenté une activité antibactérienne contre aux moins une bactérie-cible.

Les résultats du premier et du deuxième criblage de ces souches sont illustrés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Criblage secondaire des souches de *Penicillium*

Souche	Criblage primaire			Criblage secondaire								
	1	2	3	1'	2	3	4	5	6	7	8	9
18S ₁	8	/	/	-	-	8	-	-	-	-	-	-
29S ₂	/	14	/	-	-	-	-	-	-	8	15	20
14G ₁	/	/	11	-	9	8	-	-	-	-	11	18
27G ₁	/	16	/	-	-	-	-	-	-	-	14	16
32G ₁	/	13	/	-	-	11	-	-	-	-	11	-
34G ₁	/	14	/	9	-	8	7	7	-	-	10	8
40G ₁	/	10	/	-	-	-	-	-	-	-	8	14

* Les bactéries-cibles sont représentées par des numérotations :

1 : *Escherichia coli* ; 2 : *Pseudomonas aeruginosa* ; 3 : *Staphylococcus aureus* ; 1' : *Escherichia coli* ; 4 : *Citrobacter freundii* ; 5 : *Enterobacter cloacea* ; 6 : *Klebsiella pneumoneae* ; 7 : *Listeria monocytogenes* ; 8 : *Proteus mirabilis* ; 9 : *Salmonella typhi*.

* Les chiffres indiquent le diamètre des zones d'inhibition exprimé en mm y compris celui du disque.

* (-) indique l'absence d'une zone d'inhibition notable.

* (/) indique un test non réalisé.

D'après les résultats du deuxième criblage (Tableau 7 et Fig. 7), on a constaté que la plupart des souches testées ont exercé une activité inhibitrice contre les deux bactéries-cible *Salmonella typhi* et *Proteus mirabilis*.

Dans le cas de la bactérie-cible *Salmonella typhi*, l'activité antibactérienne la plus importante était observée chez la souche 29S₂ (20 mm), suivie par 14G₁, 27G₁, 40G₁ et en dernier lieu 34G₁. Les souches 32G₁ et 18S₁ n'ont exhibé aucune activité contre cette bactérie-cible.

La zone d'inhibition provoquée par la souche 29S₂ contre la bactérie-cible *Proteus mirabilis* (15mm) était aussi la plus importante par rapport aux autres souches de *Penicillium* testées dont 27G₁ avec une zone d'inhibition (14mm), suivie par 14G₁(11mm), 32G₁ (11mm), 34G₁(10mm) et en dernier lieu 40G₁(8mm). L'activité antibactérienne du 18S₁ n'était pas exprimée.

Cependant, l'activité antibactérienne contre les autres bactéries-cible *Escherichia coli* (1'), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacea*, *Klebsiella pneumoneae* et *Listeria monocytogenes* était faible (7 mm à 9 mm) ou non exprimée. Seul l'activité antibactérienne de la souche 32G₁ contre *Staphylococcus aureus* a été remarquable (11 mm).

En comparant ces résultats à ceux du premier criblage, on a remarqué que les zones d'inhibition obtenues durant le deuxième criblage étaient nettement inférieures à ceux obtenues en criblage primaire.

A titre d'exemple, les zones d'inhibition des souches de *Penicillium* contre la bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa* en premier criblage étaient entre 10 mm et 16 mm, tandis qu'en deuxième criblage la plupart des zones d'inhibition des mêmes souches ont été non exprimées.

En résumé, le premier et le deuxième criblage nous ont permis à révéler une activité antibactérienne plus ou moins importante chez la plupart des souches dont certaines d'entre elles ont présenté une activité importante autant en premier criblage qu'en deuxième (la souche 27G₁) ; tandis que d'autres ont révélé une activité importante dans le criblage primaire et une activité faible ou négligeable en deuxième criblage.

4-1-3- Identification de la souche 27G₁ :

Du fait de l'importance de l'activité antibactérienne de la souche 27G₁, il nous a paru utile d'identifier l'espèce de cette souche en utilisant **La technique « 1 »**.

Cette technique, nous a permis de rapprocher la souche à l'espèce *Penicillium griseofulvum* en se référant à Ramirez (1982) (Tableau 8 et Fig. 10)

Tableau 8 : Identification de la souche 27G₁.

Milieux de culture et température d'incubation	CDA	CYA		G25N	MEA
	25°C	37°C	4°C	25°C	25°C
Diamètre en mm	40	28	30	25	45

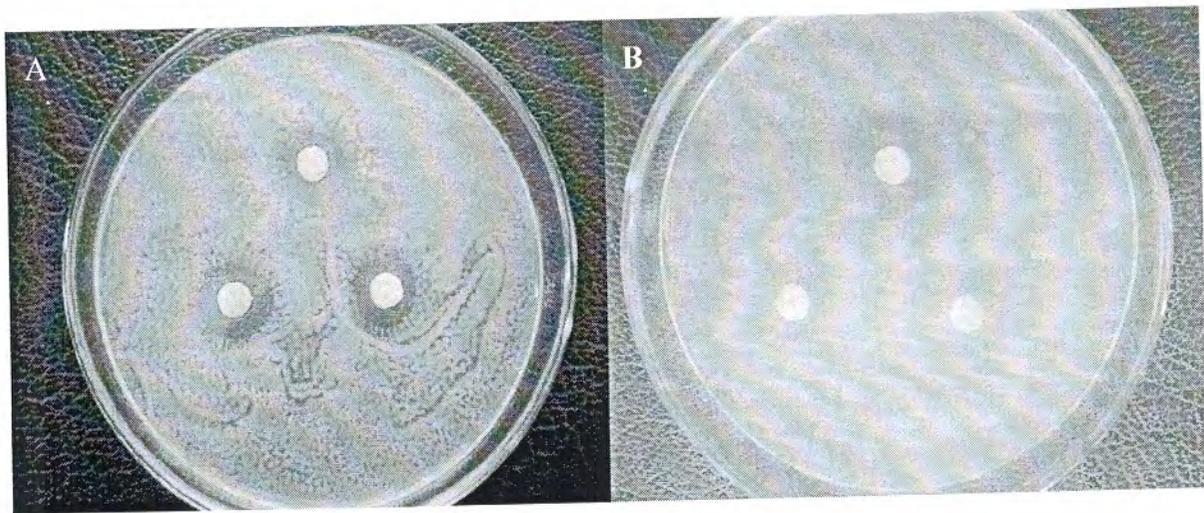


Fig. 7. Activité antibactérienne de la souche 29S₂ dans le deuxième criblage. A. Contre la bactérie-cible *Proteus mirabilis* (8). B. Contre la bactérie-cible *Salmonella typhi* (9).

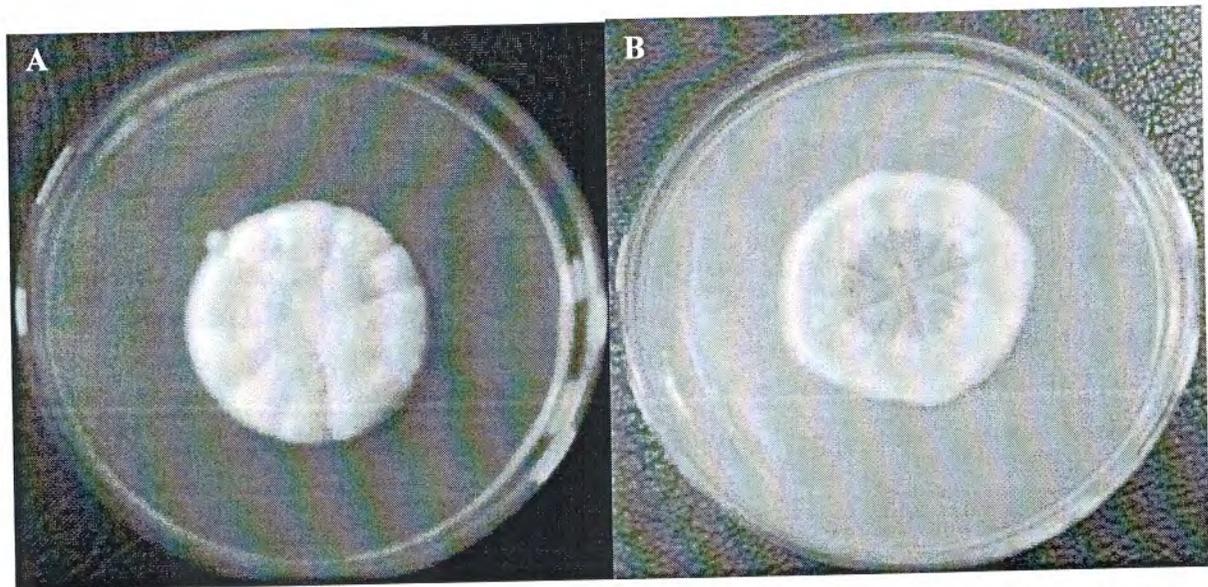


Fig. 8. Aspect cultural de la souche 27 G₁. A. Sur le milieu CYA (4°C). B. Sur le milieu CDA (25°C).

4-2- *Beauveria felina* :

Le test d'antibiose de la souche 23B identifiée précédemment comme l'espèce *Beauveria felina*, a été effectué selon la **méthode 2**.

Après 20 jours d'incubation de cette souche, 330 mg de filaments ont été récoltés et homogénéisés dans 50 ml d'eau distillée stérile. Le test d'antibiose de cette suspension contre la bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa* a révélé une zone d'inhibition d'une valeur de 14mm.

5- PRODUCTION DES SUBSTANCES ANTIBACTERIENNES:

En plus des résultats d'isolement et d'identification intéressants de la souche 23B, nous avons montré dans le test d'antibiose que les filaments aériens agrégés (ou synnemata) de cette souche ont exhibé une activité antibactérienne importante contre la bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa*.

De ce fait, on a essayé dans cette partie d'étudier en même temps l'activité antibactérienne dans le liquide et celle du mycélium avec ses deux formes (aérien agrégé et substrat) en utilisant la culture en milieu liquide (Fig. 9).

5-1- Activité antibactérienne du liquide :

L'étude de l'activité antibactérienne du liquide contre les neuf bactéries- cible au cours de trois mois d'incubation, n'a révélée aucune activité notable.

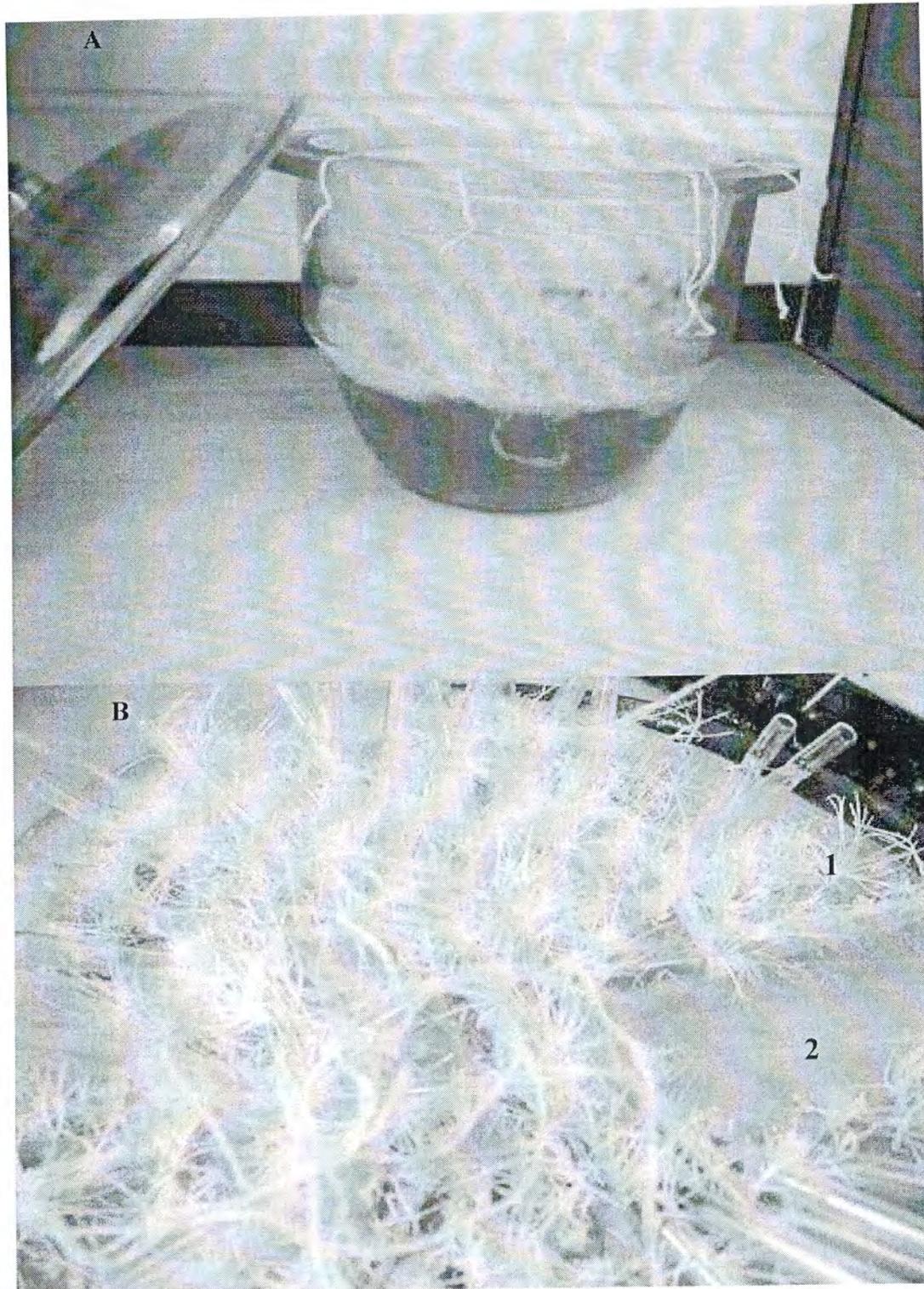


Fig.9. *Beauveria felina* sur milieu liquide. A. Vue général. B.1. Les hyphes aériens agrégés.2. Le mycélium du substrat.

5-2- Activité antibactérienne du mycélium (aérien et substrat) :

Les résultats d'activité antibactérienne du mycélium (aérien et substrat) après les opérations d'extractions sont illustrés dans le tableau 9.

Tableau 9 : L'activité antibactérienne des extraits étherique et éthanolique du mycélium (aérien et substrat).

Solvant d'extraction	Substance test	Bactérie –cible								
		1'	2	3	4	5	6	7	8	9
Ethanol	Mycélium aérien	13	14	15	11	14	12	13	12	12
	Mycélium du substrat	12	-	10	11	12	8	8	13	13
	Contrôle négatif	7	7	10	8	9	7	7	9	8
Ether de pétrole éthylique	Mycélium aérien	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mycélium du substrat	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Contrôle négatif	8	-	9	7	8	9	-	7	7

* Les bactéries-cibles sont représentées par des numérotations :

1' : *Escherichia coli* ; 2 : *Pseudomonas aeruginosa* ; 3 : *Staphylococcus aureus* ;
 4 : *Citrobacter freundii* ; 5 : *Enterobacter cloacea* ; 6 : *Klebsiella pneumoneae* ;
 7 : *Listeria monocytogenes* ; 8 : *Proteus mirabilis* ; 9 : *Salmonella typhi*.

* Les chiffres indiquent le diamètre des zones d'inhibition exprimé en mm y compris celui du disque.

* (-) indique l'absence d'une zone d'inhibition notable.

Le tableau 9 et la figure 10 montrent que l'extrait étherique du mycélium qu'il soit aérien ou du substrat n'a présenté aucune activité antibactérienne contre les bactéries-cible .

Cependant les extraits éthanoliques des filaments aériens et du substrat ont révélé une activité antibactérienne importante contre la majorité des bactéries-cible.

Par ailleurs, l'extrait éthanolique du mycélium aérien (synnemata) a présenté un pouvoir antibactérien plus important par rapport à celui du substrat surtout dans le cas du bactérie-cible *Pseudomonas aeruginosa* dont la zone d'inhibition de l'extrait du mycélium aérien était 14 mm. Cependant celui du mycélium du substrat n'a présenté aucune activité.

En résumé, l'étude de l'activité antibactérienne de la souche 23B appartenant à l'espèce *Beauveria felina* a montré que les extraits éthanoliques du mycélium avec ses deux formes (aérien et substrat) ont exercé une activité antibactérienne contre la majorité des bactéries-cibles.

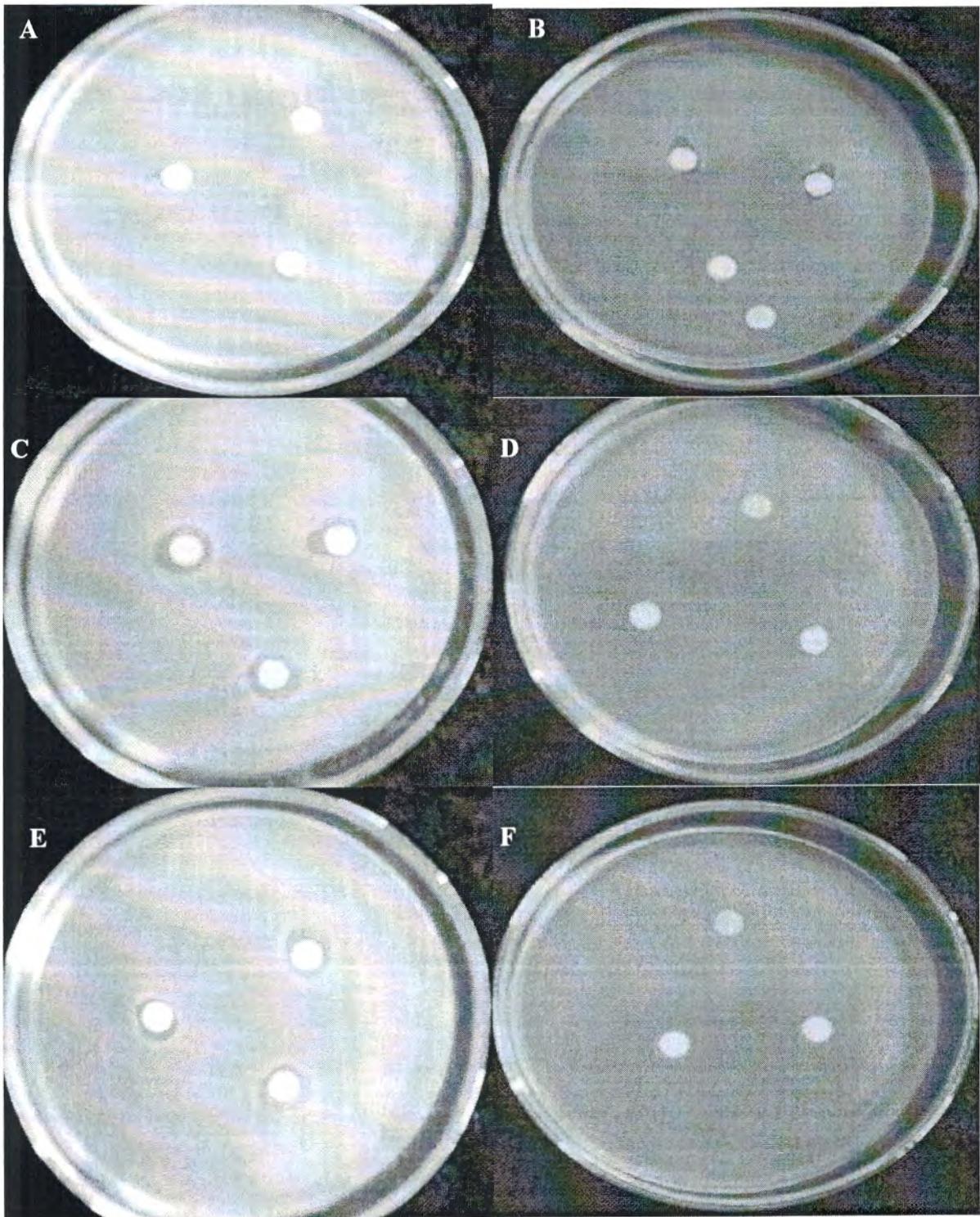


Fig. 10. Activité antibactérienne de la souche 23B « *Beauveria felina* » contre la bactérie-cible *Enterobacter cloacea* (5).

- Le contrôle négatif : A. Ethanol. B. Ether de pétrole éthylique.
- Les filaments aériens agrégés : C. L'extrait éthanolyque. D. L'extrait étherique.
- Les filaments du substrat : E. L'extrait éthanolyque. F. L'extrait étherique.

DISCUSSION GENERALE
CHAPITRE IV

La résistance des bactéries aux antibiotiques, a imposée beaucoup de chercheurs dans le monde entier d'utiliser toutes les méthodes dans l'espoir de minimiser le danger de ces bactéries, dont l'une de ces méthodes était l'isolement de nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques à partir des milieux naturels.

Notre travail, basé sur la recherche de ce type de souche fongique à partir du sol et des concrétions sédimentaires des grottes de Ain Fezza a pu rattacher les isolats ont deux groupes. Le premier était la cible de notre recherche, dès le début, représenté alors par les souches du genre *Penicillium*. Tandis que le deuxième, sa présence dans notre étude était liée beaucoup plus au hasard que d'autre chose, représentée alors par les souches de l'espèce *Beauveria felina*.

A partir des résultats d'isolement et d'identification des souches de *Penicillium*, on a constaté que la plupart des 151 isolats proviennent des échantillons du sol de la station 1 et les échantillons du sol et des concrétions sédimentaires du point de prélèvement P₂ situé à 185 m de l'entrée de la station 3.

D'un autre côté, la station 2 et les points de prélèvements P₁, P₃ et P₄ situés respectivement à 60 m, 280 m et 76 m de l'entrée de la station 3, ont donné une fraction infime d'isolats de *Penicillium*.

Par ailleurs, tout être vivant a besoin de se nourrir, de boire et de respirer. Ces trois exigences ont contribué à la distribution des êtres vivants dans notre planète, y compris les champignons.

La matière nutritive, l'eau et l'air sont aussi sous la dépendance d'autres facteurs qui peuvent agir directement ou indirectement sur la répartition des champignons souterrains. Prenons la matière nutritive.

Dans notre travail, la richesse de certaines stations et points de prélèvement en matière nutritive est peut être attribué à plusieurs facteurs, telle que la lumière. Selon Jeannel (1937) : « Aux entrées des grottes, la lumière du jour pénètre plus ou moins loin ; dans les parties profondes du domaine souterrain l'obscurité est totale, éliminant toute possibilité, pour les plantes à chlorophylles, de croître. ». L'absence de ces plantes, ou généralement les organismes photosynthétiques, dans ce domaine surtout dans les endroits plus profonds influence sur sa richesse en matière organique végétale et animale ; or on sait, que ces organismes sont les principaux producteurs de la matière dans la chaîne alimentaire.

Revenons à nos stations de prélèvement, si on prend la station 1, on trouve que les algues vertes gagnent une surface importante de l'entrée (Fig. 4.B). Ces algues sont une bonne source alimentaire pour l'abondance des champignons du genre « *Penicillium* » dans

les échantillons des dix mètres premiers du sol de cette station. Mais on peut pas attribuer cette abondance seulement à la présence des organismes photosynthétiques. Pourquoi ?

La station 2, est aussi caractérisée par une végétation plus importante à l'entrée (les arbres fruitiers), or la fraction infime de nos isolats de *Penicillium* provient des échantillons du sol de cette station. La question qui peut se poser, est ce que le type de végétation a une influence sur ces résultats (arbres fruitiers ou algues vertes) ?

Cependant, le point de prélèvement « P₂ » a donné une fraction importante d'isolats de « *Penicillium* », bien qu'il soit situé à 185 m de l'entrée de la station 3 (obscurité total) où on a presque aucune chance d'existence d'organismes photosynthétiques.

De ce fait, la présence de la matière organique végétale sous l'influence de la lumière solaire peut jouer un rôle dans l'abondance des champignons du genre « *Penicillium* » dans ces stations, mais peut être ce n'est pas le plus important.

Outre, cette source de matière nutritive, d'autres peuvent intervenir de façon plus importante dans l'abondance du « *Penicillium* ». Prenons les animaux, ils constituent par leurs cadavres et leurs excréments une bonne source de la matière organique. L'eau joue un rôle aussi important qu'on peut l'imaginer ; par ses mouvements superficiels et souterrains, elle entraîne des détritux végétaux et des organismes en petite taille.

Selon Tercafs (1997) : « La biomasse totale existant dans les milieux souterrains est généralement faible. Presque toute l'énergie disponible provient de deux sources extérieures. Un premier apport, très important, est constitué de détritux végétaux et d'organismes de petite taille entraînés par les eaux souterraines (eaux de percolation et eaux libres). Le second apport provient de l'entrée régulière d'organismes actifs (trogloxènes) " non consommateurs " qui viennent peupler l'écosystème. L'exemple le plus frappant est celui des chauves-souris qui vont se nourrir au-dehors, mais dont le guano libéré dans les grottes est le point de départ d'une faune inféodée considérable».

En ce qui concerne nos stations de prélèvement, on a remarqué d'après le tableau 1 qu'il y avait une différence entre les sources d'énergie des stations de prélèvement et même entre ceux des points de prélèvement de la même station.

Si on prend la station 1, on remarque que les sources d'énergies sont peut être assurées en grande partie par les animaux observés aux cours de nos prélèvement (chauve-souris et insectes) plus les eaux pluviales pénétrées à travers l'entrée de cette station.

En rapportant ces observations aux résultats d'isolement des souches de « *Penicillium* », on peut dire que la présence de la matière nutritive représentée par ces deux

types d'apports ont une grande responsabilité sur l'abondance des isolats de « *Penicillium* » dans les échantillons de sol de cette grotte. Mais ils ont pas peut être la grande responsabilité.

Prenons la station 2, cette station caractérisée par la présence d'une source de matière organique végétale importante, elle a aussi révélé la présence d'autres sources d'énergies considérable du point de vue quantitatif. En citant le porc-épic, détritrus végétal, fourrages, activité humaine et les bestiaux, on dit que cette station a un apport énorme en matière organique et à partir de son sol on peut isoler une fraction importante de souche de « *Penicillium* », or c'est le contraire. Pourquoi, alors ?

Au niveau de cette station, on a remarqué que la surface mouillée par l'eau était limitée seulement à proximité de son entrée, alors que l'eau était un apport d'énergie important. Donc les résultats d'isolement de cette station peuvent être dus à l'eau.

Par ailleurs, si on prend la station 3 on remarque le même cas que la station 2, dont on a isolé une fraction très infime de souche de « *Penicillium* » à partir des échantillons du sol du point de prélèvement P₄, bien qu'il abrite un nombre considérable de pigeons, alors que le point de prélèvement P₂ était notre source principale d'isolats de « *Penicillium* » pourtant on n'a remarqué aucune trace d'animaux aux cours de nos prélèvements.

C'est peut être du à l'eau, bien que tous les point de prélèvement de cette station soient alimentés par les eaux d'infiltration. Mais, si on prend la remarque concernant la couleur du tapis mycélien du point de prélèvement P₂ qu'était foncé en période sèche (décembre), et clair avec des hyphes bien visualisés après la période neigeuse (mars), on peut penser que les eaux d'infiltration ont un rôle important dans l'abondance des souches de « *Penicillium* », puisque les eaux d'infiltration ont été plus intense en mois de mars.

Par suite de ces résultats, on pose plusieurs questions, est ce que c'était le type de matière nutritive qui est responsable des résultats d'isolement du « *Penicillium* » et pas la quantité, ou bien c'était l'eau qui a la grande responsabilité ?

D'un autre côté, le type d'apport de la matière nutritive de l'extérieur des trois stations, ainsi l'eau sont peut être lié indirectement à la forme de l'entrée de chaque station. Prenons la station 1, l'ouverture très étroite de cette station, plus la verticalité des deux mètres premiers de la station (Fig. 4.B) a rendu l'accès de l'homme et des vertébrés difficile par rapport à la station 2 dont elle est caractérisé par une entrée très large et une grotte horizontale, contrairement à l'eau dont il peut pénétrer facilement dans le cas de la station 1, par rapport à l'autre station.

La station 3 considérée comme un lieu touristique intéressant, à son entrée il y a une grande porte grillée éliminant toute possibilité des vertébrés d'accès à travers. Les pigeons

observés au niveau du point de prélèvement P₄ (le point de prélèvement le plus proche à l'entrée) ont été entrés par une ouverture en haut de l'entrée. La forme de l'entrée de cette station, ne peut jouer aucun rôle dans l'alimentation de nos points de prélèvement en eau.

A l'égard de la matière nutritive, les champignons des grottes ont besoin de l'eau et d'air comme tout être vivant.

A propos de ces deux éléments Jeannel a dit en 1937 « Il ne semble pas que l'air et l'eau aient une composition spéciale dans le domaine souterrain. L'eau est saturée de calcaire, comme bien des eaux superficielles ».

Dans le monde souterrain, l'eau et l'air ne semblent pas qu'ils ont une composition spéciale mais ils peuvent influencer sur l'abondance des champignons du genre « *Penicillium* », aussi ils peuvent être influencés par d'autres facteurs. Alors, voyons quel rôle ils peuvent jouer dans nos stations de prélèvement.

Prenons l'eau.

En analysant les résultats des observations sur terrain, on remarque qu'il existe une différence entre l'alimentation des trois stations en eau. L'eau alimentant les deux stations 1 et 2 était d'origine pluviale entrée par l'ouverture principale des grottes, dont il est plus remarquable dans le cas de la station 1 que l'autre station vue la forme de son entrée. Cependant, l'eau alimentant la station 3 est comme origine l'eau d'infiltration plus des sources de cours d'eaux présents au niveau des points de prélèvement P₂ et P₃.

Par suite de ces résultats, on peut dire que l'eau est suffisante au niveau de tous les sites d'étude à l'égard de la station 2.

Parallèlement à la matière organique et l'eau, les champignons entant qu'organismes hétérotrophes ont besoin d'oxygène pour vivre. Cependant, l'approvisionnement du milieu souterraine en oxygène et comme tous les autres milieux (terrestre, aquatique,...) est sous la dépendance de l'activité des organismes photosynthétiques dégageant l'oxygène.

Alors, on peut dire que plus l'activité photosynthétique de ces organismes est plus importante, plus le milieu s'enrichit en oxygène. Or, le milieu souterrain est caractérisé par l'absence de la lumière, surtout dans les galeries les plus profondes, alors que c'est un facteur important pour l'assimilation chlorophyllienne ; ce qui a rendu ce milieu, un des milieux les plus pauvres en oxygène. Par contre, ce milieu est caractérisé par un apport énorme de gaz carbonique libéré aux cours des précipitations calciques et le ruissellement des eaux souterraines.

Selon Jeannel (1937) « On connaît un assez grand nombre de grottes à acide carbonique. Ce gaz remplit les bas-fonds et y forme des lacs gazeux où toute vie est

impossible. Lorsqu'il coule en ruisseaux aériens dans les galeries souterraines, il rend l'air irrespirable pour l'homme ».

Si on prend en considération la relation proportionnelle entre l'oxygène et les organismes photosynthétiques, on peut dire que parmi nos stations de prélèvement les plus riches en oxygène étaient la station 1 et la station 2 ; tandis que les plus pauvres sont les points de prélèvements de la station 3. Donc les deux stations 1 et 2 ont été des milieux favorables à l'abondance des champignons du genre *Penicillium*, alors que les résultats d'isolement ont été appropriés dans le cas de la station 1 et non dans le cas de la station 2.

Concernant la station 3, les résultats d'isolement des souches de *Penicillium* ont été remarquables. L'absence des producteurs d'oxygène, plus l'infiltration des eaux aux niveaux de tous les points de prélèvement peut les transformer en milieu très pauvre en oxygène et riche en gaz carbonique, alors que le point de prélèvement P₂ situé à 180 m de l'entrée, où la chance d'existence des organismes chlorophylliens est négligeable, a été la source principale de nos isolats de penicillium.

D'après ces résultats, on peut dire que les organismes photosynthétiques endogènes n'étaient pas le seul facteur limitant d'oxygène dans ces stations, et surtout la station 3. L'oxygène est peut être apporté aux cours des renversements des courants d'air entre la grotte et l'extérieur, dont on peut remarquer que la largeur de la grotte dans le cas de la station 3 peut la transformer en un stock d'oxygène, et surtout à proximité de l'entrée. Cependant, le point de prélèvement P₂ est très éloigné de l'entrée et même de l'autre ouverture.

Le problème ne se pose pas à la distance entre ce point de prélèvement et les deux entrées de la station puisqu'elle n'est pas énorme, l'oxygène est suffisant ; mais c'est la rétention de l'oxygène par le sol, qu'elle peut poser les problèmes ; et surtout, lorsqu'on lie ce que vient à l'influence de l'oxygène et gaz carbonique sur la microflore tellurique et son activité abordé par Dommergues (1969) :

« Le sol est formé de particules élémentaires (sable, limon, argile) assemblées en agrégats et constituant un système poreux (phase solide) dont les espaces libres sont occupés par l'atmosphère du sol (phase gazeuse) ou par de l'eau (phase liquide ou solution du sol). Les proportions relatives des phases gazeuses et liquides varient en fonction de l'humidité, il est difficile de dissocier l'étude de l'aération du sol de celle de l'humidité : en effet, lorsque le sol est gorgé d'eau, la phase gazeuse est inexistante et les échanges avec l'atmosphère libre sont très faibles. ».

D'après ce paragraphe, on peut dire que la teneur très élevée en eau du sol du point de prélèvement P₂ (Fig. 4.D et E) peut réduire sa teneur en gaz!!!

Mais, peut être c'est vrai si les gaz du sol n'existent que dans la phase gazeuse ; or, ils n'existent pas seulement dans la phase gazeuse mais aussi dans les autres phases, phase liquide ou ils sont dissous et à l'état adsorbé sur les particules constituant la phase solide, dont les gaz dissous joue un rôle biologique important dans la solution du sol, car la plupart des microorganismes telluriques ne sont pas en contact direct avec l'atmosphère du sol mais sont recouverts d'un film d'eau plus ou moins épais dans lequel diffusent les gaz de l'atmosphère (DOMMERGUES, 1969).

Donc, on peut penser que c'est à l'oxygène dissout qu'on peut rattacher l'abondance des souches de *Penicillium* dans ce point, alors que les solutions du sol sont caractérisées par une concentration en oxygène beaucoup plus faible et une concentration en gaz carbonique beaucoup plus élevée que l'atmosphère du sol avec lesquelles elles sont en contact (DOMMERGUES, 1969).

Après qu'on a discuté l'approvisionnement en oxygène de ce point de prélèvement, on y trouvé toujours devant l'impossibilité de ce point d'être un milieu convenable et même très convenable à l'abondance des champignons du genre *Penicillium*. La preuve le tapis mycélienne (Fig. 4.D et E).

Sans oublier les résultats d'isolement des souches de *Penicillium* à partir des concrétions en mois de mars, on peut attribuer ces résultats dans la majeure partie aux eaux d'infiltration, qu'elle peut apporter la matière nutritive, l'eau et l'oxygène. Et, dont Maheu (1906) a dit à propos des champignons (supérieur) trouvés sur les concrétions :

« La présence du substratum et surtout sa nature ne doit pas être sans influence sur le développement de ces champignons. Dans un grand nombre de grottes, les concrétions calcaires qui recouvrent entièrement le sol s'opposent aux efforts des mycéliums pour trouver leur nourriture. En effet, ce n'est qu'exceptionnellement que des formes naines croissent sur des stalactites qui semblent ne présenter aucune particule alimentaire ; mais dès qu'apparaissent les matières organiques : boues liquides, humus, détritiques de feuilles, les champignons plus ou moins bien développés se multiplient rapidement ».

D'un autre côté, les résultats d'isolement des souches de *Penicillium* peut être attribué à notre travail expérimental dont les conditions de travail (milieux de culture, température d'incubation, pH...ect) ont permis peut être à la croissance de certaines en faveur d'autres.

Enfin, on doit faire la remarque sur l'interprétation et la discussion des résultats d'isollements des souches de *Penicillium*, c'est vrais les résultats apportées dans notre travail étaient ceux des souches sélectionnées et pas isolées ; mais si on prend les résultats, à titre exemple, de la station 1 et du point de prélèvement P₂ de la station 3 le nombre réel des

souches isolées étaient beaucoup plus important que celui des souches sélectionné ; cependant que le nombre réel des souches des autres stations et les points de prélèvements était le même que celui des souches sélectionné. C'est pour cette raison qu'on a dit que la station 1 et le point de prélèvement P₂ de la station 3 ont été caractérisé par l'abondance de nos champignons cible.

Parallèlement à l'isolement des souches de *Penicillium*, on a révélé la nouveauté dans notre laboratoire d'une souche présent uniquement dans les échantillons du point de prélèvement P₂ de la station 3. L'étude de ces caractéristiques morphologiques et culturales, suivie par une identification proprement dite par le **Musium National d'Histoire Naturelle de France**, a montré que la souche appartient à l'espèce *Beauveria felina*.

D'après l'article qui a accompagné la lettre du **Musium National d'Histoire Naturelle de France**, les caractéristiques morphologiques et culturaux de la souche 23 B ont présenté une grande similitude avec celle décrit par De Hoog (1972) en article ci-dessous.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr.

Clavaria (?) *felina* DC. - Fl. fr. 6:30. 1815; per Fr. - Syst. mycol. 1: 496. 1821 = *Fibrillaria felina* (DC. per Fr.) Pers. - Mycol. eur. 1:53. 1822 = *Isaria felina* (DC. per [p. 16] Fr.) Fr. - Syst. mycol. 3: 271. 1832 = *Penicillium felinum* (DC. per Fr.) Biourge - Cellule 33: 102. 1923.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr. var. *suina* Sacc. - Michelia 2: 561. 1882.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr. var. *aviaria* Sacc. - Michelia 2: 561. 1882.

Isaria edwalliana P. Henn. - Hedwigia 43: 209. 1904.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr. var. *domestica* Speg. - An. Mus. nac. Hist. nat. B. Aires 23: 121. 1912.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr. var. *cuniculina* Ferr. - Fl. ital. crypt., Fasc. 6, Hyphales p. 152. 1910.

Isaria felina (DC. per Fr.) Fr. var. *pirina* El. Marchai & Et. Marchai - Bull. Soc. R. bot. Belg. S4: 134. 1921.

Isaria fimicola Sternon - Bull. Soc. R. bot. Belg. 55: 145. 1923.

Isaria cretacea van Beyma - Zentbl. Bakt. ParasitKde, Abt. 2, 91: 350. 1935 = *Beauveria cretacea* (van Beyma) Matsushima - Microf. Solomon Isl., Papua-New Guinea p. 7. 1971.

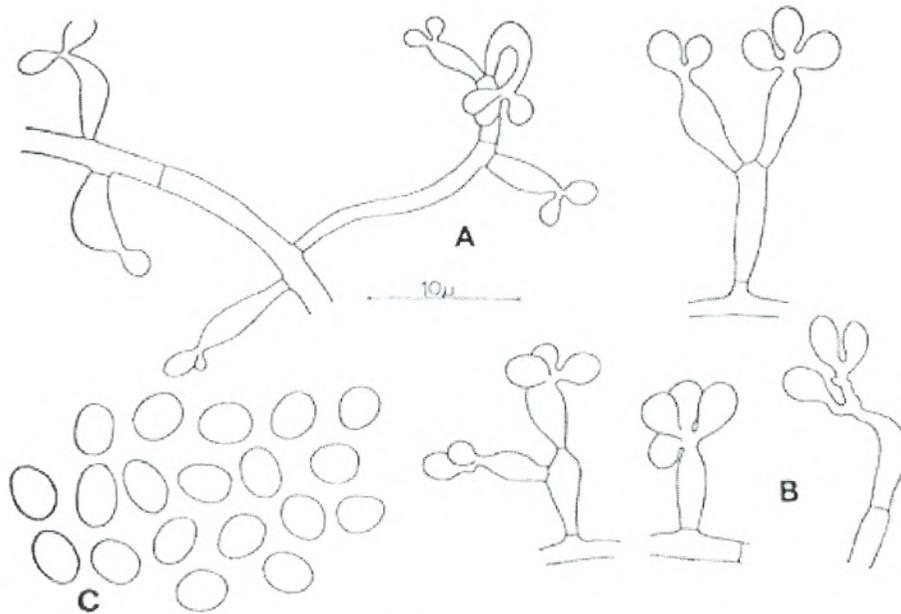


Fig. 11. *Isaria felina*. a. conidial structures; b. conidiogenous cells; c. conidia.

Colonies in vitro attaining a diameter of 8-14 mm in 8 days, forming in fresh isolates a dense felt, from which several white, positively phototropic synnemata arise (Taber & Vining, 1963), up to 70 mm high and constantly 1 mm wide, terete, tomentose, usually unbranched, or occasionally branched at the apex, in old strains appearing lanose to floccose; at first white, later becoming yellowish. Reverse uncoloured or yellowish to yellow brown. Exudate rarely produced, odour absent. Submerged *hyphae* hyaline, smooth-walled, 1-3 μm wide. Hyphae of the aerial mycelium hyaline, smooth-walled, 1-4.5 μm wide, creeping, ascendent or fasciculate, bearing orthotropic conidiogenous cells, solitarily or in small groups; sometimes 1-2 conidiogenous cells are supported by a slightly swollen stalk [p. 17] cell. *Conidiogenous cells* not elongating, consisting of a swollen, flask shaped or curved, occasionally elongate basal part, mostly 3-8.5 x 2-2.5 μm , and a short, irregular conidiiferous portion, mostly comprising 2-4 denticles; in age a short geniculate rachis may be formed. *Conidia* hyaline, smooth, subglobose, ellipsoidal or ovoidal, sometimes with a pointed base, (2.5-) 3-4 (-4.5) x (2-) 2.5-3 (-3.5) μm . No chlamydospores were observed.

Mycelium on natural substrate forming a thin layer of hyaline hyphae, from which several white, erect synnemata arise, up to 80 mm high and constantly 0.5-1 mm wide, usually unbranched. Perfect state unknown.

Material examined

Herbarium specimens

Isaria felina in herb. Fries (UPS), probably collected by F. Chevallier.

Fibrillaria felina in herb. Persoon (L), Nos. 910.262.101 and 910.262.106, leg. F. Chevallier.

Isaria felina in herb. PC under No. 1534; ex herbarium Durieux de Maisonneuve, leg. L. Motelay, 1879.

Isaria fimicola in herb. BPI (type), cultures on carrot.

Isaria fimicola in herb. Shear (BPI), leg. P. Marchal, Gembloux, Belgium, 1924.

Isaria felina var. *suina* Sacc. in herb. Bresadola (BPI), type, on dung, Torino, Italy.

Isaria felina in herb. Bommer & Rousseau (B), on rabbit dung, 1882.

Isaria edwalliana in herb. S, on carnivore dung, Sao Paulo, Brazil, 1903.

Isaria felina ex herb. Sydow (S), on rat dung, Leipzig, Germany, leg. B. Auerswald.

Living strains

CBS 110.08 sent in 1908 by A. F. Blakeslee.

CBS 250.34, type culture of *Isaria cretacea*, Epsom, Great Britain, sent in 1934 by D. Hutchinson.

CBS 235.36 isolated by H. A. Diddens from pupa of *Anaitis efformata*, Soest, sent in 1936 by R. Tolman.

CBS 236.36 isolated from rabbit dung, Erlangen, Germany, sent in 1936 by H. Greis.

CBS 217.37 isolated from mouldy leaves, sent in 1936 by D. Hellinga.

CBS 312.50 isolated from rabbit dung, sent in 1950 by K. B. Boedijn under No. BR 17/50.

CBS 313.50 isolated as culture contaminant, sent in 1950 by Lab. Microbiology, Delft.

CBS 229.58 sent in 1958 by O. Verona.

CBS 648.66 sent in 1966 by F. J. Herrero, Buenos Aires, Argentina.

CBS 173.71 isolated from porcupine dung, Ontario, Canada, sent in 1969 by D. Malloch under No. TRTC 45685.

En analysant les informations apportées par l'article, on a trouvé quelques différences. Prenons l'embranchement des synnemata ; le lectotype décrit en article est fréquemment non branché (**usually unbranched**). Ce n'est pas le cas pour notre souche (Fig. 7).

En plus, si on prend le paragraphe "**Mycelium on natural substrate forming a thin layer of hyaline hyphae, from which several white, erect synnemata arise, up to 80 mm high and constantly 0.5-1 mm wide, usually unbranched. Perfect state unknown.**" de l'article ci-dessus, on remarque que la souche décrite dans cette article a formé sur son milieu naturel des synnemata de grande taille (80 mm en longueur et 0.5 à 1 mm en largeur).

Dans le cas de la souche 23B, on ne peut pas trouver ses caractéristiques sur son milieu naturel (le point de prélèvement P₂ de la station 3). On a observé, seulement, un tapis mycélien dont on ne peut pas distinguer ses composants (Fig.4.D) ; sa couleur et sa forme ne peuvent nous donner aucun renseignement des champignons qui tapissent ce point de prélèvement. Est-ce que c'est *Penicillium* ou bien *Isaria felina* ou même d'autres

champignons hors ces deux types et que les techniques d'isolement par suspension-dilution n'ont pas permis de les détecter.

Devant le problème posé, est ce que le tapis mycélien est celui d' *Isaria felina* ou pas, on essaiera de discuter la différence entre le lectotype décrit en article est la souche 23 B du point de vue croissance sur le milieu naturel.

En prenant d'abord, l'origine des souches d' *Isaria felina* décrit en article si dessus. Qu'est ce qu'on trouve ? On trouve que les souches ont été isolées dans la plupart des cas à partir des excréments d'animaux. En plus, ces souches ont présenté un caractère très remarquable : leurs synnemata sont phototropique,

Or, notre souche 23 B et toutes les souches qui lui ressemblent ont été isolées du sol et des concrétions sédimentaires d'un point situé à 185 m de l'entrée d'une grotte (Ghar Beni Aâd), alors l'origine est totalement différent des autres souches, c'est une souche cavernicole.

Si on considère que le tapis mycélien est celui d' *Isaria felina*, qu'est ce qu'on peut dire ?

On peut dire, que même si le tapis mycélien est celui d' *Isaria felina*, les hyphes n'ont pas les mêmes caractéristiques que celle décrites par l'article. La différence observée est peut être attribuée à plusieurs facteurs, la matière nutritive, l'oxygène, l'humidité et enfin la lumière.

Si on prend le biotope des souches citées par l'article, on trouve que c'est des milieux riches en matière nutritive puisque ce sont des excréments d'animaux, carotte,...etc. Les autres facteurs n'ont pas été cités.

Contrairement, à nos souches qui sont isolées d'un milieu extrême où l'apport en matière nutritive, ainsi en oxygène pose plusieurs questions du fait des caractéristiques du point de prélèvement P₂ évoquées en haut. La lumière joue un rôle important puisque les synnemata des souches citées en article sont phototropique, alors que le biotope de la souche 23 B est caractérisé par une obscurité total.

Par ailleurs, si on considère que le tapis mycélien est pas à *Isaria felina*, on peut dire que les spores de cette espèce ont été conservés dans le sol et sur les stalactites, et que les caractéristiques du point de prélèvement P₂ n'ont pas permis le développement de ces spores. En effet, les moisissures sont parfois condamnées à un mode de conservation originale. Dans les parties de réseaux soumises aux courants d'air ascendantes ou descendantes, notamment à proximité des entrées, les apports organiques, à la surface des sédiments, peuvent être suffisants – l'humidité par ailleurs ne faisant que rarement défaut – pour permettre un début de développement des spores qui les accompagnent. Ce développement est réduit et on isole

fréquemment, notamment dans les galeries de faible volume ouvertes aux pollutions, à côté de courts filaments mycéliens vides, à parois épaisses, de grosses spores à parois épaisses également, mais rarement des sporanges. Ces grosses spores sont capables ultérieurement d'un développement normal. Le court mycélium issu de la germination, après avoir rassemblé son cytoplasme, donne des sortes d'oïdies qui sont plutôt des kystes correspondant à un stade de conservation (CAUMARTIN, 1959).

Mais le problème ne s'arrête pas, est-ce que le tapis mycélien est celui d'*Isaria felina* ou pas, et encore est-ce que *Isaria felina* est présent au niveau du point de prélèvement P₂ à l'état végétatif ou à l'état de spore, mais de quel facteur, elle est peut-être influencée sous les deux états.

Les interactions entre les composantes de la mycoflore du sol de ce point peuvent jouer le rôle, comment ?

Selon Dommergues (1969) « Lorsque l'on inocule un sol stérile avec un microorganisme quelconque, ce dernier s'y installe sans difficulté, à condition, bien entendu, qu'il dispose d'un substrat convenable et qu'il ne soit pas gêné par des facteurs écologiques défavorables, pH excessif ou insuffisant par exemple. Par contre, si l'inoculation porte sur un sol non stérile, elle est souvent vouée à l'échec : c'est ainsi que de nombreux microorganismes pathogènes pour l'homme, les animaux ou les plantes, ne se conservent pas dans les sols biologiquement actifs. Cet échec de l'introduction d'un microorganisme étranger dans un sol non stérile s'explique par l'intervention de processus antagonistes divers, dont les principaux sont la compétition, l'antibiotisme, la prédation et le parasitisme. ».

D'après ce paragraphe, on peut dire que nos souches d'*Isaria felina* ont été peut-être à l'état de spore, si c'est le cas, pas seulement à cause des conditions d'environnement mais les interactions peuvent jouer un rôle, surtout celles de type antagonistes.

L'un de ces interactions le plus intéressant est la mycostase ou phénomène d'inhibition de la germination des spores fongiques en contact avec le sol, même si les conditions d'environnement sont favorables à leur germination. Il est expliqué soit par la déficience du sol en substrat nécessaire à la germination d'où apparition d'une compétition très vive entre ces spores d'une part et les autres éléments de la microflore d'autre part, soit par la diffusion dans le sol de substances inhibitrices (mycostatiques), en particulier d'antibiotiques (DOMMERGUES, 1969).

On comprend que, si *Isaria felina* est présent au niveau de ce point de prélèvement à l'état de spore, elle est peut-être sous l'influence des interactions antagonistes, mais si elle est à l'état végétatif, de quel type d'interaction elle est peut-être soumise ?

Premièrement, on doit faire la remarque sur la différence entre le tapis mycélien et la forme végétative. Lorsqu'on a dit le tapis mycélien est celui d'*Isaria felina*, on a peut être négligé un peu le cas où le tapis mycélien est formé d'une part par *Penicillium*, qu'on a révélé auparavant leur abondance au niveau de ce point, et d'autre part par *Isaria felina* et même d'autres champignons.

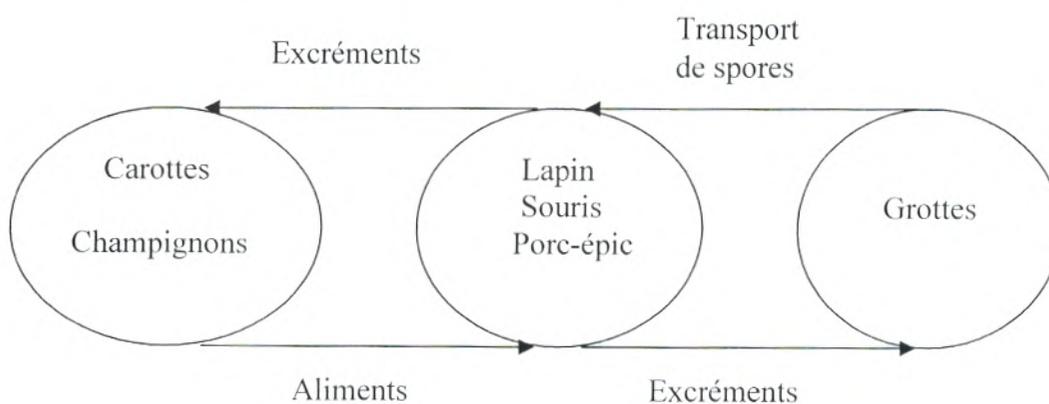
Si c'est le cas, on peut dire que ces composantes du tapis mycélien sont peut être sous la dépendance des interactions synergiques, qui a rendu ce point de prélèvement un milieu favorable autant pour *Penicillium* que pour *Isaria felina* malgré les points d'interrogation accompagnant les conditions d'existences au niveau de ce point.

Si ce n'est pas le cas, on peut dire que cette espèce a peut être exercé des interactions antagonistes contre les autres champignons.

Quoiqu'on parle de la différence observée entre les caractéristiques du lectotype décrit en article et celles de la souche 23 B, on ne peut pas négliger la différence entre les deux origines d'isolement. Alors, si on analyse bien les données de cet article, qu'est ce qu'on peut dire ?

Hors l'origine d'isolement, l'article n'a pas donné des informations concernant, sous quelle conditions de croissance a donné cette espèce la forme décrite en paragraphe si dessus (la température, la luminosité et l'humidité), ainsi l'origine exacte pas seulement des excréments mais aussi des animaux, des champignons, des carottes...etc. Est-ce qu'ils ont une relation avec les grottes ?

On essayera d'établir cette relation par le schéma suivant :



Pourquoi on a pensé à cette relation ? Peut être parce qu'on a trouvé que l'origine d'isolements des souches d'*Isaria felina* de l'article ont une relation avec les grottes ; surtout, lorsqu'on parle du porc-épic dont l'habitat principal de cet animal c'est les cavités

souterraines, et même quand on parle des autres origines, ils ont une relation avec le monde souterrain.

Par ailleurs, cette relation peut nous diriger vers une problématique, est ce que *Isaria felina* est une espèce cavernicole ou c'était les animaux cités par l'article qui ont transporté ces spores à l'intérieur de la grotte de Beni Aâd.

Avant de terminer, nous devons faire la remarque qu'en laboratoire on a isolé plusieurs souches de cette même espèce et à partir de plusieurs échantillons du point de prélèvement P₂ et on a fait plusieurs essais d'isolement pour éviter les probabilités que cette espèce d'être un simple contaminant de nos cultures.

On peut ajouter que ce point de prélèvement n'est pas un endroit préférable aux touristes de la grotte, puisqu'elle n'est pas concrétionnée en formes attirantes. Pourquoi on a dit ça, tout simplement pour éviter la probabilité que les souches isolées de cette espèce sont à l'origine les pieds des touristes.

Afin d'atteindre notre objectif de départ que c'était l'isolement des souches fongiques à activité antibactérienne ; on a utilisé deux méthodes, dont l'une était utilisée pour les souches de *Penicillium*, pendant que l'autre était utilisée pour la souche 23 B.

Concernant la première méthode les souches ont été passées par deux criblages, afin de sélectionner les souches les plus puissantes de point de vue d'activité antibactérienne. En passant par le criblage primaire, on a révélé la présence d'une activité inhibitrice chez 38 souches de *Penicillium* parmi 80 souches testées contre une des trois bactéries-cible.

Les souches de *Penicillium* les plus puissantes ont été d'origine la station 1 et le point de prélèvement P₂ de la station 3.

Le criblage secondaire a montré que parmi 14 souches de *Penicillium* testées seulement 7 souches qui ont révélé une activité antibactérienne contre aux moins une bactérie-cible dont la plupart ont exercée l'activité inhibitrice contre les deux bactéries-cible *Salmonella typhi* et *Proteus mirabilis*.

Par suite de ces résultats, on peut dire que les zones d'inhibitions obtenues en deuxième criblage ont été nettement inférieures à ceux obtenues en premier criblage des mêmes souches de *Penicillium*. Cela est peut être attribué à la méthode utilisée.

En effet, le milieu de culture peut jouer un rôle important dans les résultats d'activité antibactérienne (TAKAHASHI CTAKADA et al, 1994 ; BERNAN et al, 1994) ; dont il peut influencer par différentes voies, par sa composition, sa richesse en matière nutritive, son pH et même son état que ce soit liquide ou solide. Alors, le fait que le milieu de culture utilisé pour la production des antibiotiques par la méthode de culture en milieu liquide soit le milieu

(YGS) et celui de culture en milieu solide soit (PDA_{ac}) peut influencer sur les résultats d'antibiose.

Selon Gaden-Junior (2000), la production des métabolites est sous l'influence de la composition des milieux de cultures, sa richesse en nutriment, plus d'autres aspects. Différentes sources de carbones et d'azotes peuvent agir sur la synthèse des enzymes impliqués dans le métabolisme primaire et secondaire. Les microorganismes sont capables d'utiliser une large variété de sources de carbones et d'azotes. Pourtant, beaucoup de voies de métabolismes secondaires sont affectées négativement par les sources favorables à la croissance (SANCHEZ et DEMAIN, 2002).

Plus la composition des milieux de culture, le pH peut influencer sur les résultats d'antibiose puisqu'il est différent. Le pH du milieu (YGS) neutre, pendant que celui du (PDA_{ac}) est acide.

Par ailleurs, il faut ajouter que les conditions de laboratoire peuvent influencer sur les résultats. Alors, comment ?

Les essais effectués aux cours de notre étude en laboratoire, nous ont imposé à réfléchir ce n'est pas seulement à la différence observée entre les deux méthodes mais aussi les différences observées, quelque fois, entre les résultats d'une même méthode. Et on a fini par dire que les conditions climatiques ont peut être joué un rôle important dans l'expression de l'activité antibactérienne chez les souches de *Penicillium*. Pourquoi ?

On a remarqué que les tests d'antibiose effectués en climat froid ont donné des résultats positifs, tandis que ceux effectués en climat chaud ont donné dans la plupart du temps des résultats négatifs. Cela est peut être attribué à la production des antibiotiques par les souches de *Penicillium*, peut être elle est affectée par la période sèche même en utilisant des étuves à 25°C, cela n'est pas sans inconvénient.

Ces remarques, nous font penser à l'origine d'isolement (les grottes) et les conditions de ce milieu (température, humidité...etc).

Par ailleurs, les résultats d'antibiose des souches de *Penicillium* que ce soit en premier criblage, qu'en deuxième ont été la preuve de la richesse des grottes et spécifiquement la station 1 et le point de prélèvement P₂ de la station 3 en producteurs d'antibiotiques. Ces sites d'études que leurs caractéristiques (la matière organique, l'humidité, l'oxygène...etc), n'ont pas fait défaut à la présence des champignons du genre *Penicillium*, ont favorisé la compétition entre ces champignons et les autres éléments de la microflore du sol, donc la présence des producteurs d'antibiotiques les plus performants.

En effet, dans la nature les antibiotiques représentent un atout pour les bactéries et les moisissures qui les synthétisent. Cet atout leur permet de nuire à leurs compétiteurs pour mieux s'accaparer les substances nutritives disponibles dans leur environnement (GAUTHIER, 1993).

Enfin, nous devons faire remarquer que l'activité antibactérienne des souches testées peut être plus importante en milieu naturel que celle exhibée en laboratoire, du fait, premièrement, aux conditions extrême de nos sites d'étude, plus le choix de milieu de culture et les conditions de production des antibiotiques.

Avant de terminer, on ne peut pas oublier un autre témoignage des résultats d'antibiose des souches de *Penicillium*, c'était premièrement, les caractéristiques du point de prélèvements P₂.

Plus, l'histoire du combattant dans la station 1 avec les blessures et le jeûne pendant 12 jours au lieu qu'elle s'aggravait, elle s'est stabilisée. Peut être cet état était du à la présence des organismes producteurs d'antibiotiques.

A propos de la souche 23 B appartenant à l'espèce *Isaria felina*, le résultat d'activité antibactérienne obtenue par la méthode 2 a montré que les filaments aériens agrégés libèrent dans l'eau distillée des substances antibactériennes.

Par ailleurs, les résultats des tests de production des substances antibactériennes exogènes et endogènes ont montré une activité négligeable du liquide, et parallèlement une activité importante de l'extrait éthanolique du mycélium (aérien et substrat).

En effet, les filaments aériens agrégés de cette espèce étaient la cible de beaucoup de chercheurs de molécules insecticides et même des molécules antifongiques (GUO et al, 2005). L'étude de l'activité antibactérienne d' isarfiline contre les bactéries-cibles (*Bacillus subtilus*, *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*), effectuée par Guo et al (2005), a révélé l'absence d'une activité notable. Alors que peut on dire de nos résultats ?

La présence d'une activité inhibitrice de la souche 23 B contre les bactéries- cible est peut être attribuée à plusieurs facteurs ; au milieu de culture, au protocole d'extraction, aux bactéries- cible, à la souche elle-même pour des raisons peut être liées plus aux facteurs d'antagonistes (cités en haut).

Il faut ajouter que l'absence d'une activité antibactérienne notable du surnageant, ça ne veut pas dire que la souche n'a pas des substances antibactériennes exogènes ; la composition du milieu de culture, son pH, ainsi son volume peut influencer sur les résultats.

Ailleurs, les résultats d'activités antibactériennes des extraits éthanoliques et étheriques du mycélium peuvent nous faire penser à la nature hydrophile de la substance active, puisque l'activité était concentrée dans l'extrait éthanolique.

CONCLUSION

A la lumière des résultats obtenus, on peut conclure que les souches isolées à partir des grottes de Aïn Fezza, possèdent une activité antibactérien remarquable, notamment contre *Pseudomonas aeruginosa* connue par sa résistance aux antibiotiques.

Cette résistance des bactéries nous a incités, en début, à la recherche de nouvelles substances antibactériennes en monde souterrain ; or notre travail a permis non seulement d'accomplir cet objectif, mais aussi de :

- Ouvrir la porte du monde souterrain de l'Algérie et plus exceptionnellement le monde fongique.
- Exploiter les fameuses grottes de Aïn Fezza.
- Ouvrir la porte des explorations des grottes de Tlemcen.
- Isoler de nouvelles souches fongiques originales du monde souterrain de notre région, propres à notre pays.
- Traverser l'ère d'étude des déformations morphologiques de la flore et la faune souterraine vers l'ère des molécules thérapeutiques d'origine souterraines.

Alors, on peut dire que ce travail n'est qu'un début.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonyme 1 (2001). Encyclopédie : la Spéléologie.
<http://www.Cds06.free.fr/commission/com-promotion/definition/yahoo.html>.
- Anonyme 2 (2005). Cavernicoles.
<http://www.Univ-ubs.fr/ecologie/cavernicoles.html>.
- Anonyme 3 (2006). Parc National de Tlemcen. Fiche descriptive sur les zones humides Ramsar.
- Arroyo G, Arroyo I et Arroyo E (1997). Microbiological analysis of Maltaviesa Cave (Caceres), Spain. *International Biodeterioration and biodegradation*. Vol. 40. No. 2-4. Pages 131-139.
- Atkinson G (1891). On the structure and dimorphism of *Hypocrea tubaeformis*. In : Contribution à l'étude de la flore souterraine de France (Maheu J). Thèse de Doctorat, 190 p.
- Barnett HL et Barry B.Hunter (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3^{ème} Ed. Burgess Publishing Company, 160p.
- Berdy J (1985). Screening classification and Identification of microbial products. In : *Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriels* (Florent. J). Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612p.
- Bernan V S, Montenegro D A, Korshalla J D, Maiese W M, Steinberg D A et Greststein M (1994). Bioxalomycins new antibiotics produced by the marine *Streptomyces* sp. In: Isolation, characterisation and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India (Kokare CR, Mahadik KR, Kadam SS et Chopade B A). *Current Science*, Vol. 86. No. 4-25.
- Boiron P (2005). Mycologie. Thèse soutenue dans d'autre université.
http://www.Univ-Lyon1.fr/mycolgie/Site_labomyco/enseignements/Thesesautres.htm.
- Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy PH, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y et Veau P (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*. 2^{ème} Ed. Masson. 426p
- Bouchet P H, Guignard J L, Villard J (1999). *Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée*. Ed. Masson : Paris. 194 p.
- Breton A, Theilleux J, Sanglier JJ et Vobis G (1989). Organismes producteurs : Biologie, taxonomie et écologie. In : *microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriels* (Florent. J). Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612p.
- Caneva G et Salvadori O (1988). Biodeterioration of Stone. The deterioration and Conservation of Stone. In : *Microbiological analysis of Maltaviesa Cave* (Caceres), Spain. *International Biodeterioration and biodegradation* (Arroyo G, Arroyo I et Arroyo E). Vol. 40. No. 2-4. Pages 131-139.

- Caumartin V (1959). Quelques aspects nouveaux de la microflore des cavernes. Ann. Spéléol. 14 :147-157.
- Chaverri P et Samuels GJ (2004). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae) : Species with green Ascospores. Studies in Mycology. 48: 1-116
- De Billerbeck GV (2000). Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson sur *Aspergillus niger*. Évaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur de substances volatiles en phase vapeur. Thèse de doctorat
- De Hoog GS (1972). The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. Studies in Mycology. 1 : 40.
- Demain AL (1981). Industrial microbiology, Science In : Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriels (Florent. J). Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612 p.
- Dommergues I (1969). La biologie des sols. Presses Universitaires de France : Paris. 125p.
- Dubois P et Grellet B (1997). Les concrétions des grottes enregistrent climats et séismes. Pour la Science. N° 231.
- Florent J (1993). Microbiologie industrielle, les microorganismes d'intérêts industriels. Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612 p.
- Gaden-Junior EL (2000). Fermentation process kinetics. Biotechnol. Bioeng. 67, 629-639.
- Gauthier (1993). Les antibiotiques : l'envers du miracle. L'Agora, Vol. 1. N° 3.
- Graur A (2001). Emil Racovitză entre Paris, Bucarest et le pôle sud (Bucarest matin). [http://www. Bucarest-matin.Ro/ARHIVI/2001 FEB/1122 info. html](http://www.Bucarest-matin.Ro/ARHIVI/2001_FEB/1122_info.html).
- Guo YX, Liu QH, Ng TB et Wang HX (2005). Isarfelin, a peptide with antifungal and insecticidal activities from *Isaria felina*. Peptides. Accepted 16 May 2005.
- Jeannel R (1937). Les Etres Vivants, Plantes – Animaux ; Les milieux et Leurs Faunes ; Le Domaine Souterrain. Encyclopédie Française. Tome 7 .5'54-11, 5'54-16 pp.
- Khelil N (1997). Etude des antibiotiques biosynthétisés par des bactéries filamenteuse extrêmophiles, notamment *Metallogenium sp.* Thèse de Magister, option Biologie Moléculaire et Cellulaire. Ins. Sc. Nat. Tlemcen.
- Leeb M (2004). « A Schot in the arm » in Nature. N° 431. P. 892-893. In : la course de vitesse entre les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes : analyse et discussion de quelques pistes (Lombard F).
- Locquin M (1984). Mycologie générale et structurale. Ed. Masson. P. 551.
- Lombard F (2005). La course de vitesse entre les antibiotiques et les bactéries pathogènes résistantes : analyse et discussion de quelques pistes. [http://www.tecfa.unige.ch/lombard f/calvin/Tm/05/darbellay](http://www.tecfa.unige.ch/lombard_f/calvin/Tm/05/darbellay).

- Maheu J (1906). Contribution à l'étude de la flore souterraine de France. Ed. Masson, Paris, 190p, in-8°. Thèse de Doctorat présentée à la faculté des sciences de Paris pour obtenir le grade de Docteur en sciences naturelles.
- Mason-Williams A et Benson-Evans K (1967). Summary of results obtained during a preliminary investigation into the bacterial and botanical flora of caves in south Wales. *Int. J. Speleol.* 2 :397-402.
- Pomerol C et Renard M (1997). *Elément de Géologie*. 11^{ième} Ed. Masson. 629p.
- Purves WK, Orians GH et Heller HC (1994). *Le monde vivant. Traité de biologie*. Sciences/ Flammarion. 1224p.
- Ramirez C (1982). *Manual and atlas of the penicillia*. Amsterdam – New York – Oxford . Elsevier Biomedical press. 874p.
- Ravindra G, Ranganayaki RS, Raghothama S, Srinivasan MC, Gilardi RD, Karle IL et Balaram P (2004). Two Novel Hexadepsipeptides with Several Modified Amino Acid Residues Isolated from the Fungus *Isaria*. *Chemistry and Biodiversity*. Vol.1.
- Saadoun I, Hameed KM et Moussaoui A (1999). Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios.* 99: 173-179.
- Sanchez S et Demain AL (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. In : *Antibacterial activity from *Penicillium corylophilum** Dierckx (Silva MG, Furtado NAJC, Pupo MT, Fonseca MJV, Suraia S, Filho AADS et Bastos JK). *Microbiological Research.* 159. 317-322.
- Scopoli JA (1760). *Flora carniolica Viennæ*. In: Contribution à l'étude de la flore souterraine de France (Maheu). Ed. Masson, Paris, 190p, in-8°. Thèse de Doctorat.
- Tachenon A (1999). *LA Science des champignons*. [http:// www. Tachenon. Com](http://www.Tachenon.Com)
- Takahashi Ctakada T, Yamada T, Minoura K, Uchida K, Matsumura E et Numata A (1994). Halichomycin, a new class of potent cytotoxic macrolide produced by an actinomycetes from a marine fish. In: *Isolation, characterisation and antimicrobial activity of marine halophilic *Actinopolyspora* species AH1 from the west coast of India* (Kokare CR, Mahadik KR, Kadam SSet Chopade BA). *Current Science*, Vol. 86. No. 4-25.
- Tercafs R (1997). *Les animaux cavernicoles*. [http://www. pragmasoft.be/carnets/bio/animcav/tercafs.html](http://www.pragmasoft.be/carnets/bio/animcav/tercafs.html).
- Turner WB (1975). Commercially important secondary metabolites. In : *Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriels* (Florent. J). Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612 p.
- Valvasor JWF (1689). *Die Ehre des Herzogthums Crain*. In : Contribution à l'étude de la flore souterraine de France (Maheu). Ed. Masson, Paris, 190p, in-8°. Thèse de Doctorat.
- Went (1969). In : *Mycologie générale et structurale* (Locquin M). Ed. Masson. P. 551.

ANNEXES

Composition des milieux de cultures

- **Eau physiologie**
 - Chlorure de sodium 9 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **Bouillon nutritif**
 - Peptone 15 g
 - Extrait de levure 5 g
 - NaCl 5 g
 - Eau distillée 1000 ml
 - pH 7,4
- **Gélose nutritive**
 - Extrait de viande 3 g
 - Peptone 5 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
 - pH 7,4
- **Mueller Hinton**
 - Macération de viande 300 ml
 - Peptone de caséine 17,5 ml
 - Amidon 1,5 ml
 - Agar 17 g
 - pH 7,4
- **CDA (Czapek Dextrose Agar)**
 - NaNO₃ 3 g
 - MgSO₄ 0,5 g
 - KH₂PO₄ 1,5 g
 - FeSO₄ 0,05 g
 - KCl 0,5 g
 - Succrose 30 g
 - Agar 15 g

- **ISP₂** (International Streptomyces Project)
 - Extrait de levure 4 g
 - Extrait de Malt 10 g
 - Glucose 4 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
 - Ampicilline 2 ml
 - Fungisone 1 ml
- **MEA** (Malt Extract Agar)
 - Extrait de Malt 20 g
 - Glucose 5 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **MYEA** (Malt Yeast Extract Agar)
 - Extrait de Malt 20 g
 - Glucose 5 g
 - Extrait de levure 10 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **PDA** (Potatoes Dextrose Agar)
 - Pomme de terre 200 g
 - Eau distillée 700 ml
 - Chauffage et filtration : le filtrat +
 - Sucrose 10 g
 - Agar 15 g
 - Eaux distillée 1000 ml
- * **PDA_a** (Potatoes Dextrose Agar acidifié):
200 ml de PDA + 1,5 ml d'acide lactique (25%)
- * **PDA_R** (Potatoes Dextrose Agar + Rose Bengal):
200 ml de PDA + 2 ml de Rose Bengal.

- **AFPA** (Aspergillus Flavus / Parasiticus Agar)
 - Peptone bactériologique 10 g
 - Extrait de levure 20 g
 - Citrate de fer ammoniacal 0,5 g
 - Chloramphénicol 100 mg
 - Dichloran 1 ml (0,2% :
2g de Dichloran dans 100 ml d'éthanol)
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **YEA** (Yeast Extract Agar)
 - Peptone 5 g
 - Extrait de levure 3 g
 - Agar 20 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **YESA** (Yeast Extract Starch Agar)
 - Peptone 5 g
 - Extrait de levure 3 g
 - Amidon soluble 15 g
 - Extrait de levure 4 g
 - K_2HPO_4 0,5 g
 - $MgSO_4$ 0,5 g
 - Agar 15 g
 - Eau distillée 1000 ml
- **YGS** (Yeast Glucose Succrose)
 - Succrose 20 g
 - Glucose 20 g
 - Extrait de levure 20 g
 - Eau distillée 1000 ml