

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة ابو بكر بلقايد- تلمسان

Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM



كلية علوم الطبيعة والحياة، وعلوم الأرض والكون

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

Département de biologie



MÉMOIRE

Présenté par

Mlle AMARA SARRA et Mlle BENCHIKH MANEL

En vue de l'obtention du

Diplôme de MASTER

En Microbiologie Fondamentale

Thème

Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Grotte d'Ighzer – Timimmoun.

Soutenu le 25/06/2023, devant le jury composé de :

Présidente	Mme. LOUKIDI Bouchra	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrant	M. BELYAGOUBI Larbi	MCA	Université de Tlemcen
Examineur	M. REBIAHI Sid Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen

Année universitaire 2022/2023



Remerciements

*Avant tous nous remercions **ALLAH** le tout puissant pour le courage, la volonté et la passion qu'il nous a accordée pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons tout d'abord à remercier Monsieur **BELYAGOUBI Larbi** Maître de Conférences à l'Université Aboubekr Belkaid -Tlemcen, qui a bien voulu accepter de me prendre en charge pour réaliser ce modeste travail dont le mérite lui revient grâce à son aide à la fois matérielle et morale, ses conseils précieux et sa gratitude.*

*Nous tenons à remercier la Professeur Madame **LOUKIDI Bouchrapour** pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury, Qu'elle trouve ici notre sincères impressions de gratitude et de respect. Notre plus vifs remerciements vont à Monsieur **REBIAHI Sid Ahmed** Professeur à l'université de Tlemcen pour avoir accepté d'examiner ce travail. Nous sommes honorés par sa participation au jury de ce mémoire.*

*Nous tenons surtout à adresser nos puls vif remerciements à Madame la Doyenne **Pr. SOULIMANE-MOKHTARI Nassima Amel**, de nous avoir autorisés à accéder au Laboratoire pédagogique de Microbiologie et de nous approvisionner par le matériel et les produits chimiques.*

*Je souhaite également remercier Madame **BENABADJI-BOUCHENAK KHELLADI Nadia** du Laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen pour la fourniture des souches de référence et pour l'approvisionnement en matériel et produits d'analyses microbiologiques.*

*Je souhaite également à exprimer ma reconnaissance envers Mesdames Professeur **BOUCHERIT-OTMANI Zahia**, Docteur **BELLIFA Samia** et Docteur **MHAMMEDI Imene**, pour les souches microbiennes de référence.*

*Sans oublier Professeurs Madame **BEKHECHI-BENHABIB Chahrazed** et Monsieur **AZZI Rachid** pour la fourniture des milieux de culture nécessaires pour l'évaluation de l'activité antimicrobienne.*

*On remercie Les responsables des laboratoires de Microbiologie : Madame **ZEKRAOUI Farima**, Madame **TABETI Fatima Zohra**, Mr **HABI Salim** et Mr **YAZID Amine**, pour leur aide et assistance, leur patience et leur appui pendant toute la période de préparation de nos mémoires de Master.*

Sincères remerciements à tous nos enseignants et surtout ceux du département de Biologie.



Dédicace

Je dédie ce modeste travail à :

DIEU le tout puissant , le tout méricordiaux , ton amour graces à mon égard m'ont donné la préservance et le courage pour accomplir ces études .

A mes chers parents mes piliers , mes exemples pour leur soutien , leur patience ,leur encouragement durant mon parcours que dieu les protèges et leurs offre la chance et le bonheur.

A mes chers frères IMAD , SOHAIB pour leur présence dans mes cotés.

A tout la famille ,A tous mes collègues pour les souvenirs de tous les moments que nous passées ensemble et nos éclats de rire sans oublie mon binome pour sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet .

«sarra»



Dédicace

Je remercie dieu le tout puissant, qui nous a tracé le chemin de notre vie et de m'avoir donné la force, la patience et la volonté pour réaliser ce travail.

J'ai pu réaliser ce travail que je dédie :

A mes chers parents

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour vous. Vous m'avez comblée avec tendresse et affection tout au long de mon parcours.

Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse vous combler à mon tour.

À mes agréables et aimables sœurs et frère

Meriem, Mohammed, Mehdi

À tous les membres de ma chaleureuse famille

Cousins, cousines, tantes et oncles et surtout ma cousine safaa

À celle avec qui j'ai partagé ce travail

Sarra

À ma meilleure amie qui ma soutenue

Lina

«Manel»

Résumé

La découverte de nouveaux antibiotiques et autres métabolites microbiens bioactifs est une priorité compte tenu de la fréquence des micro-organismes pathogènes multirésistants émergents. Ainsi, les scientifiques recherchent de nouveaux antibiotiques isolés des micro-organismes d'habitats extrêmes comme les grottes.

L'Algérie possède un écosystème qui abrite une envoûtante variété de micro-organismes qui peuvent être une provenance importante d'une énorme multiplicité de molécules antimicrobiennes.

Par conséquent, une plus grande attention a été accordée aux méthodes de dépistage et d'évaluation de l'activité antimicrobienne des germes des milieux extrêmes.

Dans notre recherche nous nous sommes attirés à la recherche des champignons producteurs de molécules bioactive à partir de la grotte d'Ighzer (Wilaya de Timimoun).

Le prélèvement des sédiments et des roches a été accompagné par des isolements sélectifs de 14 souches fongiques. Les isolats identifiés appartiennent aux genres *Aspergillus* (4/14), *Penicillium* (2/14), *Alernaria* (2/14), *Cladosprium* (2/14) et *Ulocladium* (1/14).

Le test d'activité antibactérienne a indiqué que 2 souches présentent une activité antibactérienne sur au moins une des bactéries tests. Les souches S7 et S10 ont propagées une activité contre *Bacillus subtilus* avec des diamètres des zones d'inhibition varient entre 11.5 et 13 mm.

La grotte d'Ighzer peut être considérée comme une source prometteuse de microorganismes producteurs de substances bioactives.

Mots clés : Grotte d'Ighzer, Moisissures, Germes pathogènes, Activité antimicrobienne.

ملخص

يعد اكتشاف المضادات الحيوية الجديدة وغيرها من المستقبلات الميكروبية النشطة بيولوجيًا أولوية نظرًا لتكرار ظهور الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض المقاومة للأدوية المتعددة. وهكذا ، يبحث العلماء عن مضادات حيوية جديدة في الكائنات الحية الدقيقة المعزولة عن الموائل المتطرفة مثل الكهوف.

الجزائر لديها نظام بيئي يحتوي على مجموعة متنوعة ومثيرة الاهتمام من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تكون مصدرًا رائعًا لتعدد كبير من الجزيئات المضادة للميكروبات . لذلك، تم منح المزيد من الاهتمام لطرق فحص وتقييم النشاط المضاد للميكروبات في البيئات القاسية مثل الكهوف.

لقد انجذبنا في عملنا إلى البحث عن الكائنات الحية الدقيقة التي تنتج جزيئات نشطة بيولوجيًا من كهف "إيغزر".

وقد رافق أخذ عينات من الرواسب والصخور عزل انتقائي للقوالب من 14 سلالة. العزلات التي تم التعرف عليها تنتمي إلى الجنس *Aspergillus* و *Penicillium* .

أشار اختبار النشاط المضاد للبكتيريا إلى أن سلالتين تظهران نشاطًا مضادًا للبكتيريا على واحدة على الأقل من بكتيريا الاختبار ونشاط السلالات S7 و S10 ضد *Bacillus subtilis* بأقطار تتراوح بين 11.5 و 13 مم.

يمكن اعتبار كهف "إيغزر" مصدرًا لإنتاج الكائنات الحية الدقيقة.

الكلمات المفتاحية: كهف إيغزر ، العفن ، الجراثيم المرضية ، نشاط مضادات الميكروبات.

Abstract

The discovery of new antibiotics and other bioactive microbial metabolites is a priority given the frequency of the emerging multi-drug resistant pathogenic microorganisms. Thus, scientists are searching for new antibiotics in microorganisms isolated from extreme habitats such as caves.

Algeria has an ecosystem that harbors a bewitching variety of microorganisms that can be an awesome provenance for a huge multiplicity of antimicrobial molecules.

Therefore, more attention has been paid to methods for screening and evaluating the antimicrobial activity of extreme environments such as caves.

In our research we are attracted to the search for fungi producing bioactive molecules from the Ighzer cave.

The sampling of sediments and rocks was accompanied by selective isolations of molds from 14 strains.

The isolates identified belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*.

The antibacterial activity test indicated that 2 strains exhibit antibacterial activity on at least one of the test bacteria and the S7, S10 strains propagated activity against *Bacillus subtilus* with diameters of the inhibition zones varying between 11.5 and 13 mm.

The Ighzer cave can be considered as a source of microorganisms producing bioactive molecules.

Keywords: Ighzer Cave, Molds, Pathogens, Antimicrobial activity.

Sommaire

Introduction.....	1
Synthèse bibliographique.....	4
1. Les grottes.....	6
1.1 Introduction.....	7
1.2. Historique de la microbiologie des grottes	8
1.3. Ecologie microbienne des grottes.....	8
2. les champignons des grottes	10
2.1. Les moisissures des grottes.....	11
2.2.Les métabolites produits par les champignons des grottes.....	15
3. Les champignons.....	16
3.1. Généralités	17
3.2 Écologie des champignons.....	17
3.3. Propriétés principales des champignons	19
3.4 Identification des champignons	19
3.4.1. identification morphologique.....	20
3.4.2 identification génétique	20
3.5. Le genre <i>penicillium</i>	21
3.6.Le genre <i>Aspergillus</i>	22
2.6 les métabolites secondaires	23
2.6.1 mycotoxines.....	23
2.6.2 les antibiotiques	23
2.7 classification des champignons	25
2.7.1 les chytridiomycètes.....	25
2.7.2 les zygomycètes	25
2.7.3 les basidiomycètes.....	26
2.7.4 les ascomycètes	26

2.7.5 les deutéromycètes.....	26
4. les microorganismes tests	24
1. <i>Pseudomonas aerogenosa</i>	28
2. <i>Echerichia .coli</i>	28
3. <i>Klepsiella . pneumoniae</i>	29
4. <i>Staphylococcus .aureus</i>	30
5. <i>Bacillus .subtilis</i>	30
6. <i>Enterococcus .feacalis</i>	31
7. <i>Candida .albicans</i>	32
Matériel et méthodes.....	34
1. lieu d'étude	34
2. échantillonnage.....	35
3. ph de sol	38
4. Isolement des moisissures.....	38
5. identification des moisissures	39
5.1.1 Macromorphologie et caractères cultureux	39
5.1.2 Observation microscopique.....	39
6. test d'activité antimicrobienne	40
7. test d'activité antifongique	41
8. criblage par la technique des cylindres d'agar.....	41
9. criblage par la technique des puits	43
Résultats et discussion	44
1. pH du sable	45
2. isolement des moisissures.....	45
3. identification des moisissures	47
4. résultats de l'activité antimicrobienne.....	53
Conclusion.....
Références bibliographiques.....
Annexes.....

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
1	Les familles des mycètes le plus fréquemment signalées dans les grottes (Kirk et al .(2008) et Domsch et al. (1980).	12
2	Fréquences de la diversité fongique dans les grottes. (Vandarwolf , et al ., 2013).	13
3	Les différents métabolites secondaires produits par des champignons des grottes (Jiang and Zhiqiang 2000)	15
4	Propriétés principales des Champignons (Delarras, 2007).	18
5	Mycètes productrices d'antibiotiques (Larpant Larpant-Gourguand, 1996).	24
6	Situation géographique de la station d'échantillonnage	34
7	Origines des souches exploitées dans les différents tests d'activité antimicrobienne.	39
8	le pH de l'échantillon du sol	45
9	Aspect microscopique et identification microscopique des souches	49
10	Les résultats de l'activité antimicrobiennes des souches (méthode des cylindres d'agar des moisissures)	53
11	Résultats de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries tests	55
12	Résultats de la sensibilité aux antifongiques de la levure (diamètres en mm)	56

Liste des des Figures

Figure	Titre	Page
1	Les stalactites et les stalagmites de la grotte Chaabe (Région de Tagma-Tlmeccen) (Photo personnelle de Belyagoubi L. (2023)).	7
2	Structure du <i>Penicillium</i> (Botton et al, 1990).	20
3	Les types de pénicilles (Botton et al.1990).	21
4	Caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> (Caillaud et al, 2006).	22
5	Classification générale des champignons (Chabasse, 2001).	26
6	<i>P. aeruginosa</i> fixées sur du verre, par microscopie à balayage électronique. (Deligianni et al. (2010)).	27
7	Vue au microscope électronique à balayage d'une culture pure d' <i>Escherichia coli</i> (Facon etDesforges, 2021).	28
8	<i>Klebsiella pneumoniae</i> vue au microscope électronique à balayage (Claire Xavier, 2010).	28
9	<i>Staphylococcus aureus</i> observé en microscopie électronique à balayage (Guadagnini , 2011).	29
10	<i>B. subtilis</i> observé en microscopie électronique à balayage (Carballido-López).	30
11	d' <i>Enterococcus faecalis</i> , visualisée par microscope électronique à balayage, extraite de Kristich et al. (2007)	30
12	<i>Candida albicans</i> , vue en microscopie électronique à balayage (Arbeille et Lebos, 2002).	31
13	Photos Du Ksar d'Ighzer	33
14	Photos d'entrée de la grotte d'Ighzer	33
15	carte géographique montrant de grotte d'ighezar (www. Google earth.com)	35
16	Zone d'échantillonnage. [A] : vue de l'extérieure de la grotte; [B] : Entrée de la grotte ; [C] : vue de l'intérieure de la grotte (Photos personnelles, 2023).	35
17	Prélèvements effectués par l'écouvillonnage ([A] : Les écouvillons ; [B]: Zone d'écouvillonnage à partir des sédiments [C] : Roche sédimentaire).	36
18	Mesure du pH du sable.	37
19	Préparation des dilutions des échantillons de la grotte.	38
20	Méthode de Scotch.	39
21	Antibiotiques testés : (1) : Ampicilline (10 µg), (2) : Amoxycilline	41

	(25 µg), (3) : colistine (10 µg), (4) : La nystatine (100 µg).	
22	Test de l'activité antibactérienne par la Technique de cylindres d'agar.	42
23	Culture de <i>Penicillium</i> sur milieu liquide [A] et Filtration du milieu liquide [B].	43
24	Photos des isolements des champignons du sol de la grotte sur les milieux PDAac et PDA.	46
25	Nombre des souches isolées des échantillons de la grotte.	47
26	Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus niger</i> [A]; <i>Cladosporium</i> sp.[B]; : <i>Penicillium</i> sp. [C]; <i>Aspergillus</i> sp. [D] et <i>Ulocladium</i> sp. [E].	48
27	Observation microscopique d' <i>Ulocladium</i> s.p (Gx100) [A]; <i>Aspergillus niger</i> [B]; <i>Penicillium</i> s.p [C] et <i>Alternaria</i> s.p. [D]	49
28	Nombre de genres isolés à partir de la grotte Ighzer.	51
29	effet des souches <i>Aspergillus</i> .Sp de sur <i>Bacillus subtilus</i> .	54
30	effet des souches <i>penicillium</i> . sp sur <i>Bacillus subtilus</i> .	54

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µL : Microlitre

OMS : Organisation Mondiale de Santé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

PCR : Polymerase Chain Reaction

g : gramme

L : Litre

mm: Milimètre

pH : Potentiel d'Hydrogène



Introduction

Introduction

Il existe d'innombrables grottes sur terre. Ils ont longtemps été utilisés par les animaux et les humains pour diverses raisons, et même pour les biologistes ce milieu était un laboratoire d'étude de l'évolution des espèces et des facteurs 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 <أصحابالكهف>. (Kholkhal, 2006).

Il a été démontré que les micro-organismes peuvent se multiplier dans les niches écologiques des grottes, malgré les conditions de croissance défavorables et les nombreux facteurs limitants (obscurité, oligotrophie et fortes concentrations de minéraux).

La plupart des articles portent sur les champignons (Djebbah et al., 2021; Jean-Jacques Delannoy, 2019 ; Belyagoubi et al., 2018), les bactéries (Menetrey et al., 2021), ou la présence de cyanobactéries et d'algues dans les grottes ou les grottes aux ouvertures exposées au soleil (Lise Alonso et al, 2022).

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

Les métabolites secondaires fongiques représentent une variété de composés qui jouent des rôles importants par leurs propriétés biologiques (Zain, 2014). Ceux-ci sont très utiles pour les industries impliquées dans la mycoremédiation, la bioremédiation et le compostage (Devi, et al., 2020). Cependant, ils présentent un grand intérêt médical car ils entrent dans la composition de médicaments (Goyal, et al, 2016) ainsi que des antibiotiques (Demain, 2000). Ces molécules complexes peuvent être des composés antibactériens, antitumoraux, antifongiques, antiviraux, anti enzymatiques et antioxydants. Les métabolites secondaires influencent également certains agents pathogènes des plantes tels que les champignons, les bactéries et même les virus avec une activité antagoniste très prononcée (Devi et al., 2020).

L'Organisation Mondiale de la Santé a déclaré qu'il existe une grave pénurie de nouveaux antibiotiques pour lutter contre le risque croissant de résistance aux antimicrobiens, qui constitue une urgence de santé publique mondiale (Kmietoicz, 2017). Dans divers cas, des antibiotiques et d'autres composés bioactifs ont été isolés à partir de micro-organismes.

Introduction

Dans cette optique, nous sommes intéressés à la recherche de nouvelles molécules bioactives antimicrobiennes produites par des moisissures isolées à partir de la Grotte d'Ighzer de la wilaya de Timimoun, comme alternative à l'antibiothérapie.

Afin d'atteindre notre objectif, la démarche expérimentale se résume à :

- Isolé des moisissures à partir des échantillons prélevés de différents endroits de la grotte ;
- Purifié et identifié les souches isolées ;
- Criblé le pouvoir antimicrobien des microorganismes sélectionnés contre des souches pathogènes.



Revue bibliographique

Chapitre 1

Les Grottes

1. Les grottes

1.1. Introduction

Les grottes sont des cavités naturelles souterraines, mais liées au monde extérieur et formées par l'érosion des roches comme le calcaire ou les couches de grés de sel. Les plus grandes et les plus fréquemment rencontrées sont les grottes karstiques, qui ont été creusées par l'eau pendant de milliers années la présence de celles –ci influence également l'histoire humaine (**Anton et al. 2012**).

Les grottes sont des environnements considérés comme extrêmes car elles sont pauvres en nutriments (**Tomczyk-Zak et Zielenkiewicz, 2016**). Elles présentent des conditions particulières comme un taux d'humidité élevé, une température stable et l'absence de la lumière et du manque d'apport en carbone organique de la photosynthèse (**Barton et Jurado, 2007**). Les interactions microbiennes avec les minéraux jouent un rôle important dans les grottes, principalement à travers la formation de structures comme les stalagmites et les stalactites et la décomposition des roches lors de l'accumulation d'oxydes métalliques par l'activité microbienne. La formation de surfaces rocheuses fragiles provoque l'expansion des grottes. De plus, ils abritent une large gamme de faune et de flore, y compris des chauves-souris, des insectes, des champignons et des plantes adaptées aux conditions de faible luminosité. Les algues qui vivent dans les grottes participent à la formation des structures, à la dissolution du sel souterrain qui entraîne l'effondrement de la surface et à la formation des dolines. Ces systèmes karstiques souterrains de grottes horizontales et de gouffres verticaux se trouvent dans le monde entier. Seul un nombre limité de ces grottes sont réellement accessibles en tant que grottes d'exposition, dont quelques-unes contiennent des arts pariétaux paléolithiques et néolithiques (**Hoyos et al. 1998**). Le système des grottes peut être divisé en cinq zones écologiques distinctes :

- ✓ La première zone c'est la **zone d'entrée** ou la lumière, le vent, l'humidité et la température varient considérablement.
- ✓ Puis la zone semi-obscur, humide et avec moins de fluctuation de températures, nommée **la zone crépusculaire**.
- ✓ Une zone qui est presque sombre (obscurité, humidité avec une légère fluctuation des températures), on la nomme la **zone de transition**.
- ✓ Cependant, la **zone la plus profonde** est complètement sombre avec une température constante et une humidité très élevée.

Chapitre1 les grottes

✓ Enfin, la dernière zone est la *zone stagnante*, plus sombre, plus humide et plus riche en CO₂ (Biswas et Biswas, 2017).

La diversité microbienne des grottes attire les microbiologistes car elles contribuent à la biodiversité mondiale et ont des applications pratiques dans divers domaines de la recherche scientifique. Cependant ces microbes sont isolés de différentes zones de la grotte, en particulier dans les milieux sédimentaires et aquatiques par rapport au milieu extérieur (Rangseekaew et Pathom-aree, 2019).



Figure01 : Les stalactites et les stalagmites de la grotte Chaabe (Région de Tagma-Tlmeccen)
(Photo personnelle de Belyagoubi L. (2023).

1.2. Historique de la microbiologie des grottes

Les grottes font l'objet d'études par les amateurs comme par les professionnels depuis de nombreuses années. Des études sur les grottes karstiques ont montré que les murs de pierre, le tartre, les fosses de boue et les sédiments abritent une grande variété de bactéries, d'algues et de champignons. Ils intéressent divers groupes de recherche, notamment des géologues, des chimistes, des écologistes et des microbiologistes. Ainsi que Les adaptations de survie des organismes des cavernes sont complexes et certaines de leurs propriétés ont le potentiel d'être exploitées dans différents aspects de la vie humaine. En outre, les micro-organismes trouvés dans les écosystèmes des grottes, leur rôle dans la formation de cet environnement spécifique et leur potentiel biotechnologique et médical, Certains ont atteint une place plus importante

Chapitre 1 les grottes

dans l'histoire humaine (**Katarzyna. K et al., 2022**). Une première version de ces descriptions de grottes est apparue pour la première fois en 1001 *Amazing Places to See Before You Die*, édité par **Richard Cavendish (2016)**.

Les champignons des cavernes ont été étudiés pour la première fois à la fin du XVII^e siècle ; (**scopoli 1760**) les décrit et est frappé par leur métamorphose : il apparaît sous la forme de plantes rupestres et de coraux marins.

Avant les années 1990, en particulier des années 1940 jusqu'aux années 1960, la recherche en microbiologie des grottes était descriptive et les rôles écologiques et géologiques des micro-organismes ont commencé à émerger (**Patton et Northup, 2007**).

Au début des années 1990, de nouvelles techniques moléculaires ont permis aux microbiologistes de cibler des micro-organismes quelles que soit leur aptitude à la culture et de répondre à de nouvelles questions à l'interface de la microbiologie et de la géologie.

1.3. L'écologie microbienne des grottes

L'écologie microbienne aborde la place et le rôle des micro-organismes dans un habitat (environnement, écosystème) ainsi que les interactions des micro-organismes entre eux, avec leur milieu et/ou avec un hôte (**Noah, 2007**). Ainsi, les micro-organismes des grottes peuvent pénétrer dans les cavités souterraines via l'eau, les flux d'air ou les animaux comme les arthropodes et les humains (**Dupont et al. 2007 ; Barton et Jurado, 2007**).

Les grottes sont historiquement considérées comme des écosystèmes souterrains dispersés. Elles sont considérées comme des environnements oligotrophes et caractérisés par un microclimat spécifique avec une température relativement stable, une humidité élevée et un manque de lumière (**Cuezva et al. 2009**).

En effet, la disponibilité des ressources de surface rocheuse influence la majorité des chances de croissance de la colonisation microbienne (**Gorbishina, 2007 ; Cuezva et al. 2009**). Les micro-organismes construisent des réseaux complexes et mutualistes pour surmonter les obstacles à la croissance. Plusieurs organismes peuvent survivre et croître grâce à cette stratégie dans les conditions extrêmes des grottes. Les parois des grottes et des spéléothèmes sont recouvertes de biofilms épais et variés composés d'algues, de cyanobactéries, de bactéries ou de champignons (**Lefèvre, 1974**). Ils facilitent la circulation des nutriments comme la matière organique à travers la cavité (**Akatova et al. 2007**). Ces micro-organismes jouent également un rôle important dans les processus biogéochimiques (**Lian et al. 2011**). Néanmoins, certaines bactéries préfèrent la compétition à la coopération et produisant des métabolites secondaires qui inhibent la croissance d'autres microorganismes à proximité en

Chapitre1 les grottes

particulier les champignons. Ceux-ci présentent un intérêt particulier pour Les biotechnologistes et les microbiologistes médicaux sont particulièrement intéressés par ces produits en raison de leur potentiel d'utilisation contre les bactéries ou les champignons résistants aux médicaments. tels que les antibiotiques, les sédrophores et les pigments en raison d'un manque d'énergie ainsi que la majorité de la communauté microbienne des grottes est constituée d'actinomycètes ; 65 % sont des actinomycètes dans les grottes indiennes (**Mandal et al ; 2017**) et 80 % dans la grotte de Carlsband au Nouveau-Mexique (**Barton et al. 2007**). **Peck (1986)** a proposé que certains organismes chimiolithotrophes sont des producteurs principaux, obtenant de l'énergie par chimiosynthèse ou par oxydation des composés minéraux des grottes. *Penicillium* et *Aspergillus* sont les deux genres fongiques isolés.

Chapitre 2

Les champignons des grottes

Chapitre1 les champignons des grottes

2.1. Les moisissures des grottes :

Les champignons sont un grand groupe d'organismes trouvés dans les grottes et colonisant une variété de substrats (**Raistrick, 1950**). Ils forment généralement des communautés microbiennes complexes avec d'autres microorganismes. Le plus souvent sont des parasites ou des décomposeurs (**Vanderwolf et al. 2013**). **Murek et al. (2012)**, ont identifié *Penicillium* sp. et *Aspergillus*. Parmi les divers champignons qui recouvrent les surfaces rocheuses ont du groupe *Cladosporium herbarum* de calcaire altéré. Plus de 500 genres de champignons, de moisissures visqueuses ont été signalés dans des grottes du monde entier. Ils appartiennent à divers taxons tels que les Ascomycètes, les Basidiomycètes, les Zygomycètes, les Mycozoaires, les Oomycètes et les Chytridiomycetes (**Vanderwolf et al., 2013**). Les Ascomycètes semblent être le groupe le plus dominant (**Adetutu et al. 2011 ; Gherman et al. 2011**). Les espèces couramment isolées comprennent : *Aspergillus fumigates*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. usustus* et *A. Flavus*, *Fusarium solani*, *Nocardia altamylensis*, *Geotrichum*, *Penicillium chrysogen*, *P. brevicompactum*, *P. simplicissimum*, *Mucor*, *Fusarium solani*, *Mortiera*, *Geomyces pannorm*, *Beauveria Bassiana*, *Cephalotrichum Stemonit*, *Cladosporium herbier*, *Alternaria* ou : *Aureovasidium pullulans*, *Paecilomyces relacinus*, *rhizop* Nous *Stolonifer* et *Cladosporium cladosporioides*. D'autres espèces ont également été trouvées.

-*Beauveria felina* : Cette espèce a été découverte comme parasite de l'insecte (**Langenfeld, et al. 2011**).

- *Quedius mesomelinus* : qui provoque l'obscurité totale dans les Catacombes de Paris. Ce champignon est inclus dans les Deutéromycètes (**Barnett et Barry, 1972**).

- *Hypocrea* : ce genre présente un dimorphisme (**Atkinson ; 1891**), forme dans laquelle les conidies de *Trichoderma* apparaissent le plus fréquemment dans les cavités par rapports aux autres formes. Une espèce du même genre, semblable à *Hypocrea rufa*, avec des conidies formant *Trichoderma viride*, trouvée dans la plupart des mines souterraines. Les basidiomycètes sont plus nombreux que les actinomycètes, parmi lesquels prédominent les espèces poreuses. Parmi ceux-ci, *Polyporus Sulfureus* a été le plus fréquemment répondu. D'après les travaux de Mahhu. Une enquête plus approfondie sur les champignons des cavernes a été effectuée (**Went, 1969**). Des espèces de *Cephalosporium lamellaecola* ont été régulièrement trouvées au bord des stalactites, ainsi que il existe des champignons responsables de la dégradation biologique des peintures rupestres préhistoriques (**Caneva et Savadri, 1988 ; Arroyoo et al. 1997**). En termes d'agents pathogènes, *Histoplasma*

Chapitre1 les champignons des grottes

capsulatum (causant l'histoplasmosse chez les spéléologues) et *Pseudogymnoascus destructans*, anciennement connu sous le nom de *Geomyces destructans* (causant une maladie dévastatrice du nez blanc chez les chauves-souris) sont des exemples importants, mais *Trichosporon spp.*. D'autres pathogènes opportunistes tels que les basidiomycètes et les microspores du gypse (dermatophytes) sont également connus (Jurado et al. 2010 ; Minnis et Lindner, 2013 ; Vanderwolf et al. 2013).

Tableau 1: Les familles des mycètes les plus fréquemment isolées des grottes (Kirk et al .2008 ; Domsch et al. 1980).

Phylum	La famille	Abondance	Ecologie
Ascomycètes	<i>Trichocomaceae</i>	620	Saprophyte, rarement vivant Plantes ou animaux
Zygomycètes	<i>Mucoraceae</i>	148	Saprophyte dans le sol et matières organiques, plusieurs espèces protéolytiques
Ascomycètes	<i>Nectariaceae</i>	106	Saprophytes, mycoparasite et phytoparasite
Ascomycètes	<i>Laboulbeniaceae</i>	105	Entomoparasite
Mycetozoaires	<i>Dictyosteliaceae</i>	87	Phagotrophes sur des bio débris et autres microorganismes
Ascomycètes	Pleosporaceae	86	Saprophyte ou néctotrophe sur les plantes vivantes et mortes
Ascomycètes	Microascaceae	77	Saprophyte sur des matières organiques
Ascomycètes	<i>Hypocreaceae</i>	77	Saprophyte sur matières plantes ou mycoparasite
Ascomycètes	<i>Cordycioitaceae</i>	76	Entomoparasite
Ascomycètes	<i>Chaetomiaceae</i>	72	Saprophyte, la plupart des espèces fortement cellulolytiques
Ascomycètes	<i>Bionectriaceae</i>	70	Saprophyte, mycoparasite ou phytoparasite
Ascomycètes	<i>Davidiellaceae</i>	64	Saprophyte et phyto parasite
Basidiomycètes	<i>Polyporaceae</i>	50	Saprophyte sur bois

Chapitre 1 les champignons des grottes

Ascomycètes	<i>Myxotrichaceae</i>	50	Saprophyte ou mycorhizienne
Ascomycètes	<i>Arthrodermataceae</i>	48	Saprophyte, souvent kératolytique
Zygomycètes	<i>Mortierellaceae</i>	44	Saprophyte, souvent chitinolytique
Ascomycètes	<i>Clavicipitaceae</i>	33	Entomoparasite, phytoparasite ou endomutualiste sur les plantes
Basidiomycètes	<i>Fomitopsidaceae</i>	30	Saprophyte provoquant une coloration brune pourriture du bois
Basidiomycètes	<i>Psathyrellaceae</i>	29	Saprophyte dans le sol, fumier, bois
Basidiomycètes	<i>Mycenaceae</i>	28	Saprophyte sur le bois et la litière vivante

Tableau 02: Fréquences de la diversité fongique dans les grottes
(Vandarwolf et al., 2013).

Phylum	Family	Pourcentage d'isolement (%)
Ascomycètes	<i>Trichocomaceae</i>	27.4
	<i>Pseudeurotiaceae</i>	25.8
	<i>Saccharomycetaceae</i>	3.2
	<i>Clavicipitaceae</i>	3.2
	<i>Hypocreaceae</i>	1.6
	<i>Nectariaceae</i>	1.6
	<i>Cladospiraceae</i>	1.6
	<i>Myxotrichaceae</i>	1.6
	<i>Plectosphaerellaceae</i>	1.6
	<i>Sordariomycetes</i>	1.6
Basidiomycètes	Mrakiaceae	12.9
	Trichosporonaceae	11.3
	Tremellaceae	

Chapitre1 les champignons des grottes

		1.6
Mucoromycetes	<i>Mucoracée</i>	4.8
Basidiomycètes	<i>Trichosporonaceae</i>	42.9
	<i>Trichocomaceae</i>	28.6
	<i>Chaetomiaceae</i>	14.3
	<i>Torulaceae</i>	14.3
	<i>Trichocomaceae</i>	32.3
	<i>Saccharomycetaceae</i>	29.0
	<i>Pseudorotiaceae</i>	9.7
Ascomycètes	<i>Cladosporiaceae</i>	6.5
	<i>Didymellaceae</i>	3.2
	<i>Nectariaceae</i>	3.2
	<i>Incertae sedis</i>	3.2
	<i>Microascaceae</i>	3.2
	<i>Mrakiaceae</i>	3.2
Basidiomycètes	<i>Trichosporonaceae</i>	6.5
		3.2

2.2. Les métabolites produits par les moisissures des grottes

La production de métabolites par les champignons a commencé à attirer l'attention dans la première moitié du siècle dernier (**Raistruck, 1950**) et a acquis une importance particulière après la découverte de la pénicilline, un métabolite produit par le champignon *Penicillium*, qui a lancé l'ère des antibiotiques (**Bennett , 2001**).

Chapitre1 les champignons des grottes

Beaucoup de mycètes des grottes peuvent produire des composés appelés métabolites secondaires (**Deman et Fang, 2000**), qui sont habituellement secrétés sous forme de mélange qui présente une structure chimique unique (**Boiron, 1996**).

En outre, plusieurs chercheurs ont démontré que ces moisissures produisent une variété de substances complexes économiquement cruciales, telles que des acides organiques, des alcaloïdes, des antibiotiques, des terpènes et des enzymes (**Sheikh, 2010 ; Mehravar et Sardari, 2011 ; Pereira et al. 2013**).

Les souches les plus importantes et leurs principaux métabolites, avec leurs types d'activité sont résumés dans (**le Tableau 03**).

Tableau 03 : Les différents métabolites secondaires produits par des champignons des grottes (**Jiang and Zhiqiang 2000**).

Souche	Métabolite	Activité
<i>Penicillium griseofulvina</i>	griséofulvine	Antifongique
<i>Aspergillus nidulans</i> <i>Aspergillus pachycristatus</i>	Echinocandines e b	Antifongique
<i>Trichoderma viride</i>	Lova statine	Anti-hypercholestérolémiant
<i>Penicillium citrinum</i> ,	Compactine	Antibiotique
<i>Isaria sinclarii</i>	Myriocine (ISP-1)	Immunosuppresseur
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline	Antimicrobien
<i>Fusarium spp , equiseti</i>	A zearalanol	Mycotoxine
<i>Penicillium brefeldianum</i>	Mizoribine nucléoside imidazole	Immunosuppresseur
<i>Acremonium chrysogenum</i>	Cephasporine c	Antibiotique de référence

Chapitre 3

Les Champignons

Chapitre 3 Les champignons

1. Généralités sur les champignons

Historiquement, les champignons ont longtemps été considérés comme faisant partie du règne végétal car ils ressemblent aux plantes en ce sens qu'ils ont des parois cellulaires spécifiques, sont immobiles et se reproduisent au moyen de spores (spores grecques : graines, spores). (, 2015). Les champignons sont des organismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires, hétérotrophes (nécessitant des sources de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquitaires. Le terme champignons inclut largement les champignons filamenteux (myxomycètes, ascomycètes et champignons du deutérium) (Reboux et al. 2010). Ils ne peuvent être vus qu'au microscope, sont omniprésents et se comptent en milliers d'espèces. Ce sont des saprophytes, qui servent à décomposer les organismes morts et parfois vivants (Bush et Prochnau, 2004). Les champignons ont généralement un aspect macroscopique. Sur les substrats colonisés, il se présente sous la forme d'une texture duveteuse, poudreuse et duveteuse (Deleu et al. 1999). On peut distinguer deux grands types de champignons.

- *Moisissures utiles*: utilisées dans l'industrie pour conférer aux produits des propriétés sensorielles et de traitement supérieures, telles que *Penicillium camemberti* et *Penicillium roqueforti* dans la production de fromage, et *Penicillium jensenii* ou nalgioyense dans la salaison (Sarah, 2011).

- *Moisissures nuisibles* : peuvent se développer sur une variété de substrats et altérer la qualité nutritionnelle et diététique des aliments. Ainsi, le développement incontrôlé de microchampignons serait responsable de 5 à 10 % des pertes de récoltes mondiales (Filtenborg et al. 1996).

2. Ecologie des champignons

Les champignons filamenteux ont développé un large éventail d'adaptations et se trouvent dans pratiquement tous les environnements du monde. Les plus courants sont *Penicillium* et *Aspergillus*. On les trouve dans toutes les conditions climatiques et toutes les latitudes (Florent, 1993). Certaines espèces sont adaptées à la sécheresse, tandis que d'autres vivent dans l'eau (eau douce ou eaux usées). Certains tolèrent bien une pression osmotique élevée

Chapitre 3 Les champignons

(par exemple dans des environnements très salés ou très sucrés) et peuvent contaminer les charcuteries, le miel ou les confitures. Les champignons thermophiles se trouvent dans le compost (70–75°C), mais les champignons se trouvent également dans la toundra arctique. En haute altitude, les hygroses printanières sont collectées lors de la fonte des neiges (2 °C). Certains champignons (*Sporotrichucarnis*) peuvent encore se développer dans les entrepôts frigorifiques et abîmer la viande conservée à -5°C. Dans des conditions défavorables (froid ou chaleur extrême, manque d'eau) ce sont certaines spores qui constituent une forme de résistance (le mycélium se forme et peut se reproduire des décennies plus tard). Avec ce mode d'alimentation, les champignons peuvent pousser dans l'obscurité totale (grotte), contrairement aux autres plantes. Ils peuvent également vivre sous terre jusqu'à 3200 m de profondeur (Locquin, 1984).

3. Propriétés principales des Champignons

Tableau 04: Principales propriétés des Champignons (Delarras, 2007).

Formes	<ul style="list-style-type: none">- Structure filamenteuse, hyphes ou filaments à paroi souvent composées de chitine, septes ou phones- Espèces dimorphiques avec une forme levure qui se multiplie par bourgeonnement ou scissiparité
Croissance des hyphes	croissance strictement apicale, puis ramification de l'hyphe conduisant à la formation d'un mycélium ou thalle
Métabolisme générale	<ul style="list-style-type: none">- Chimiohétérotrophes- Source de carbone et d'énergie : molécules carbonés organiques- Suivant les espèces, peuvent lyser les polymères complexes grâce à des enzymes extracellulaires : cellulose, amidon, pectines, mais aussi des protéines et des lipides
Mode de reproduction	Sexuée ou asexuée par l'intermédiaire des spores
Habitats naturels et autres	<ul style="list-style-type: none">- Air, eaux, sols ...vivent en saprophytes ou parasites- Champignons pathogène pour l'homme- Matières premières alimentaires, aliment... pouvant être contaminés par des moisissures toxigènes

4. Identification des champignons

L'identification des nombreuses espèces de champignons capables de coloniser les grottes est une étape très importante. En effet, toutes les espèces n'ont pas les mêmes caractéristiques

Chapitre 3 Les champignons

physiologiques ou exigences, et l'identification peut fournir des informations précieuses sur la source de contamination et permettre un traitement approprié. Cette identification s'est longtemps basée sur la seule observation des caractéristiques culturelles et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont fourni des aides à l'identification. (Massih, 2007). Cependant, la complexité du règne fongique fait qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas complètement remplacer l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification. (Tabuc, 2007).

4.1. Identification morphologique

L'identification des genres fongiques est basée sur des critères morphologiques :

- *Aspect macroscopique* du mycélium (forme, couleur, relief, taille et odeur des colonies,).
- *Aspect macroscopique* des structures de reproduction (thalle, spores, forme des spores, méthode de formation des conidies, méthode de regroupement des conidies, méthode d'implantation des cellules formant des conidiopores, présence de structures protectrices résultant de la reproduction asexuée ou sexuée, présence des chlamydo-spores) .

4.2. Identification génétique

De nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) qui ne nécessitent obligatoirement un examen morphologique (Hinrikson et al, 2005).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (Hinrikson et al, 2005).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt.

En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de mortalité, particulièrement chez les immun déficients (Aguire et al, 2004).

Chapitre 3 Les champignons

5. Le genre *Penicillium*

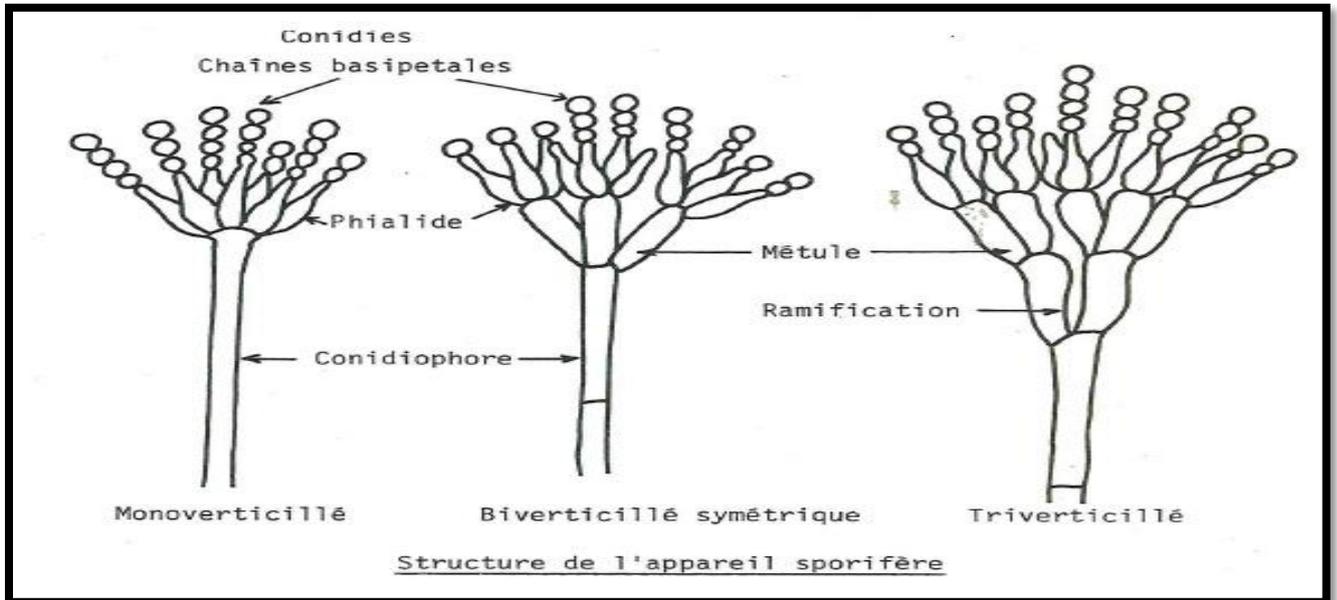


Figure 02 : Structure du *Penicillium* (Botton et al. 1990).

Penicillium est un champignon filamenteux imparfait du phylum *Ascomycota*. Il est largement distribué dans l'environnement et génétiquement identifiable par ses gènes *benA*, *CaM* et *RPB2* (Visagie et al. 2014).

Les organes reproducteurs de *Penicillium* sont en forme de brosse. Et ce dernier peut appliquer différentes formes d'organisation en fonction de la quantité de ramification entre les spores et les conidies. Les spores se ramifient en formes très simples ou en formes complexes avec plusieurs niveaux de ramification. Dans ces cas, nous avons des modèles globaux symétriques ou asymétriques (Yadav et al. 2018). Les crayons monverticillés (pinceau) ont une seule hélice se terminant par des phialides.

D'autre part, les pécicils biverticillés possèdent des phialides et des métules, ces dernières pouvant être de longueurs différentes, avec des degrés de divergence variables. Ils sont plus ou moins cylindriques. D'autre part, le terverticillate pécicillé a un degré supplémentaire de ramification entre le sporophyte et les métules. Il existe également des *Penicilliums* qui produisent des pécicils quaterverticillés (quadriverticillés) avec un degré de ramification différent de celui de l'échantillon terverticillé (Figure 2).

Chapitre 3 Les champignons

En général, les pinceaux terverticillés et quaterverticillés sont nettement asymétriques (Athana et Kumar, 2018).

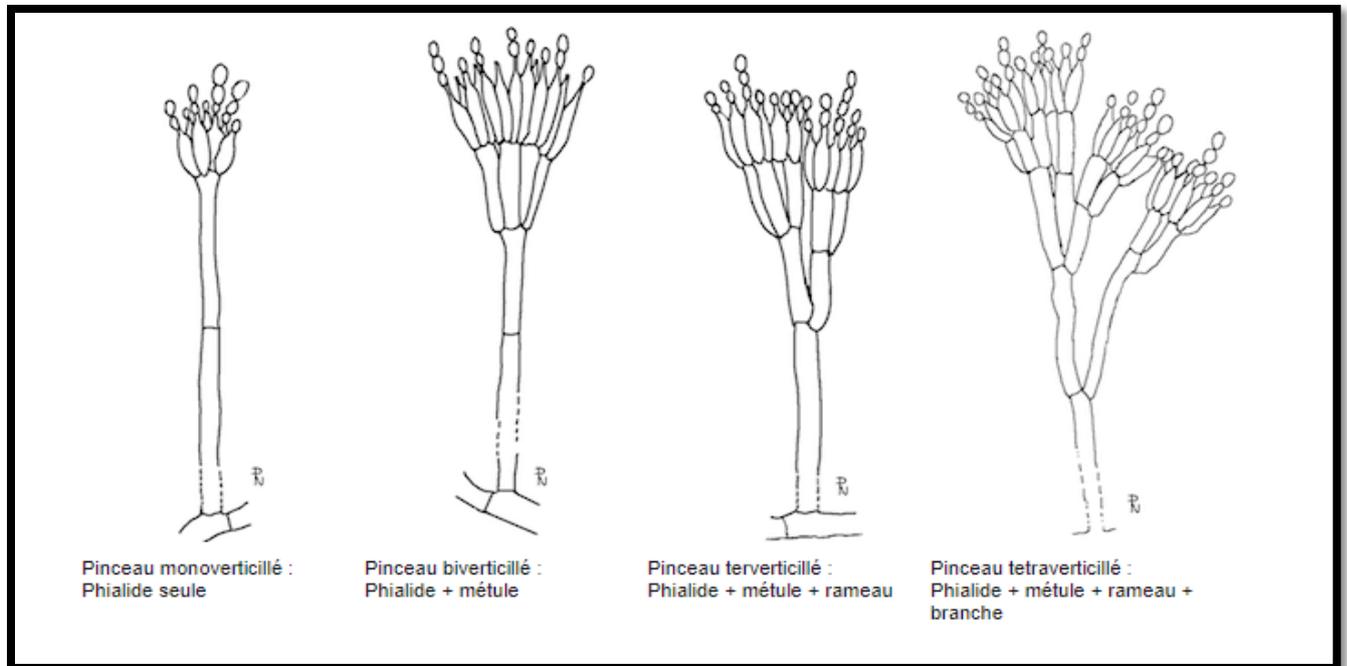


Figure 03 :Les types de pénicilles (Botton et al.1990).

6. Genre *Aspergillus* :

Le nom *Aspergillus* est donné au genre Deuteromycota (Deuteromycota), qui comprend environ 180 espèces et appartient au phylum Ascomycota (Caillaud et al. 2006).

Aspergillus est un genre connu pour produire des mycotoxines. De plus, de nombreuses espèces sont utilisées en biotechnologie pour produire divers métabolites tels que des antibiotiques, des acides organiques, des médicaments et des enzymes (Samson et al. 2014).

Aspergillus se développe rapidement sur des milieux conventionnels (Sabouraud) additionnés d'antibiotiques. Après 48 heures d'incubation, on observe des colonies plates constituées de courts filaments aériens blancs. Après 96 heures de culture, les colonies acquièrent une coloration caractéristique marron, verte, jaune ou noire selon les espèces (Badillet et al. 1987 ; Moen, 1994).

Chapitre 3 Les champignons

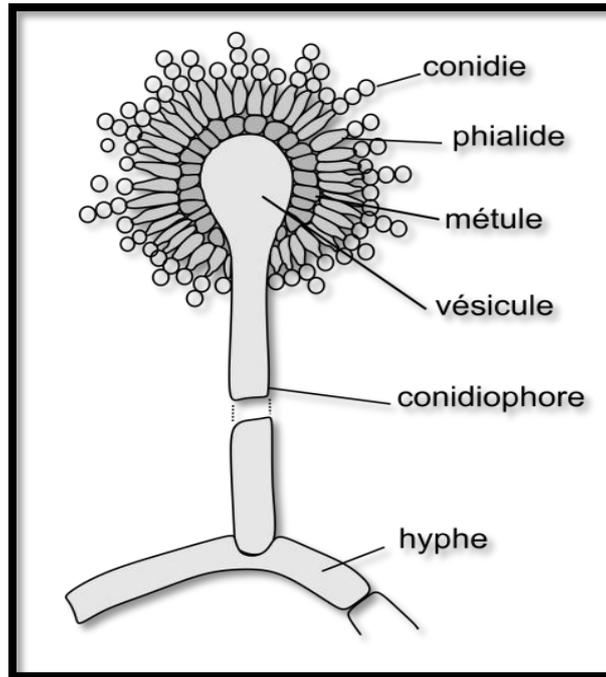


Figure 04: Caractères morphologiques des *Aspergillus* (Caillaud *et al.*, 2006).

6. Métabolites secondaires

Les champignons filamenteux ont la remarquable capacité de se développer sur des substrats divers et relativement simples, dont ils parviennent à utiliser les éléments constitutifs comme nutriments. Au cours du développement, ils produisent également des métabolites secondaires. Ces molécules sont synthétisées en réponse à différents types de signaux environnementaux (abiotiques et biotiques) (Sadrati, 2021 ; Liu *et al.* 2019 ; Richard, 2008).

Les produits du métabolisme "secondaire" qui ne sont pas nécessaires à l'activité cellulaire sont stockés dans la région paraapicale. Les métabolites secondaires les plus connus sont les pigments, les antibiotiques et les mycotoxines (Roquebert, 1997).

Les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

Chapitre 3 Les champignons

1. Métabolites activateurs de spores (acide linoléique et ses dérivés produits par *Aspergillus nidulans* (Champ et al. 1987; Champ et El-Zayat, 1989; Mazur et al. 1991 ; Calvo et al. 2001).
2. Pigment nécessaire (mélanine) pour la formation de spores sexuées et asexuées (Kawamura et al. 1999).
3. Métabolites de toxines sécrétés par les colonies lors de la biosynthèse approximative des spores (biosynthèse des mycotoxines) (Trail et al. 1994 ; Hapwood, 1988 ; Alspaugh et al. 1997).

7. Mycotoxines :

Les mycotoxines sont des composés produits par divers champignons (Hendry et Cole, 1993) qui peuvent être bénéfiques pour l'homme grâce à leur utilisation comme antibiotiques (pénicillines) et immunosuppresseurs (cyclosporine) (Ruth et al. 2002).

8. Antibiotiques

D'après l'étymologie du mot « antimicrobien » (du grec anti : contre, mikros : petit et bios : vie), un composé de ce type est défini comme toute substance résistante à la vie microbienne. L'adjectif antibiotique (du grec anti : contre, biotikos : lié à la vie) a été utilisé pour la première fois en 1889, pour désigner une substance synthétisée par un organisme pour en détruire un autre, sera précisé plus loin, comme un produit chimique produit par un micro-organisme. et dans des solutions diluées ont la capacité d'inhiber sélectivement la croissance ou même de tuer d'autres micro-organismes (Muylaert et Mainil., 2012).

Les antibiotiques sont des substances naturelles ou synthétiques qui sont sélectivement toxiques et ont la capacité d'inhiber la croissance bactérienne ou de tuer les bactéries. On parlera de bactériostatique dans le premier cas et de bactéricide dans le second. Un antibiotique peut avoir une activité bactériostatique à faible dose et une activité bactéricide à forte dose (Jason, 2017).

Sur un total d'environ 10 700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1 600 proviennent de champignons (Botton et al., 1990). Les antibiotiques sont d'origine bactérienne (*Bacillus brevis* ou *Pseudomonas pyocyanae*), ou d'origine fongique

Chapitre 3 Les champignons

(*Actinomyces*, *Aspergillus*, *Penicillium*). Pour la plupart, ils sont produits par des moisissures ou des micro-organismes vivant dans le sol (Vachel et février 1952).

Tableau 05: Mycètes productrices d'antibiotiques (Larpant Larpant-Gourguand, 1996).

Organismes productrices	Antibiotiques
<i>Aspergillus flavus</i>	Acide aspergillique
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Fumagilline
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Sephalosporine
<i>Cephalosporium caeruleus</i>	Cérulinine
<i>Fusidium coccineum</i>	Acide fusidique
<i>Paecilomyces variotti</i>	Variotine
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Pénicilline

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

9. Classification des champignons

Les champignons sont divisés en quatre groupes (embranchements) basés sur différents modes de reproduction sexuée : Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota et Chytridiomycota (Evert et al. 2007).

Chapitre 3 Les champignons

-Les zygomycota produisent de zygospores dans des zygosporanges, sont sans flagelles (**Yajuanet al. 2006**).

-Les Ascomycota produisent des ascospores dans des asques.

-Les Basidiomycota, les basidiospores sont produites sur des basides.

-Les Chytridiomycota : produisent des cellules mobiles flagellées sont un groupe principalement aquatique c'est le seul groupe de champignons possède des cellules ductrices (zoospores et gamète) mobiles (**Evert et al. 2007**).

-Deuteromycota : ou champignons anamorphes (= champignons imparfaits = champignons conidiens = champignons mitosporiques) avec un système d'identification particulier essentiellement basé sur le mode de formation des spores, appelées conidies (**Caillaud et al. 2006**).

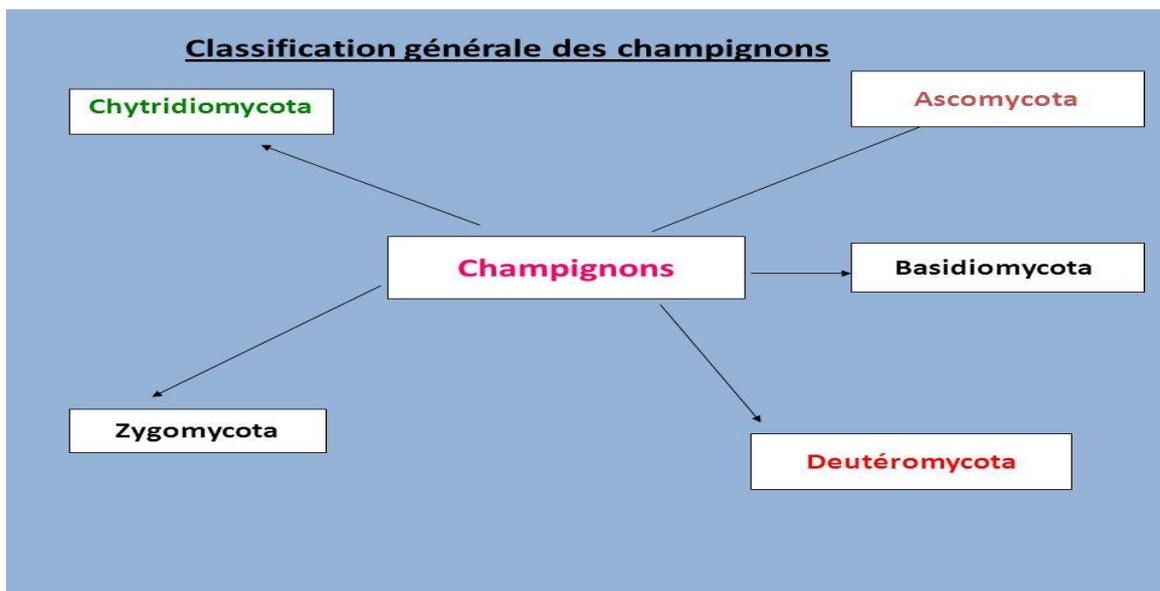


Figure 05: Classification générale des champignons (**Chabasse,2001**).

Chapitre 3 Les champignons

Chapitre 04

Les Microorganismes tests

1. *Pseudomonas aeruginosa*

Les pseudomonas sont des bactéries Gram-négatives, strictement aérobies, généralement mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires. La plupart sont saprophytes et se trouvent dans l'eau, le sol et les plantes.

Pseudomonas aeruginosa ou bacilles pyocyanine sont particulièrement préoccupants dans les services de soins intensifs hospitaliers, la chirurgie, l'urologie ou la prématurité (**Leyral et al. 1998**).



Figure 06 : *P. aeruginosa* fixées sur du verre, par microscopie à balayage électronique. (**Deligianni et al. 2010**).

2. *Escherichia coli* :

Escherichia coli forment un groupe de bactéries Gram-négatives mobiles ou immobiles appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Ils peuvent pousser à des températures comprises entre 4°C et 46°C, avec une croissance optimale à 37°C et un pH entre 4,6 et 9,5 (**Brisabois et al., 1997**). *E. coli* est l'hôte normal dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Il s'agit de coliformes fécaux et c'est un indicateur de contamination fécale de l'eau et des aliments. Les souches d'*Escherichia. coli* responsables des infections humaines diffèrent de celles qui représentent l'espèce dominante dans la flore intestinale aérobie des adultes et des enfants (**Mihaila et al., 2003**).

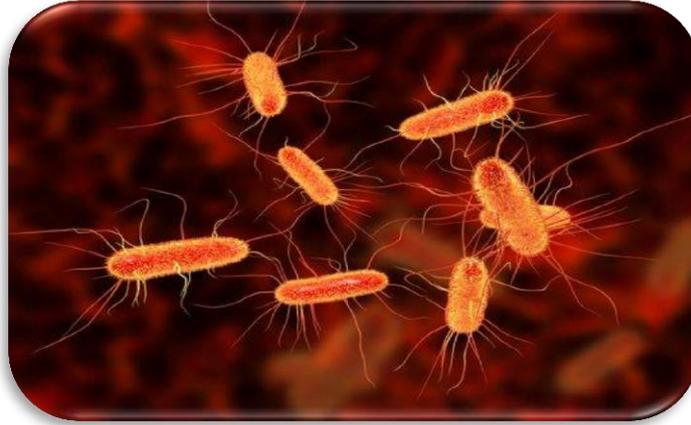


Figure 07 : Vue au microscope électronique à balayage d'une culture pure d'*Escherichia coli* (Facon et Desforges, 2021).

3. *Klebsiella pneumoniae*

Se trouve couramment dans le sol, les eaux de surface ou les eaux usées et les plantes. *Klebsiella pneumoniae* est une bactérie à Gram négatif caractérisée par une morphologie de bacille aérobic-anaérobic immobilisé (Abbott, 2007). Fermentation avec non sporulant, uréase positive, nitrate réductase positive, oxydase négative et glucose avec production de gaz. On le trouve régulièrement dans le tractus gastro-intestinal des humains et des animaux et il est plus pathogène (Larpent et al. 2002).



Figure 08: *Klebsiella pneumoniae* vue au microscope électronique à balayage (ClaireXavier, 2010).

4. *Staphylococcus aureus*

Chapitre 4 Les microorganismes test

Les staphylocoques sont des coques à Gram positif, groupés en amas, aéro anaerobies. Ils se développent volontiers dans les milieux légèrement sucrés ou salés. *Staphylococcus aureus*, également connu sous le nom de *Staphylococcus aureus*, est l'espèce la plus redoutée, provoquant des infections cutanées pyogènes et des infections nosocomiales graves. Les souches entérotoxiques de *Staphylococcus aureus* provoquent des intoxications alimentaires (Leyral et al., 1998).



Figure 09 : *Staphylococcus aureus* observé en microscopie électronique à balayage (Guadagnini , 2011).

5. *Bacillus subtilis*

C'est une bactérie à gram positive et sa forme cellulaire est constituée de bâtonnets droits aux extrémités arrondies. *Bacillus subtilis* est une bactérie résistante présente dans le sol. On le trouve dans les aliments contaminés. *Bacillus subtilis* peut provoquer une intoxication alimentaire une fois ingéré. Dans l'industrie alimentaire, *Bacillus subtilis* est utilisé pour produire des enzymes de type amylase utilisées dans la panification. Cette bactérie est également utilisée dans les formulations détergentes. En pharmacie, *Bacillus subtilis* est utilisé en antibiothérapie (Bornert, 2000).



Figure 10 : *B. subtilis* observé en microscopie électronique à balayage (Carballido-López).

6. *Enterococcus faecalis*

Enterococcus faecalis est une bactérie à Gram positif, anaérobie facultative du groupe bêta-hémolytique. Elle peut être très difficile à éradiquer, car elle peut survivre à un manque de nutriments, former un biofilm, résister aux antibiotiques et survivre à la présence d'un médicament intracanalair comme l'hydroxyde de calcium. C'est pourquoi *Enterococcus faecalis* représente un défi de taille pour les chercheurs et les cliniciens. Il est présent dans 24 à 77% des infections endodontiques persistantes.



Chapitre 4 Les microorganismes test

Figure 11 : *Enterococcus faecalis*, visualisée par microscope électronique à balayage, extraite de (Kristich et al. 2007).

7. *Candida albicans*

C'est un champignon commensal de la peau et des muqueuses, présent dans la flore gastro-intestinale et vaginale dans des conditions physiologiques et rarement retrouvé dans des niches environnementales telles que le sol. *Candida.albicans* est une levure non pigmentée et non encapsulée avec des bourgeons multilatéraux ronds ou ovales de 2 à 4 μm qui peuvent se développer dans des morphologies filamenteuses ou pseudofilamenteuses. En culture, des colonies crémeuses et blanchâtres apparaissent en 24 à 48 heures (Chardin et al. 2006).

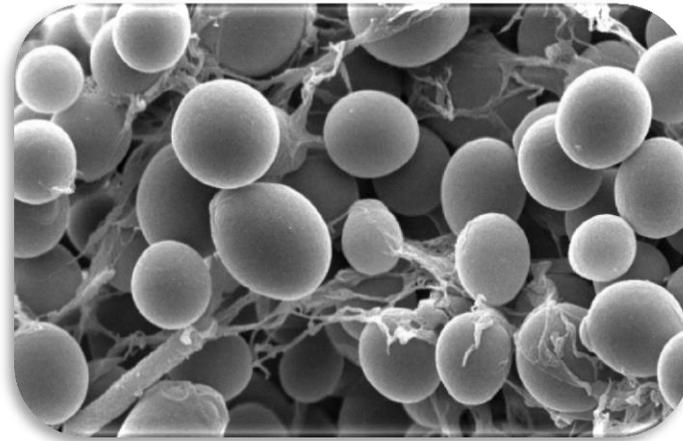


Figure 12 : *Candida albicans*, vue en microscopie électronique à balayage (Arbeille et Lebos, 2002).



Matériel et Méthodes

1. Lieu d'étude



Figure 13: Photos Du Ksard'Ighzer

Ighzer (commune d'Ouled Said) se trouve à 22 Km au nord de Timimoun. Ses voisins sont Ksar Kaddour au nord, Timimoun au sud, Ouled Said à l'ouest et Tinerkouk à l'est. Le nom Ighzer est dérivé du nom berbère Ghazir qui désigne Oued. Les traces de l'oued qui a doté son nom au Ksar sont encore perceptibles pour l'instant (**Bouzada, 2019**).

La grotte mystérieuse

La grotte naturelle s'abaisse de 80 m dans le grès tendre appelé « Tafza ». Large de 8 m et haute de 7 m en tête, elle se diminue au fur et à mesure que l'on y pénètre pour se terminer en forme de boyau. Fraîche en été et tiède en hiver, la grotte constitue un refuge approuvable contre les rigueurs climatiques (**Bouzada, 2019**).

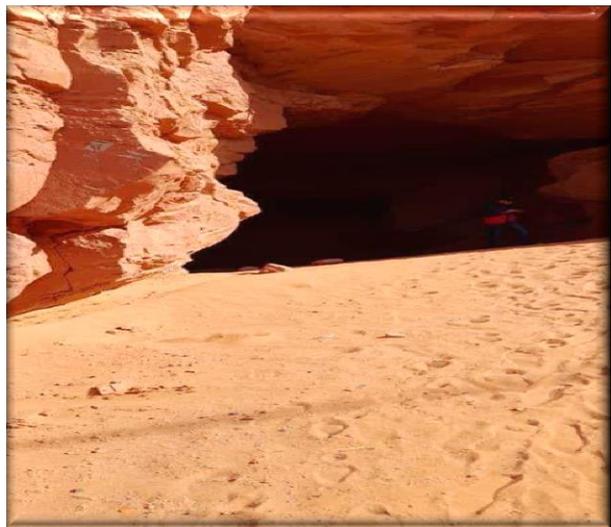


Figure 14: Photos d'entrée de la grotte

2. Échantillonnage

Les prélèvements ont été pris à partir des sédiments et des roches, effectués le mois 19 et 26 février 2023 à partir de la grotte d'Ighzer – Timimoun de la wilaya d'Adrar (**Figure 15**). Ceux du sol ont été réalisés à l'aide d'une spatule stérile dans un flacon stérile et ceux des roches de la grotte recouvert par des moisissures par un frottement à la surface via l'usage des écouvillons stériles, ces échantillons ont été conservés à 4 °C au laboratoire.

Tableau 06 : Situation géographique de la station d'échantillonnage.

Région	Altitude (mètres)	Latitude (N)	Humidité	Etage bioclimatique
Timimoune	80 mètre	34° - 46 °	9% - 78 %	Semi-aride



Figure 15 : Carte géographique montre la situation de la grotte d'ighezar ([www. Google earth.com](http://www.google.com))



(C)



(B)



(A)

Figure 16 : Zone d'échantillonnage. [A] : vue de l'extérieur de la grotte; [B] : Entrée de la grotte ; [C] : vue de l'intérieure de la grotte (Photos personnelles, 2023).



(A)



(B)



(C)

Figure 17 : Prélèvements effectués par l'écouvillonnage ([A] : Les écouvillons ; [B]: Zone d'écouvillonnage à partir des sédiments [C] : Roche sédimentaire).

3. pH du sable

20 g de sol sec de chaque échantillon ont été homogénéisés avec 50 ml d'eau distillée. Ce mélange doit être agité pendant 2 minutes avec un agitateur magnétique. (**Institut de recherche en génie agricole, 1973**). Le pH-mètre (**Z OHAUS**) est utilisé en insérant l'électrode directement dans chaque échantillon et en répétant cette opération trois fois.

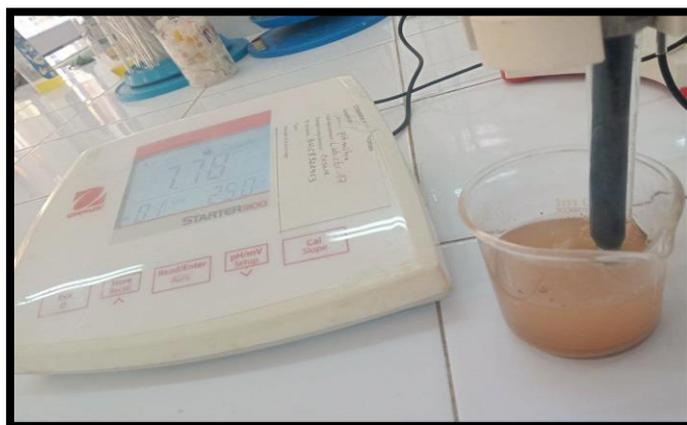
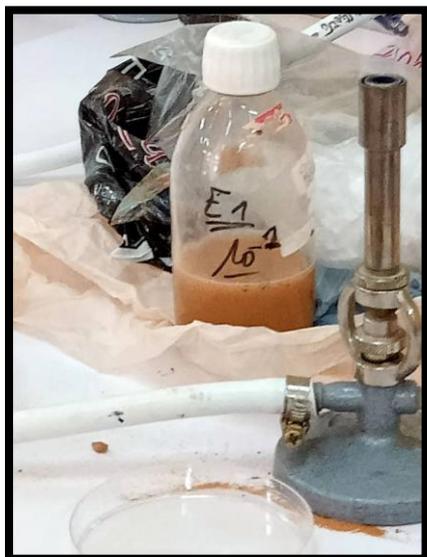


Figure 18: Mesure du pH du sable.

3. Isolement des Moisissures

L'ensemencement des milieux d'isolement, se fait par la méthode de dilution en suspension. 10 g de sol sont mis en suspension dans 90 mL d'eau physiologique stérile ($\text{NaCl } 9 \text{ g.L}^{-1}$), correspondant à une dilution à 10^{-1} . Après homogénéisation au vortex, on réalise des dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} dans de l'eau physiologique stérile et on étale 1000 μL de chaque dilution sur la surface du milieu (PDA ac, PDAr, MEA). Les boîtes sont ensuite incubées à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 5-7 jours. Les colonies sont repiquées sur le milieu PDAac et purifiées.



(1)



(2)

Figure 19: Préparation des dilutions des échantillons de la grotte.

4. Identification des moisissures

4.1. Macromorphologie et caractères cultureux

L'identification des espèces fongiques est basée sur l'analyse de critères de culture (température et taux de croissance, environnement favorable) et morphologiques.

Ce dernier est constitué de paramètres macroscopiques (aspect de la colonie, couleur, forme et pigmentation).

4.2. Observation microscopique

L'identification microscopique a été réalisée en cultivant des moisissures sur des lames selon la méthode Scotch (**Barnett et Hunter, 1972**) ou des petits carrés de PDAac, en laissant refroidir ces moisissures (Figure 18), en recouvrant de lamelles, puis en retirant ces moisissures. microculture produite par l'une ou l'autre méthode. . Placez-les dans une pièce stérile et humide et incubez à 25°C pendant 3 à 5 jours. Après incubation, examinez les lames à un grossissement de 10x, 40x et 100x.

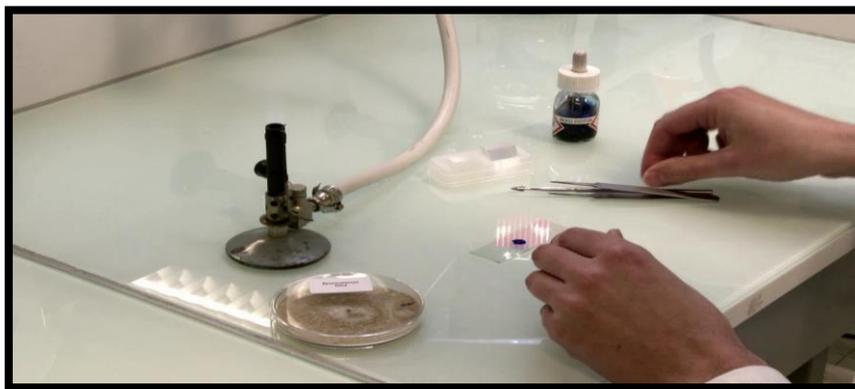


Figure 20 :Méthode de Scotch.

5. Test d'activité antimicrobienne

On a utilisé les souches de références qui sont mentionnées dans **le tableau 07** Pour la réalisation des tests de l'activité antimicrobienne.

Tableau 07:Souches de référence utilisée dans les différents tests d'évaluation de l'activité antimicrobienne.

Microorganismes	Gram	Code	Laboratoire de conservation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négative	ATCC 27853	LVR
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 25922	LVR
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 700603	LAMAABE
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positive	ATCC 25923	LVR
<i>Bacillus subtilis</i>		ATCC 6633	LAMAABE
<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212	LVR
<i>Candida albicans</i>	Levure	ATCC 10231	LAPSAB

LVR : Laboratoire vétérinaire régional de Tlemcen ; **LAMAABE** : Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agroalimentaire au Biomédical et à l'Environnement ;

LAPSAB : Laboratoire Antibiotiques Antifongiques : Physico-chimie Synthèse et Activité Biologique.

6. Criblage par la technique des cylindres d'agar

Des disques des antibiotiques ont été utilisés comme des molécules de référence: Antibactériens (**Amoxicilline (25 µg)** (bio-Rad), **Colistine (10 µg)** (bio-Rad), **Ampicilline(10 µg)**(biocare))et antifongique (la **Nystatine (100 µg)** (Sigma)) (**Belyagoubi, 2014**).

6.1. Test d'activité antibactérienne :

Les isolats des moisissures sont ensemencés en strie serré à la surface du milieu PDA et incubés à la température de 25 °C pendant environ 7 jours. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries tests. Les boites de Pétri sont ensuite placées à 4 °C pendant 02 heures pour permettre une diffusion des substances (**Kitouni, 2007**) et après elles sont incubées à la température de 37 °C pendant 24 heures. Les zones d'inhibition formée autour des cylindres sont alors mesurées (**Belyagoubi et al., 2018**).

6.2. Test d'activité antifongique :

La même démarche suivie dans le test d'activité antibactérienne, est appliquée pour *Candida albicans* sauf que la pré-culture est réalisée sur bouillon Sabouraud et la gélose est celle de Sabouraud au lieu de Muller-Hinton, et l'incubation des levures se fait 24-48 heures à 37°C.

(1)



(2)



(3)



(4)



Figure 21 : Antibiotiques testés : (1) : Ampicilline (10 μg), (2) : Amoxicilline (25 μg), (3) : colistine (10 μg), (4) : La nystatine (100 μg).

Remarque : Pour chaque microorganisme-test, un inoculum a été réalisé via d'une culture de 24 heures, mis en suspension dans le milieu Muller-Hinton stérile pour obtenir une densité optique entre 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm (Normes CLSI, 2020; Normes CLSI, 2021).

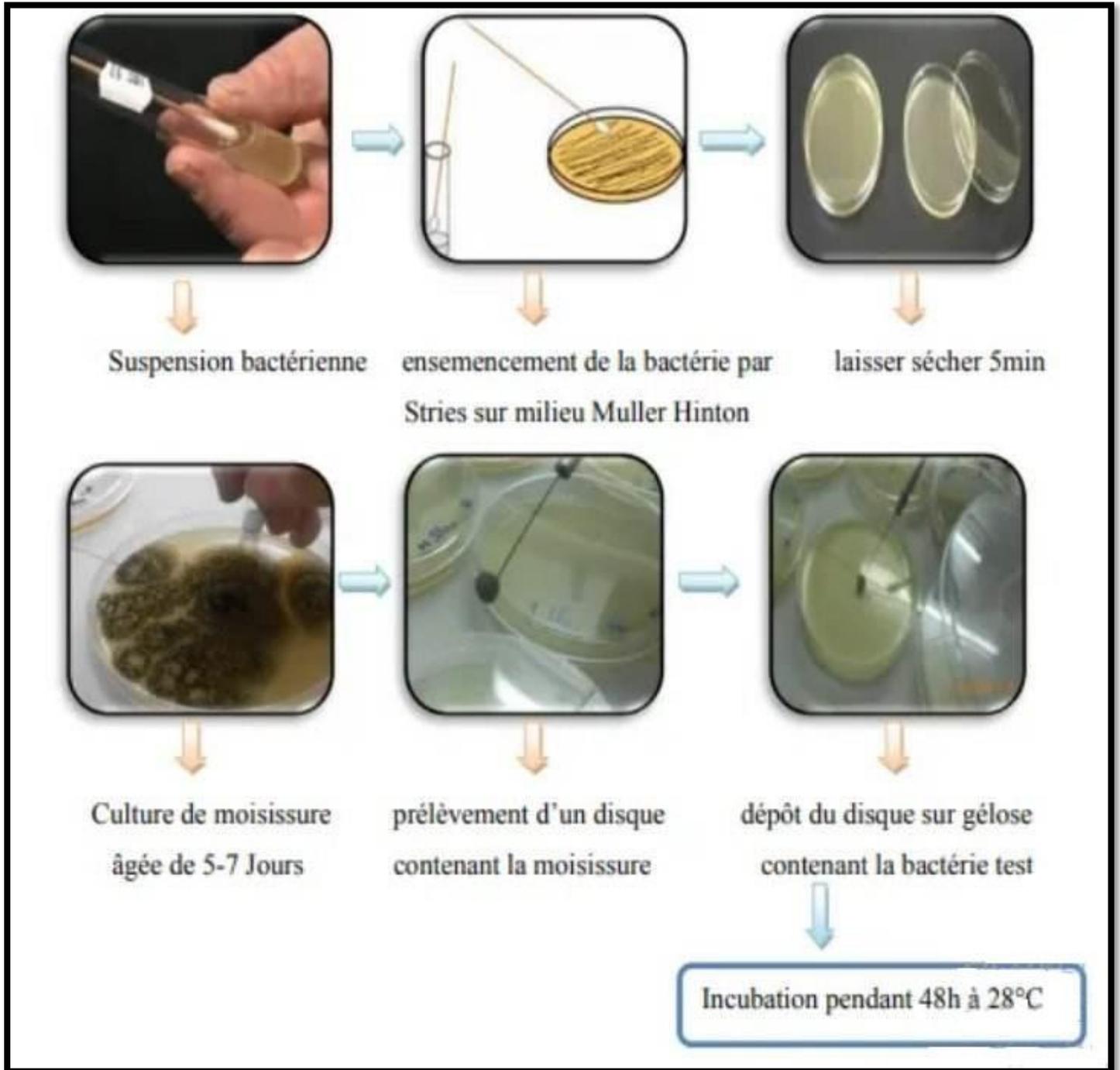


Figure 22 : Test de l'activité antibactérienne par la Technique de cylindres d'agar.

6.2. Criblage par la technique des puits

La culture des champignons en milieu liquide a été réalisée sur bouillon PDAac. (Bosco, 2016), incubation à 25°C pendant 14 jours. Préparer les bactéries d'essai dans une boîte de

Matériel et Méthodes

Petri avec une couche de gélose Mueller-Hinton. Après 5 minutes de séchage, des puits de 5 mm sont creusés au cutter. Les puits sont ensuite recouverts de gélose Mueller-Hinton. Les puits préparés sont prêts à recevoir 50 µl de filtrat. La boîte est ensuite laissée à température ambiante pendant 30 minutes puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures.



Figure 23 : Culture de *Penicillium* sur milieu liquide [A] et Filtration du milieu liquide [B].

Résultats et Discussion

1. Le pH du sable

Le Tableau 8 résume le pH des échantillons du sable de la grotte. Le pH joue un rôle important dans la production de métabolites secondaires par divers champignons (**Dumenil et Sanglier, 1989**). De petits changements de pH peuvent avoir des effets spécifiques sur la productivité des souches (**Hata et al., 1971**).

La composition chimique de sable saharien est très simple : plus de 95 % de silice, de 1 à 2 % de calcaire et des traces de différents oxydes. Du fait de cette constitution, le sable a une couleur blanche légèrement jaune et ocre, il se dessèche et perd facilement sa cohésion en surface (**Ben Dhia, 1998**). Le sol sableux est un sol léger qui ne retient pas beaucoup d'eau (**Gnagné et al, 2007**).

Tableau 08 : pH des échantillons de la grotte.

Echantillon	pH
pH de sable	7.81± 0.042

2. Les champignons

2.1. Isolement des moisissures

14 souches de moisissures ont été isolées à partir des sédiments et des roches. La purification a été effectuée en repiquant la souche sur le milieu PDAac jusqu'à l'obtention d'une souche pure (**Figure 24**).

Résultats et Discussion

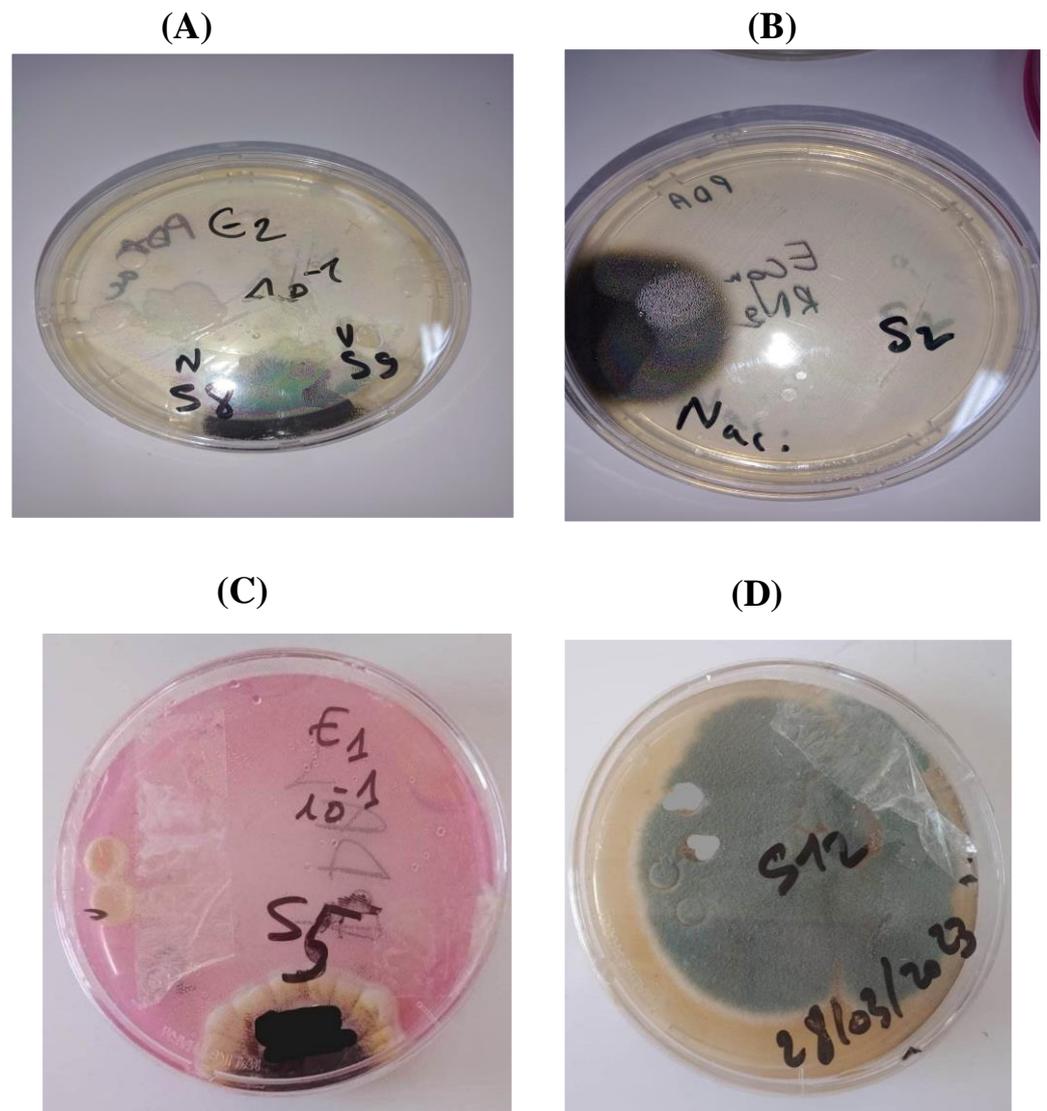


Figure 24 : Photos des isolements des champignons du sol de la grotte sur les milieux PDAc et PDA.

Résultats et Discussion

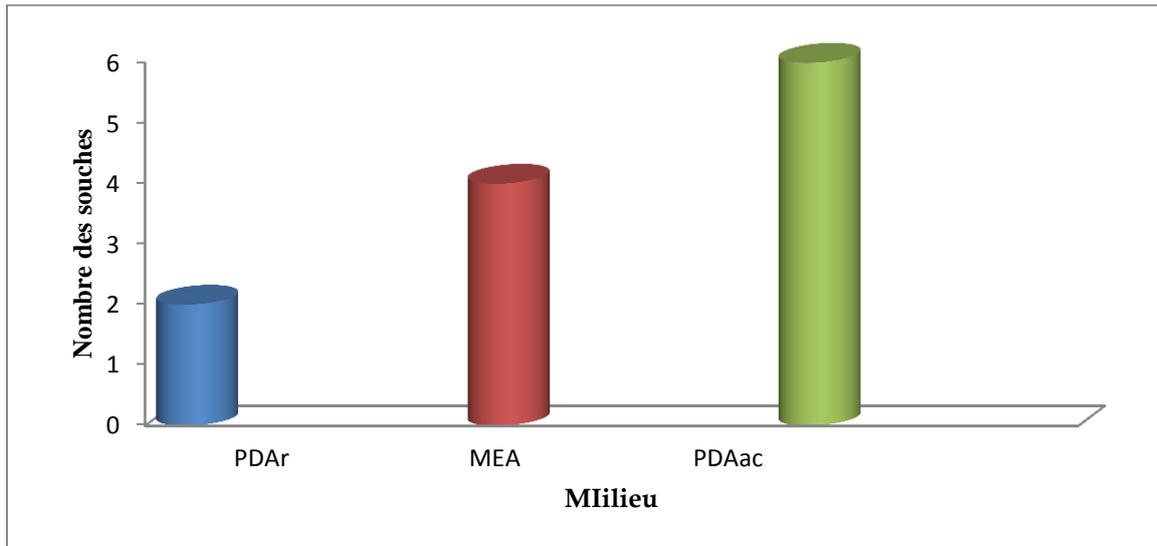


Figure 25: Nombre des souches isolées des échantillons de la grotte.

La figure montre le nombre des souches isolées des échantillons de la grotte sur différents milieux avec un nombre de souches fongiques important (06/14) sur le milieu PDAac, suivi par le milieu MEA avec un nombre est estimé à 4 moisissures ; et pour le milieu PDAr nous avons obtenus 2 moisissures.

Les milieux PDA utilisés au cours de cette étude ont été décrites par plusieurs auteurs pour l'isolement des moisissures (**Gacem, 2011;Dedi et Doimonde, 2017**). D'après **Impion (2010)**, le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons. Selon **Hamdi et Hamlaoui (2022)**, la meilleure croissance des moisissures a été enregistrée sur le milieu PDA.

La croissance d'un champignon est lente et dense, afin de permettre au mycélium d'exploiter les ressources nutritives du substrat.

3. Identification des mycètes

L'identification des souches est reposée sur les observations du mycélium fongique :

- ❖ Observation macroscopique : qui permet de déterminer la couleur de la colonie au cours de la croissance.
- ❖ Observation microscopique : qui dépiste la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, le mode de la production et les aspects des fructifications et des spores (**Lecellier, 2013**).

Résultats et Discussion

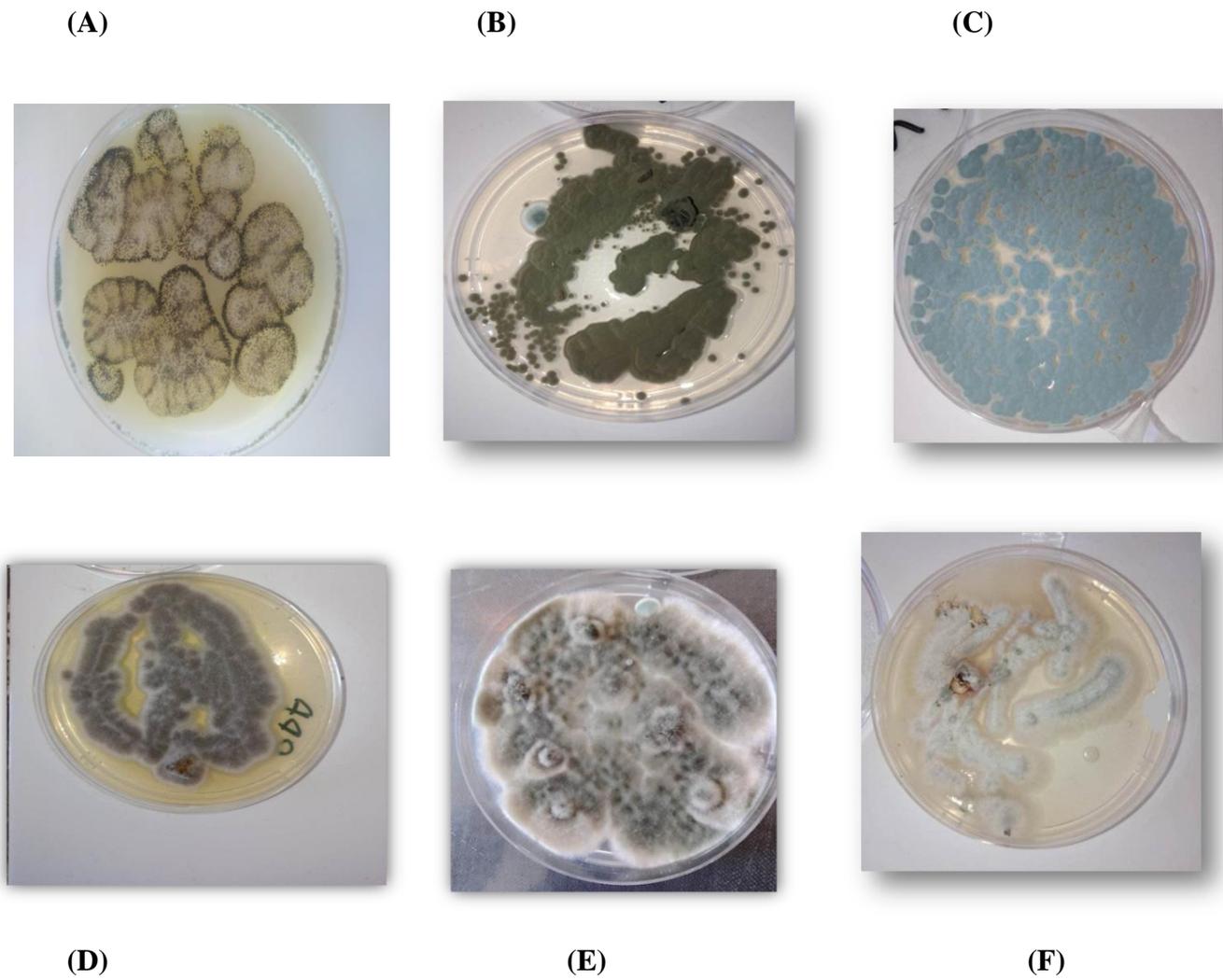


Figure 26: Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* [A]; *Cladosporium sp.*[B]; :
Penicillium sp. [C]; *Aspergillus sp.* [D] et *Ulocladium sp.* [E].

Résultats et Discussion

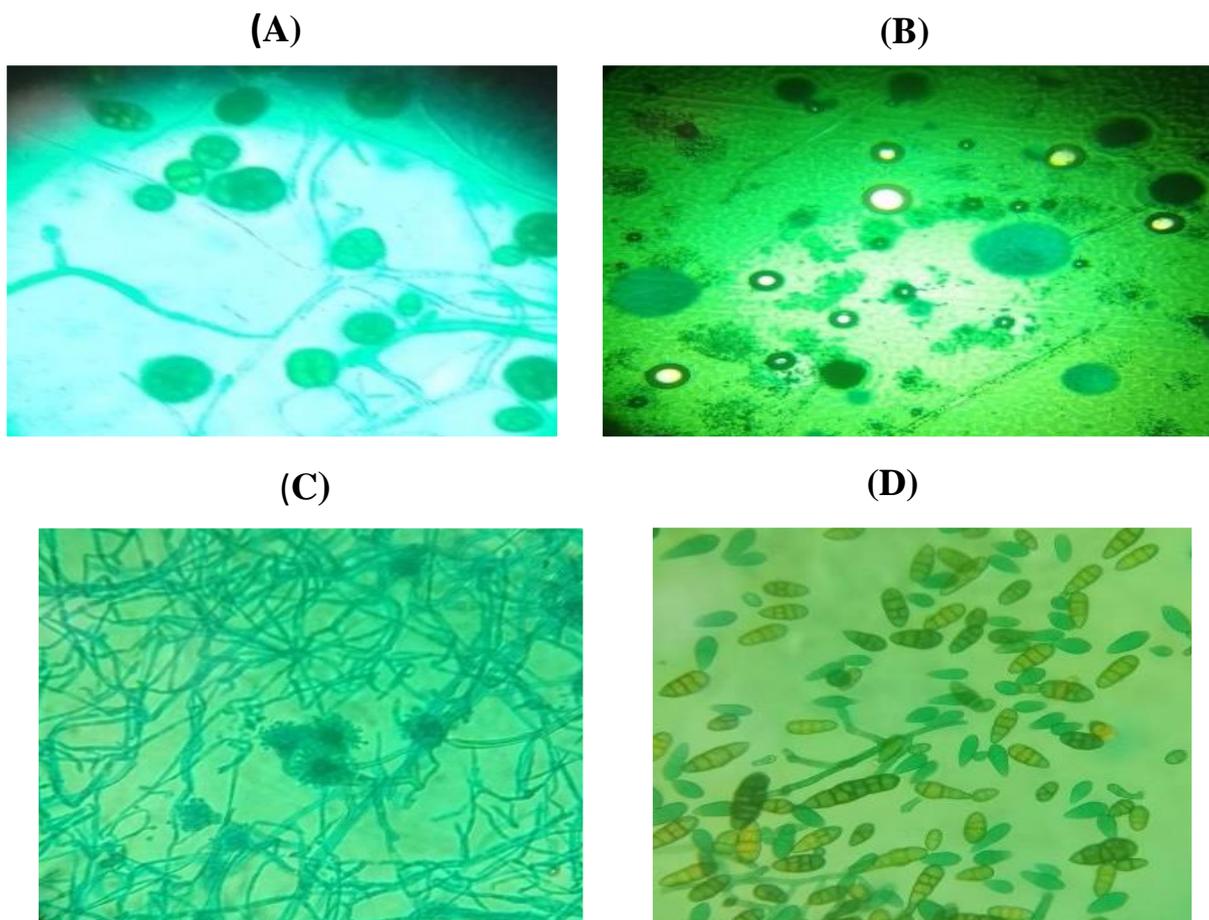


Figure 27: Observation microscopique d'*Ulocladium s.p* (Gx100) [A]; *Aspergillus niger* [B]; *Penicillium s.p* [C] et *Alternaria s.p.* [D].

Tableau 09 : Aspect microscopique et identification microscopique des souches isolées.

Code de la souche	Milieu / Dilution	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
S1	E1 .10 ⁻⁴ PDAr	Une petite colonie verte	<i>Alternaria sp.</i>
S2	Ecouv.RN2.PDAac	Une grande colonie noire	<i>Alternaria sp.</i>
S3	MEA.RN2.Ecouv	Colonie verdâtre	<i>Cladosporium sp.</i>
S4	E1.10 ⁻¹ PDAac	Colonie verdâtre	<i>Cladosporium sp.</i>
	E1.10 ⁻¹ PDAr	Grande colonie	<i>Aspergillus niger</i>

Résultats et Discussion

S5		noire entourée par une zone blanche	
S6	E2.10 ⁻³ .PDA ac	Petite colonie marron entourée par une zone blanche	<i>Ulocladium sp.</i>
S7	E1.10 ⁻³ .PDAac	Colonie verte entourée par une zone blanche	<i>Aspergillus sp.</i>
S8	E2.10 ⁻¹ .PDAac	Grande colonie noire recouvert par une zone jaune	<i>Aspergillus niger</i>
S9	E2.10 ⁻¹ .PDAac	Colonie verte entourée par une zone blanche	Non identifier
S10	MEA.E2.10 ⁻¹	Colonie verte avec des pores	<i>Penicillium sp.</i>
S11	MEA.10 ⁻¹	Mycorale noire	<i>Aspergillus niger</i>
S12	MEA.RN2	Coloniellaineux (poudre vert)	<i>Penicillum sp.</i>
S13	EC.RN.Bennett	Colonie verte entourée par une zone blanche avec une tache jaune au centre	Non identifier
S14	EC.RN.Bennett	Colonie verte entourée par une zone d'aspect coton	Non identifier

Résultats et Discussion

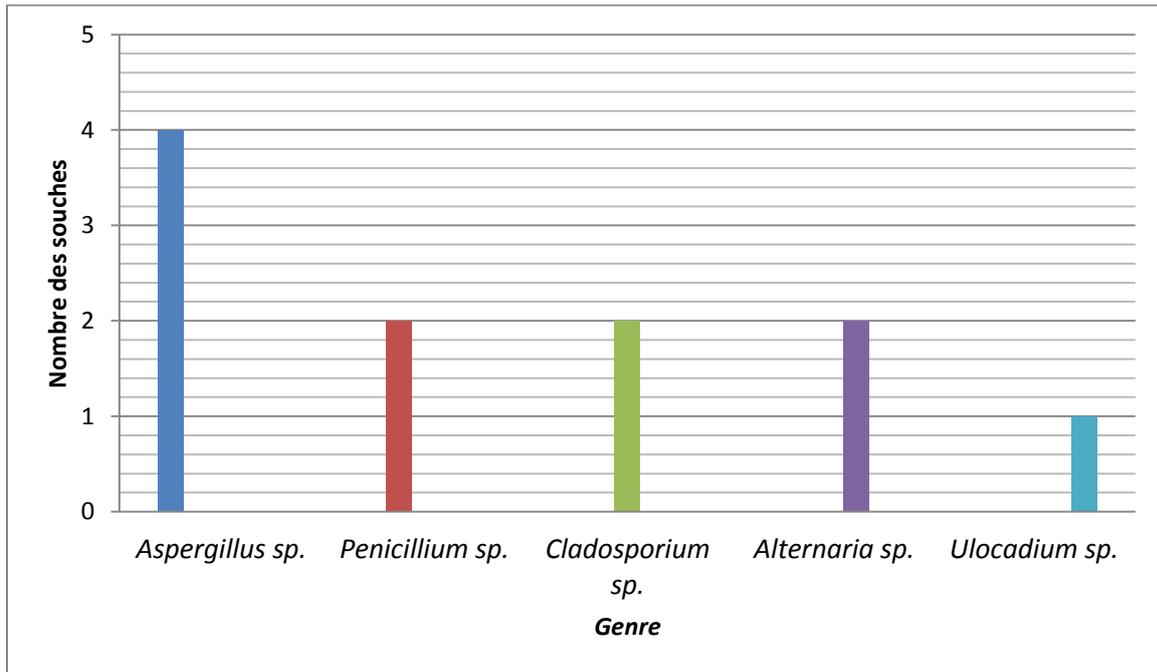


Figure28: Nombre de genres isolés à partir de la grotte D'Ighzer.

La figure montre que le genre dominant est *Aspergillus*, avec 4 isolats sur 14 souches présents et les plus courants dans le sol, suivi par le genre de *Penicillium* et de *Cladosporium* et *Alternaria* de pourcentage égaux par ordre de 2 isolats tandis que le dernier genre *Ulocladium* est le moins représenté. Ces résultats sont également cohérents avec ceux de plusieurs auteurs qui ont noté la présence omniprésente d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans la flore de diverses régions du monde (Calvo et al., 1980).

La grotte est un environnement naturel pour une grande variété de micro-organismes et d'autres organismes qui forment différents types de populations. Le nombre et les activités de ces populations varient selon les régions et sont influencés par la teneur en matière organique du sol, la qualité du sol, le pH, l'humidité, la température et l'aération (Ruark and Zarnoch, 1992 ; Madigan et al. 1997 ; Subler and Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000 ; Smith et al. 2000). Ces résultats coïncident également avec celles rapportées par plusieurs auteurs qui mentionnent la présence constante de *Penicillium* dans la mycoflore de différentes régions dans le monde (Calvo et al. 1980).

Résultats et Discussion

D'autres études sur l'isolement des champignons à partir de **la grotte de Sabah (Malaisie)**, ont montré l'isolement de 14 isolats fongiques sur des cadavres de chauves-souris et 10 isolats fongiques sur des cadavres d'arthropodes.

Selon les travaux de **Domsch et al. (2007)**, les 23 isolats fongiques étaient des ascomycètes. Les plus fréquemment isolés sont les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, qui sont omniprésents dans les environnements non troglodytiques.

Selon les résultats de **Kholkhal (2006)**, la plupart des isolats du sol de **la grotte d'Ain fezza** ont été identifiés comme des *Penicillium*. Aussi selon les résultats de **Zekri et Rahmani (2017)**, le nombre majoritaire des moisissures isolées de la **grotte de Honaine** (Tlemcen) appartient au genre *Penicillium* (3/9). Par contre dans notre recherche le genre dominant est *Aspergillus* (4/14).

Les travaux de **Man et al. (2015)** sur la grotte de Hechang (Chine), ont montré que *Penicillium* est le plus dominant avec un pourcentage de (54%) et les autres genres sont les moins représentés : *Paecilomyces* (22%), (*9%*), *Cladosporium* (7%), *Beauveria* (4%), *Botrytis* (2 %) et *Métacordyceps* (2 %). Les *Eurotiales* (54%), *Hypocreales* (37%), *Capnodiales* (7%) et *Hélotiales* (2%).

Mulec et al. (2012) ont identifié *Penicillium sp.* et *Aspergillus sp.* parmi divers biotes bactériens dans un tapis microbien recouvrant une surface rocheuse et des champignons appartenant au groupe *Cladosporium herbarum* dans du calcaire altéré. Plus de 500 genres de champignons, de moisissures visqueuses et de taxons ressemblant à des champignons ont été signalés dans des grottes du monde entier. Donc nos résultats coïncident avec ces travaux.

Autres résultats de l'isolement des champignons à partir de la grotte de Lascaux ont montré que les débris organiques sont souvent rapidement couverts de conidies d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Mucor* **Min (1988)**.

Selon les résultats des travaux de **Belyaghoubi et al. (2018)**, 38 isolats ont été obtenus de champignons filamenteux à partir des échantillons du sol de la grotte de Chaabe (wilaya de Tlemcen). Les espèces isolées appartiennent aux genres *Penicillium sp.*(60.53%), *Cladosporium sp.*(10.53%), *Aspergillus sp.*(7.89%) et *Alternaria sp.* (7.89%).

D'après les recherches de **Isuru Priyaranga Silva et al. (2021)**, les espèces isolées de la grotte de Gneissique (Sri Lanka) sont : *Penicillium panissaguineum*, *Penicillium cremeogriseus*, *Aspergillus bertholletius* et *Trichoderma yunnanense*.

En conséquence selon les travaux de **Wanfu Wang et al. (2011)** sur la grotte Heshang, *Alternaria* était le champignon le plus abondant détecté dans le stade 1 (34,48 %), le stade 2 (36,34

Résultats et Discussion

%), stade 3 (45,10 %) et stade 4 (44,40 %). Le plus champignon cultivable abondamment détecté dès le stade 5 a été *Cladosporium* (24,88 %) et du stade 6 était *Fusarium* (44,55 %).

4. Résultats de l'activité antimicrobienne

Tableau 10: Les résultats de l'activité antimicrobienne des souches (méthode des cylindres d'agar des moisissures).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur les microorganismes tests							
Souche	<i>Pseudomonas. aerogenosa</i>	<i>Echerischia. coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus. aureus</i>	<i>Enterococcus. feacalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida. albicans</i>
1	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	12 ±0.71	-
8	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	13 ± 1.41	-
11	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-

Résultats et Discussion

(-) : *Pas d'activité.*

Remarque : aucun résultat positif n'a été marqué dans la technique des puits.

Ces résultats sont similaires par rapport aux travaux de (Djebbah, 2016) sur des moisissures isolées de la grotte de Ain fezza. et aussi les travaux de (Rahmani, 2017; Zekri, 2017) sur des moisissures isolées de la grotte Kaws –Honaine.

Le test d'activité antibactérienne des isolats a indiqué que 2 souches présentent une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test et les souches S7 et S10 ont propagées une activité contre *Bacillus subtilis* (Tableau 10).



Figure 29 : effet des souches *Aspergillus .Sp* sur *Bacillus subtilis*.



Figure 30 : effet des souches *penicillium. Sp* sur *Bacillus subtilis*.

Résultats et Discussion

Tableau 11: Résultats de la sensibilité des bactéries tests aux antibiotiques.

Méthode	Puits					
souches ATB	P.a	E.c	K.P	S.a	E.f	B.s
COL	13±00 (R)	11.5± 2.12 (R)	12.5±07 1 (R)	00 (R)	00 (R)	10 ±00 (R)
Amox	24 ±1.41 (S)	14.5 ± 0.71 (R)	00 (R)	24.5 ± 0.71 (S)	27.5 ±0.71 (S)	23.7 ± 0.71 (I)
Amp	30.7± 1.2 (S)	22 ± 2 (S)	33 ±1.7 (S)	22 ± 1.7 (S)	00±0 (R)	00±0 (R)

COL : Colistine , Amox : Amoxiciliyne, Amp : Ampicilline ; S : Sensible, I : Intermédiaire, R: Résistante : Selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie en 2022.

Les résultats obtenus montrent que la colistine a un effet sur les microorganismes pathogènes avec des diamètres des zones d'inhibition entre 11.5 et 13 mm. Et l'ampicilline montre une sensibilité sur les souches pathogènes qui a des diamètres des zones d'inhibition entre 33 et 22 mm, et pour amoxiciline les diamètres des zones d'inhibition varient entre 14 et 27.5 mm (tableau11).

Tableau 12: Résultats de la sensibilité à la nystatine de la levure (diamètres en mm).

Résultats et Discussion

Méthode	Puits
antifongique	Nystatine
<i>Candida albicans</i>	32.5 ± 2.12 (S)

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

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

Suivant les travaux de **Belyaghoubi et al ; (2018)**, un total de 23 souches de *Penicillium* ont été sélectionnés pour le dépistage de l'activité antimicrobienne contre des micro-organismes pathogènes. Le *Penicillium spp.* testé a montré une activité antimicrobienne contre au moins un des agents testés micro-organismes par la méthode des cylindres d'agar (sauf pour *P. aeruginosa* qui est l'espèce la plus résistante), indiquant que ces champignons produisent un certain type de substance(s) antimicrobienne(s) responsable(s) de l'inhibition des micro-organismes testés. Les souches actives ont montré une forte activité inhibitrice opposée aux micro-organismes pathogènes et les diamètres de l'inhibition des zones varient entre 7,5 et 26 mm. La meilleure activité a été contre *C. albicans* avec un pourcentage d'inhibition de 43,38 % des souches (10/23).

Suivant les travaux de **Isuru Priyaranga Silva al. (2021)**, parmi tous les isolats fongiques testés, seuls trois isolats (SKW 301, SKW 404 et SKW407) ont montré des activités antimicrobiennes au moins contre un agent pathogène. En conséquence, la souche fongique du plafond de la grotte SKW 301 et du mur de la grotte SKW 404 ont exprimé une activité antimicrobienne vis-à-vis *S. aureus* à Gram positif, tandis que l'isolat fongique de la paroi de la grotte SKW 407 a exprimé une activité antimicrobienne contre *P. aeruginosa*. Les isolats ont pu montrer une activité antimicrobienne contre *E. coli*, *C. albicans* et *C. parapsilosis*.

D'après les travaux **Wangal. (2011)** sur la grotte Dunhuang en Chine, *Alternaria* était le champignon le plus abondamment détecté dans le stade 1 (>7,0 mm), le stade 2 (4,7-7,0 mm) et

Résultats et Discussion

stade 4 (2.1-3.3 mm). Le champignon le plus cultivable dans le stade 5 est *Cladosporium* et pour le stade 6 est *Fusarium*.

Selon les travaux **Mitova al. (2017)** sur la grotte Magura- Bulgaria, La plus faible concentration d'OIT testée (100 mg/L) inhibe tous les champignons, sauf *Trichoderma sp.*, provoquant une diamètre de la zone d'inhibition significatif (> 16 mm) dans 13 des 17 souches. En ce sens, il convient de mentionner le haut degré d'inhibition de certains champignons, tels que *Penicillium sp.*, *Exophiala sp.*, *Doratomyces sp.* Et *Pseudogymnoascus sp.*, à 500 et 1 000 mg/L OIT, qu'il n'a pas été possible d'évaluer avec précision en raison de deux grandes zones d'inhibition (diamètres > 50 mm ; ++++).

Les champignons les plus sensibles au BAC étaient les mentionnés levures, *Trichosporum sp.* et *Torulaspora sp.*, ainsi comme *Exophiala sp.*, avec des diamètres de zone d'inhibition inférieur à 30 mm .

A la suite des travaux de **Pipite al . (2022)** sur une grotte en Fiji, parmi les 55 isolats de la grotte étudiée, 34 présentaient des zones moyennes à d'inhibition de la croissance contre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* et *Bacillus cereus*. Globalement, pour chaque pathogène testé, 50% des isolats des cavernes ont montré une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*, 47 % contre *Streptococcus aureus*, 50% contre *Enterococcus faecalis*, 32 % contre *Klebsiella pneumoniae* et 41 % contre *Bacillus cereus* sur les 34 isolats bioactifs. Deux souches (W14 et W43) ont produit de larges zones d'inhibition (de 37 mm à 39 mm) vis-à-vis quatre agents pathogènes à l'exclusion de *Bacillus cereus*.

D'après les travaux de nos collègues **Chaib Djamila et Nouali Kenza** sur les mêmes échantillons de la grotte d'Ighzer, ils sont obtenues les résultats suivants :

Résultats et Discussion

- ❖ Les souches actinomycétales cultivées se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception de A5 et A7 qui n'ont pas pu utiliser le citrate, et les souches A1 A2 A3 A5 A6 et A7 qui n'ont pas pu hydrolyser la gélatine.
- ❖ Concernant la méthode des puits aucune zone d'inhibition n'a été observée contre des germes cibles à l'exception de la souche *S. aureus* où il y a l'apparition d'une faible zone d'inhibition de 8 mm de diamètre obtenue par la souche A.
- ❖ Les résultats obtenus, ils montrent d'une part que l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre.
- ❖ d'après les tests réalisés et l'observation microscopique les souches isolées (06) sont probablement des *Streptomyces sp.*



Conclusion

Conclusion

Actuellement, la résistance aux antibiotiques constitue l'une des plus graves menaces sur la santé mondiale. La résistance microbienne est en progression rapide avec en parallèle une diminution de la découverte de nouveaux agents thérapeutiques.

La conception de ce travail repose sur la recherche des souches et de moisissures à activité antibactérienne et antifongique dans les roches et les sédiments de la grotte d'Ighzer de la région de Timimoun à Adrar.

L'étude relative aux caractères macroscopiques et microscopiques des moisissures nous a permis d'identifier les 11 souches sélectionnées genres différents alors que le champignon le plus dominant appartient au genre *Aspergillus* (04/14) et *Penicillium* (02/14).

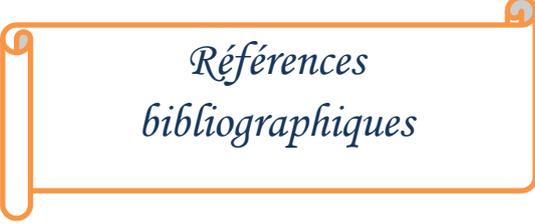
L'identification repose fondamentalement sur des critères morphologiques et physiologiques propres à un environnement particulier.

Afin de sélectionner les souches productrices de métabolites antibactériens, différents milieux de culture pour la production d'antibactériens comme (PDA, MEA) ont été utilisées et différentes techniques (technique des cylindres d'agar et technique des puits) aussi pour mettre en évidence leur pouvoir inhibiteur.

Le test d'activité antibactérienne des isolats a indiqué que 2 souches ont présenté une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test avec des zones d'inhibition qui varient entre 11.5 et 13 mm.

Pour compléter ce sujet sur la flore fongique nous proposons :

- ✓ une étude plus approfondie de la biodiversité du site de prélèvement.
- ✓ identification moléculaire des souches obtenues.
- ✓ Identification des molécules produites.
- ✓ recherche des espèces productrices de métabolites d'intérêt industriel et biotechnologique (Enzymes, antibiotiques....etc).



*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques

- ABDESSALEM , H et BOURMAL,C. (2020). Evaluation de l'activité antifongique des extraits de plantes locales envers *Candida albicans* responsable d'infection buccales et d'origine dentaire. MÉMOIRE DE MASTER , spécialité en Microbiologie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra, Département des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie. 68p
- ABDELKHALEK, M. (2017).Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte *Kaws* – Honaine .MÉMOIRE DE MASTER ,Spécialité en Microbiologie. Université ABOU BAKR BELKAID - Tlemcen, Département de biologie.127p
- BELDJAZIA ,A et KAMAH ,A(2022). Effet de la température et du pH sur la production des substances antimicrobiennes par *Penicillium chrysogenum*, Mémoire de master, Option : Microbiologie Appliquée. Université Mohamed Seddik Ben Yahia –Jijel, Microbiologie Appliquée et Sciences Alimentaires. 53p
- Belyagoubi L., Belyagoubi-Benhammou N., Jurado V., Dupont J., Lacoste S., Djebbah F., Ounadjela F.Z., Benaissa S., Habi S., Abdelouahi D.E. and Saiz-Jimenez C(2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *International Journal of Speleology*, 47 (2), 189-199.
- BENDEBBACHE, R et ZAIDI, Aet MEHIRI, A(2022). PHÉNOTYPE DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES DES SOUCHES DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* RESPONSABLES D'INFECTIONS. Mémoire de master, Option : Microbiologie appliquée. Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi, Département des Sciences de la Nature et de la vie.174p
- Bentounsi, H et Boukhalfa , O(2020). Criblage de l'activité insecticide de quelques souches de mycètes et d'actinomycetes contre un insecte ravageur de plantes, ,Mémoire de master, Option MICROBIOLOGIE APPLIQUEE. Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi ,Département des Sciences de la Nature et de la vie.102p

Références bibliographiques

BOUHEMARA ,Y et BOUHENNACHE, H (2019). L'étude de l'activité antibactérienne des moisissures isolées à partir des milieux salins, Mémoire de master, Spécialité en Biochimie Appliquée. Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf Mila, Département des Sciences de la Nature et de la Vie. 92p

Bouzada, M(2019). Sur les traces et les cendres du ksar Ighzer a timimoune : De la polychromie de la Casbah à une valeur ajoutée à identités multiples. Memoire de master, Spécialité :Habitat et projet urbain. Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, Département d'Architecture.70p

Boulahlib, Net Gherraz, C (2020). Recherche des souches d'Escherichia coli productrices des BLSE d'origine alimentaire. Mémoire de master, Option MICROBIOLOGIE APPLIQUEE. Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi, Département des Sciences de la Nature et de la vie. 40p.

BRAMKI,A(2019). Isolement et identification de souches d'Aspergillus de différents écosystèmes productrices de substances à activité antibactérienne et caractérisation partielle des molécules élaborées. Thèse de doctorat, Option Biochimie Appliquée. Université des Frères Mentouri-Constantine1. Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Département de Biochimie et Biologie Moléculaire et Cellulaire.173p

C. Lee Ventola (2015). The Antibiotic Resistance Crisis . Pharmacy and therapeutic, 40(4): 277-283.

Chouarfa, Aet Amzel ,W (2021). Étude de l'activité antibactérienne des souches fongiques isolées d'un sol thermal. Mémoire de master, Spécialité : Biochimie Appliquée et Microbiologie Appliquée. Centre Universitaire Abdelhafid Boussouf-Mila , Département des Sciences de la Nature et de la Vie. 91p

Claude Alabouvette et Cesáreo Sáiz- Jiménez(2011). ÉCOLOGIE MICROBIENNE DE LA GROTTA DE LASCAUX .Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla(IRNAS- CSIC). Espagne,126p.

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle

Références bibliographiques

sanitaire: Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.

DJEBBAH,F(2016). Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagma). Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie. Université ABOU BAKR BELKAID - Tlemcen, Département de biologie.127p

DJEBBAH ,F(2022). Isolement et caractérisation d'actinomycètes producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte Gueldaman 1 (GLD1) (Akbou, Algérie). Thèse de doctorat, Option Microbiologie appliquée. Université ABOU BAKR BELKAID – Tlemcen, Département de biologie.147p.

DJOUANI ,Cet ABABSA , Met BOUZIDI ,N (2022). Isolement et Identification des mycètes accompagnants les graines de sorgho (*sorghum bicolor*) et mise en évidence de leur activité antibactérienne. Mémoire de master, Option : Microbiologie Appliquée. Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi , Département des Sciences de la Nature et de la Vie.74p

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

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

Dulaney, E.L., Larsen, A.H., Stapley, E.O. (1955). A note on the isolation of microorganisms from natural sources.Mycologia, 47(3) : 420–422.

F, SOUFI et H, HAFAYED (2019). Le profil phénotypique de la résistance aux bêtalactamines de *Klebsiella pneumoniae* uropathogène isolée à l'hôpital El-Hakim Saâdan de Biskra. Mémoire de master, Spécialité en Microbiologie appliquée. Université Mohamed Khider de Biskra,Département des sciences de la nature et de la vie.70p

Références bibliographiques

Gilbert Thellend-Gauthie (2022). Étudier les effets de l'hydroxyde de calcium et de la dermaseptine-1 sur *Enterococcus faecalis* et les cellules pulpaires. Mémoire de Master, Option sciences dentaires. Université LAVAL, Faculté de médecine.72p

Hamza, N et Aloui ,H (2021). L'activité antimicrobienne des champignons d'origine tellurique, Mémoire de master, Option Microbiologie appliquée. Université Larbi Ben M'hidi Oum el-Bouaghi,Département des sciences de la nature et de la vie. 44p

Institut de Génie Rural, (1973). Travaux pratiques Guide de laboratoire. Suisse, 50 pages.

Javier Avalos et M. Carmen Limón (2022). Fungal Secondary Metabolism. Encyclopedia,2 :1-13.

Jerome P., Lory S., StaleyJ S., (2004). Microbiologie, Ed Paris., 891pages.

Katarzyna Kosznik-Kwaśnicka, Piotr Golec, Weronika Jaroszewicz, Daria Lubomska et Lidia Piechowicz(2022). Into the Unknown: Microbial Communities in Caves, Their Role, and Potential Use. *microorganismes*, 222(10): 1-18

Kholkhal, W (2006).Recherche de nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotiques à partir du sol et des concrétionssédimentaires des grottes de Ain Fezza. Mémoire de magister, option activité biologique et synthèse.Université ABOU BAKR BELKAID – Tlemcen, Département de biologie.84p

Larpent J.-P. et Larpent-Gourgaud M. (1985 b). Manuel pratique de microbiologie.Hermann. Paris. 157-162

Lise, A(2018). Hétérogénéité spatio-temporelle du microbiote de la grotte de Lascaux. THESE de DOCTORAT , Spécialité: Ecologie Microbienne. Université Claude Bernard Lyon1. 200p

Louis, C (2021). Influence des agents phytopathogènes sur la production de lipopeptides et le protéome de *Bacillus subtilis*. Thèse de doctorat, Option médecine moléculaire. Université LAVAL, Faculté de médecine .156p

Références bibliographiques

LOUADJ, Z (2014). Identification des moisissures isolées du solde zarifet . Mémoire de master, Option :Microbiologie.UNIVERSITE ABOU BAKR BELKAID- Tlemcen, DEPARTEMENT DE BIOLOGIE.53p

L. Laiz, J.M. Gonzalez, et C. Saiz-Jimenez(2012).MICROBIAL COMMUNITIES IN CAVES: ECOLOGY, PHYSIOLOGY, AND EFFECTS ON PALEOLITHIC PAINTINGS.Instituto de Recursos Naturales y Agrobiologia, 6(2) : 1-28

Marchal, N., Bourdon, J. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs –Paris. 509p.

M, El Hadi HENKA et S, LAGGOUN et S, TERKI (2022). Isolement et identification des champignons responsable de la détérioration des pommes de terre dans la région d'Oued Souf. Mémoire de master, Spécialité en Biodiversité Et Environnement. Université Echahid Hamma Lakhdar EL-OUED, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire.80p.

Ramat Onyeneoyiza Raji, Oluwafemi Adebayo Oyewole, Omeiza Haruna Ibrahim, Yetunde Noimot Tijani and Mordecai Gana(2019). Microbial communities and activities in caves. Biological Sciences,6(14) :557-564.

Rahmani, N(2017).Isolement des microorganismes (actinomycètes et mycètes) producteurs de substances antimicrobiennes à partir de la grotte kaws –Honaine . Mémoire de master, Option Microbiologie . Université ABOU BAKR BELKAID – Tlemcen, Département de biologie.122p

Tikour ,S(2018). Biodiversité fongique de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) élevée dans deux fermes conchylicoles de l'Ouest Algérien Kristel et Stidia . Mémoire de master, Spécialité Ressource halieutique et exploitation durable. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem, Departement des sciences de la mer et de l'aquaculture.87p

Vanderwolf K , Malloch D, McAlpine D.F. et Forbes G.J (2013). A world review on fungi, yeasts, and slime molds in caves. International Journal of Speleology, 42 (1), 77-96

Références bibliographiques

ZEKRI ,M et GARAM ,S (2022). Caractérisation de souches de Staphylococcus aureus et étude de leur antibiorésistance. Mémoire de master, Option MICROBIOLOGIE APPLIQUEE. Université L'Arbi Ben M'Hidi, Oum-El Bouaghi, Département des Sciences de la Nature et de la vie . 61p

<https://encyclopedia.pub/entry/17313>

https://fr.m.wikipedia.org/wiki/écologie_microbienne

<https://www.pedagogie.ac-nice.fr>

<http://amistimimoun.free.fr>



Annexes

Composition des milieux de culture

Bouillon Sabouraud

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

Sabouraud

Peptone de gélatine		10g
Glucose	20g	
Agar		17g
Eau distillée	1000 ml	
PH	7,2	

PDA (Potato Dextrose Agar) :

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

Saccharose		10 g
Agar	15 g	
Eau distillée	1000 ml	

CDA (Czapek Dextrose Agar):

NaNO ₃		3 g
-------------------	--	-----

Saccharose		30 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g	
MgSO ₄		0,5 g
KCL		0,5 g
FeSO ₄		0,01 g
Agar		15 g
Eau distillée		1000 ml

MEA (Malt Extract Agar) :

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

Lactophénol:

Phénol		20 g
Acide lactique (25%)		20 ml
Glycérol		20 ml
Eau distillée		40 ml

Bleu de coton :

Lactophénol		
bleu de méthylène		0,5 g

Rose bengal:

Rose bengal

1 g

Eau distillée

100 ml