



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITE de TLEMCEM

Faculté des Sciences de la nature et de la Vie et Sciences de Terre et de l'Univers

Département de Biologie



MEMOIRE

Présenté par

Zerriouh Alaa

et

Lahouati Souheyla

En vue de l'obtention du

Diplôme de Master

En Microbiologie et contrôle de qualité

Thème

Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la grotte de Tagma (Gherf El Mit-Tlemcen).

Soutenu le, devant le jury composé de :

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

Année universitaire 2023/2024



Remerciement

*Avant tous nous remercions **ALLAH** le tout puissant pour le courage, la volenté 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.*

*Nos plus vifs remerciements vont à Monsieur **REBIAHI Sid Ahmed** Professeur à l'université de Tlemcen pour avoir accepté président ce travail. Nous sommes honorés par sa participation au jury de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier la Professeur Madame **BOUBLENZ A Nesrine** nous avoir fait l'honneur d'accepter là d'examiner ce travail.*

*Je souhaite également à exprimer ma reconnaissance envers Madame **Professeur BEKHECHI-BENHABIB Chahrazed** et Madame **AYAD Amel**, pour les souches microbiennes de référence.*

Dédicace

Je remercie d'abord Dieu tout puissant pour avoir guidé mes pas vers un avenir prometteur, inchaallah.

Je consacre ce travail modeste :

A ma très cher mère « Sabiha »

Je dédie mon cadeau de fin d'études avec tout mon amour, mon dévouement et ma tendresse à ma mère, qui a veillé à mon confort et à mon bonheur et qui a été la raison de mon succès après Dieu Tout-Puissant.

A mon très cher père « Djawed »

Aucun mot ne peut exprimer l'amour, l'appréciation et le respect que j'ai toujours pour vous et vos efforts déployés jour et nuit pour mon éducation et mon bien-être.

A ma sœur « Aya »

Ma belle. Je vous offre ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de succès.

A mon fiancé « Hemza »

La source de bravoure tout au long de mon travail et toujours présente avec moi, merci.

A la personne avec qui j'ai partagé cette tâche

Souheyla

A tout ma famille Zerriouh



Alaa

Dédicace

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude à DIEU pour m'avoir donné la force et le courage de mener à bien ce modeste travail.

Je tiens à dédier cet humble travail à :

A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoir, à la source d'amour, à la mère des sentiments fragiles qui ma bénie par ces prières.....**ma mère Fatima**

A mon support dans ma vie, qui m'a appris ma supporté et ma dirigé vers la réussite.....**mon père Khaled**

A ma chère sœur **Linda**, ma princesse **Alaa**, mes chers frères **Abdesamed, Abderrahman, Lotfi**. Ils m'ont chaleureusement supporté et encouragé tout au long de mon parcours.

A tous ceux qui me sont chers, qui étaient toujours à mes côtés et qui m'ont accompagné durant mon chemin d'études, surtout **Oussama**.

A mon binôme **Alaa**.

A toutes ma famille Lahouati.



Souheyla

ملخص

تعد الجزائر موطنًا لتنوع مذهل من الكائنات الحية الدقيقة التي يمكن أن تكون مصدرًا مهمًا لكمية كبيرة من الجزيئات المضادة للميكروبات.

ومن الضروري العثور على مضادات حيوية جديدة وغيرها من المستقلبات الميكروبية النشطة بيولوجيا، نظرا لتزايد تواتر الكائنات الحية الدقيقة المسببة للأمراض المقاومة للأدوية المتعددة والتي تتطور. وبهذه الطريقة، يبحث الباحثون عن مضادات حيوية جديدة من الكائنات الحية الدقيقة الموجودة في البيئات القاسية مثل الكهوف.

كجزء من بحثنا، قمنا بدراسة الفطر الذي ينتج جزيئات نشطة بيولوجيا من مغارة طغما (ولاية تلمسان) تم أخذ عينات انتقائية من 10 سلالات فطرية أثناء أخذ عينات الصخور. وكانت العزلات التي تم تحديدها هي

Aspergillus (2/10) و *Penicillium* (8/10).

أظهرت نتائج اختبار النشاط المضاد للبكتيريا التي تم الحصول عليها بتقنية أسطوانة الأجار أن 5 سلالات لها نشاط مضاد للبكتيريا ضد واحدة على الأقل من البكتيريا التي تم فحصها، السلالة 2 لها نشاط ضد المكورات العنقودية الذهبية بقطر *klebsiella* بمنطقة تثبيط 07 ملم و *Pseudomonasaeruginosa* منطقة تثبيط 18 ملم والسلالة السابعة ضد الزائفة. منطقة *Pseudomonas aeruginosa* ملم و للسلالتين 8,9 نشاط ضد 11 *candida albicans* ملم و 07 *pneumonia* بين 08 و 09 منطقة التثبيط *Pseudomonas aeruginosa* تثبيط 07 ملم و تتراوح فعالية انتشار السلالة العاشرة ضد والمبيضات البيضاء بقطر 07 ملم، بينما لم تظهر السلالات أي نشاط مضاد للميكروبات عند استخدام تقنية البئر.

وقد يمثل كهف بتاقمة فرصة واحدة للكائنات الحية الدقيقة التي تنتج مواد نشطة بيولوجيا.

الكلمات المفتاحية: كهف بتاقمة ، الصخور، المسح، العفن، أنشطة مضادات الميكروبات.

Résumé

L'Algérie abrite une incroyable diversité de micro-organismes qui peuvent être une source significative d'une grande quantité de molécules antimicrobiennes.

Il est essentiel de trouver de nouveaux antibiotiques et autres métabolites microbiens bioactifs, étant donné la fréquence croissante des micro-organismes pathogènes multirésistants qui se développent. De cette manière, les scientifiques cherchent de nouveaux antibiotiques provenant de micro-organismes présents dans des habitats extrêmes tels que les grottes.

Dans le cadre de notre étude, nous avons testés des champignons qui produisent des molécules bioactives à partir de la nouvelle grotte de Tagma.

On a effectué des isollements sélectifs de 10 souches fongiques lors du prélèvement des roches, les isolats repérés appartient aux genres *Aspergillus* (2/10) et *Penicillium* (8/10).

Les résultats du test d'activité antimicrobienne obtenus par la technique de cylindre d'agar, ont révélé que 5 souches ont une activité antibactérienne sur au moins une des bactéries examinées, la souche 2 a une activité contre *Staphylococcus aureus* avec diamètre de zone d'inhibition 18 mm et la 7^{ème} souche contre *Pseudomonas aeruginosa* de 07 mm zone d'inhibition et *Klebsiella pneumoniae* de 07 mm, *Candida albicans* 11 mm. Par contre, les deux souches 8 et 9 a une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* de 07 mm zone d'inhibition.

Tandis que la 10^{ème} souche a propagée une activité contre *Pseudomonas aeruginosa* varient entre 08 et 09 zone d'inhibition et *candida albicans* de diamètre 07 mm.

Ces memes souches fongiques n'ont montré aucune activité antimicrobienne lors de l'utilisation de la technique des puits.

La grotte Tagma peut représenter une opportunité prometteuse pour l'isolement des microorganismes qui produisent des substances bioactives.

Les mots clés : Grotte de Tagma, Roches, Ecouvillonnage, Moisissures, Activités antimicrobienne.

Abstract

Algeria is home to an incredible diversity of microorganisms that can be a significant source of a large quantity of antimicrobial molecules.

It is essential to find new antibiotics and other bioactive microbial metabolites, given the increasing frequency of multidrug-resistant pathogenic microorganisms that are developing. In this way, scientists are looking for new antibiotics from microorganisms present in extreme habitats such as caves.

As part of our study, we tested mushrooms that produce bioactive molecules from the new Tagma Cave.

Selective isolation of 10 fungal strains was carried out during rock sampling. The isolates identified belong to the genera *Aspergillus* (2/10) and *Penicillium* (8/10).

Agar cylinder technique revealed that 5 strains have antibacterial activity against at least one of the bacteria examined. Strain 2 has activity against *Staphylococcus aureus* with a zone diameter of inhibition 18 mm and the 7th strain against *Pseudomonas aeruginosa* of 07 mm inhibition zone and *Klesiella pneumonia* of 07 mm, *Candida albicans* 11 mm. On the other hand, the two strains 8 and 9 have activity against *Pseudomonas aeruginosa* with a 07 mm zone of inhibition.

While the 10th strain has propagated activity against *Pseudomonas aeruginosa* varying between 08 and 09 zone of inhibition and *candida albicans* with a diameter of 07 mm.

These same fungal strains showed no antimicrobial activity when using the well technique.

Tagma Cave may represent a promising opportunity for the isolation of microorganisms that produce bioactive substances.

Key words: Tagma Cave, Rocks, Swabbing, Mold, Antimicrobial activities.

Sommaire

Introduction.....	15
Revue bibliographique.....	18
1. Grottes.....	19
1.1 Introduction.....	20
1.2 Historique de la microbiologie des grottes	21
1.3 Ecologie microbienne des grottes.....	21
2. Les champignons.....	23
2.1 Généralités sur les champignons	24
2.2 Mode de vie des champignons	24
2.3 Ecologie des champignons.....	25
2.4 Identification des champignons	25
2.5 Le genre <i>penicillium</i>	25
2.6. Le genre <i>Aspergillus</i>	27
2.7 les métabolites secondaires des moisissures.....	28
2.7.1 Beta-lactamines.....	28
2.7.2 autre antibiotiques.....	29
2.7.3 les mycotoxines.....	29
2.8 Classification.....	29
3. les microorganismes tests	32
1. <i>Echerichia .coli</i>	33
2. <i>Enterococcus faecalis</i>	33
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	36
6. <i>Candida albicans</i>	37
7. <i>Bacillus subtilis</i>	38
Matériel et méthodes.....	39

1.	Echantillonnage	40
2.	Isolement des moisissures.....	43
3.	Identification des moisissures	43
	3.1 Observation macroscopique.....	43
	3.2 Observation microscopique.....	43
4.	Test d'activité antimicrobienne	44
5.	Criblage par la technique des cylindres d'agar.....	45
	5.1 Test d'activité antibactériennes.....	45
	5.2 Test d'activité antifongique.....	45
6.	Criblage par la technique des puits	46
	Résultats et discussion	47
1.	Isolement des moisissures.....	48
2.	Identification des moisissures	49
3.	Résultats de l'activité antimicrobienne.....	49
	Conclusion.....	58
	Références bibliographiques.....	61
	Annexes.....	68

Liste des tableaux

Numéro du Tableau	Titre	Page
1	Situation géographique de la station d'échantillonnage.	36
2	Les souches de référence.	40
3	Aspect microscopique et identification microscopique des souches isolés.	49
4	Les résultats de l'efficacité antimicrobienne des souches (application de la méthode des cylindres d'agar des moisissures).	51
5	Analyse des résultats des tests de sensibilité des bactéries aux antibiotique positif.	53
6	Résultats de la sensibilité à la nystatine de la levure (mm).	54

Liste des figures

Figure	Titre	Page
1	Modèles de ramification des conidiophores observés chez <i>Penicillium</i> . A. Conidiophores à phialides solitaires. B. Monoverticillé. C. Divariquer. D, E. Biverticillé. F. Terverticillé.G. Quaterverticillate (Visagie,2014).	26
2	Structure de base d'Aspergillus spp (Verma,2017).	28
3	Classification des champignons (Dufresne,2021).	30
4	<i>Escherichia coli</i> (Rabille , 2022).	33
5	<i>Enterococcus faecalis</i> (haberfeld , 2022) .	34
6	<i>Pseudomonas aeurginosa</i> (sheley , 2019) .	35
7	<i>Klebsiela pneumoniae</i> (cooper , 2020) .	36
8	Analyse microscopique électronique raster de <i>staphylococcus aureus</i> (carr,2001).	37
9	<i>Candida albicans</i> (Felix,2020) .	37

10	<i>Bacillus subtilis</i> (Félix,2020).	38
11	Carte d'algérie montrant la région d'échantillonnage (Belyagoubi et al.,2018).	40
12	Zone d'échantillonnage	41
13	Quelques photos à l'intérieure de la grotte.	41
14	Le prélèvement effectué par l'écouvillonnage (A), (B) : Zone d'écouvillonnage	42
15	Zone d'écouvillonnage (D) , prélèvements effectués par écouvillonnage (C)	42
16	Les boites d'écouvillonnage après ensemencement.	43
17	Méthode de scotch.	44
18	Test de l'activité antibactérienne par la technique de cylindres d'agar (Amara et Benchikh,2023).	45
19	Culture de <i>penicillium</i> sur milieu liquide (A) ; et filtration du milieu liquide (B).	46
20	Les photos montrent les champignons isolés de la grotte dans les milieux PDAac et CDAr .	48
21	Nombre des souches isolées après la purification des échantillons de la grotte.	49
22	Aspect macroscopique d' <i>Aspergillus</i> (A) ; <i>penicillium sp</i> (B;C;D;E)	51
23	Aspects microscopiques de <i>Penicillium</i> (A) ; et <i>Aspergillus</i> (B) (G×100).	51
24	Nombre de genres isolés à partir de la grotte.	53

25	Effet de la souche <i>Penicillium</i> sur <i>staphylococcus aureus</i> .	53
26	Effet de <i>Aspergillus</i> sur <i>candida albicans</i> .	53

Liste des abréviations

°C : Degré Celsius

µg : Microgramme

µL : Microlitre

OMS : Organisation Mondiale de Santé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

g : gramme

L : Litre

mm: Millimètre

pH : potentiel d'Hydrogène

Introduction

L'Algérie est un pays riche et vaste contenant une variété des écosystèmes : marin, montagneux, forestiers ..., parmi ces milieux extrêmes il y a les grottes qui peut être une source de microorganisme productrice des substances antimicrobiennes.

Selon l'Organisation mondiale de la santé, un manque important de nouveaux antibiotiques est constaté afin de combattre le risque grandissant de résistance aux antimicrobiens, ce qui constitue une urgence sanitaire mondiale (**Belyagoubi et al., 2018**).

Les microorganismes se trouvent dans tous les environnements de la biosphère, y compris dans les écosystèmes souterrains sombres et riches en nutriments (les grottes) (**Man et al., 2015**). Que c'est il est nécessaire d'examiner plusieurs grottes qui sont oligotrophes, ce qui implique qu'elles apportent un faible niveau de carbone organique. Étant donné cette situation, les microorganismes se disputent les nutriments et leurs capacités métaboliques sont améliorées par rapport à la production de substances bioactives qui inhibent la croissance d'autres microorganismes (**Belyagoubi et al., 2018**).

La majorité des publications des travaux sur les grottes sont consacrées aux champignons (**Djebbah et al., 2021 ; Jean-Jacques Delannoy, 2019 ; Belyagoubi et al., 2018**), ainsi qu'à la présence de cyanobactéries et d'algues dans les grottes ou les grottes exposées au soleil (**Lise Alonso et al., 2022**).

Les champignons sont des micro-organismes eucaryotes et hétérotrophes qui regroupent au moins 1,5 million d'espèces, dont la majorité ne sont pas identifiées malgré leur importance fondamentale dans la nature. Les champignons, en tant que décomposeurs essentiels des écosystèmes, jouent un rôle essentiel dans les processus biogéochimiques. Les modifications à l'échelle locale et mondiale ont un impact significatif sur le cycle élémentaire (**Man et al., 2015**). Les champignons ont un rôle crucial, surtout dans des conditions aérobies. Ils sont des habitants pionniers qui se trouvent partout à la surface des roches et dans des conditions extrêmement défavorables et dépourvues de nutriments, y compris dans les grottes.

De plus, ils sont d'une grande importance économique en raison de leur utilité et de leurs multiples activités néfastes : altérations des produits alimentaires et détériorations dans de nombreux autres domaines tels que la production de mycotoxines, la présence de parasites qui dépendent de l'homme, des animaux et des plantes. Par contre, les moisissures produisent de nombreuses substances complexes économiquement cruciales telles que des acides organiques, des alcaloïdes, des antibiotiques, des terpènes et des enzymes (**Labiod et Chaibras, 2015**).

Ces micro-organismes microscopiques génèrent une grande diversité de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont extrêmement bénéfiques pour l'homme et suscitent un intérêt majeur dans divers domaines tels que l'agriculture, la biotechnologie, l'environnement, la santé, etc (**Touati et Amor-Chelhi, 2016**).

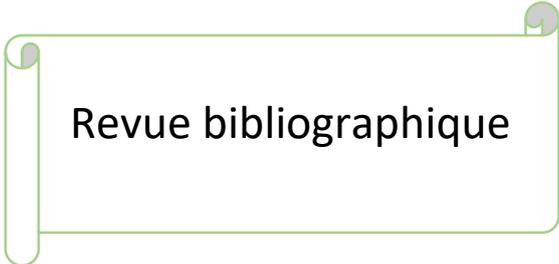
Dans cette perspective, notre intérêt se porte sur la quête de nouvelles molécules bioactives antimicrobiennes obtenues à partir de moisissures isolées de la Grotte Tagma de la wilaya de Tlemcen en tant qu'alternative à l'antibiothérapie.

Pour atteindre notre but, la méthode expérimentale consiste à :

- Isolement des moisissures à partir d'échantillons prélevés de différents endroits de la grotte.

- Purification et l'identification des isolats.

- Evaluation de la capacité des microorganismes choisis à agir contre des souches pathogènes.



Revue bibliographique

Chapitre 1
Les grottes

1. Grottes

1.1 Introduction

Les grottes sont des écosystèmes souterrains sombres et limités en nutriments (**Man et al., 2015**). Généralement, il s'agit d'une ouverture très étroite, et Souvent avec des ouvertures pointues et similaires, la pénétration n'est généralement possible qu'en rampant (**Malbos,1854**). Ces grottes servent d'abris temporaires aux chauves-souris, aux grillons, aux araignées et aux escargots, poissons et bien d'autres animaux, dont certains reste à découvrir (**Mizielinska,2018**).

Les grottes sont considérées comme des environnements extrêmes pour la vie, et les ressources sont souvent très limitées en raison du manque de lumière qui entrave la production primaire de matière organique. Cependant, les paramètres physiques ont tendance à être relativement doux, prévisibles et constants (**Diana et al .,2001**).

La spéléologie, ou « science des cavernes », est désormais populaire (**Fenixx, 1973**). Cela comprend l'exploration, la recherche, la cartographie ou la visite des cavités souterraines. Elle se pratique principalement dans des grottes naturelles formées de calcaire, mais aussi des cavités volcaniques ou glaciaires, des siphons ou des galeries souterraines creusées par l'homme (**DELUZARCHE,2018**). La plupart des grottes mettent 104 à 105 ans pour atteindre une taille traversable. De plus, les grottes peuvent être classées de diverses manières, surtout par la méthode de formation et le type de roche (**Palmer,1991**).

Les micro-organismes trouvés dans les grottes peuvent être originaires de la grotte ou avoir été introduits par les humains, les animaux, l'écoulement de l'eau et le vent. Les microbiomes trouvés dans les grottes comprennent des bactéries, des champignons, des protozoaires, des algues, des virus et des cyanobactéries. Toutefois, les bactéries et les champignons sont les micro-organismes prédominants. Les micro-organismes des grottes sont métaboliquement diversifiés et peuvent obtenir de l'énergie de manière indépendante grâce à des activités photoautotrophes, chimioautotrophes ou hétérotrophes. Différents groupes de micro-organismes interagissent également lors de la formation des grottes et dans le cadre des cycles biogéochimiques des éléments (**Raji et al.,2019**).

L'environnement de la grotte est le plus l'obscurité permanente, les facteurs géophysiques presque constants, une humidité élevée et un faible apport d'énergie sont les caractéristiques générales de la grotte.

La grotte est un milieu souterrain qui peut être divisé en quatre zones distinctes en fonction des caractéristiques constantes de ses paramètres géophysiques :

La *première zone* crépusculaire près de l'entrée, intensité lumineuse, humidité et température Chacun est différent. La *deuxième zone* de transition presque complètement sombre entre les changements d'humidité et de température. La *troisième zone* profonde d'obscurité totale avec une humidité. Cette zone semble occupée par des espèces spécialisées adaptées aux grottes.

La *quatrième zone* de stase complètement sombre avec 100 % d'humidité et presque pas de lumière. L'échange d'air et les concentrations de dioxyde de carbone peuvent devenir plus élevées (**Biswas,2009**).

Le caractère presque insolite et stérile des grottes a toujours incité les géomicrobiologistes à explorer les nobles micro-organismes qui s'y trouvent. Auparavant, les recherches dans ce domaine étaient limitées, mais récemment, de nombreux géomicrobiologistes se sont intéressés à l'étude de divers aspects de la microbiologie des grottes (**Biswas et Biswas, 2017**).

1.2 Historique de la microbiologie des grottes

Les premières études microbiologiques sur les grottes, qui reposaient principalement sur la culture et la microscopie, ont révélé que les micro-organismes s'étaient propagés dans les sédiments et l'eau. Avant 1990, en particulier de 1940 à 1960, était de nature descriptive, et les rôles écologiques et géologiques des micro-organismes ont commencé à devenir évidents (**Patton et Northup, 2007**). Au début des années 1990, de nouvelles techniques moléculaires ont permis aux microbiologistes de cibler les micro-organismes, quelle que soit leur aptitude de répondre à de nouvelles questions à l'interface de la microbiologie et de la géologie.

Les champignons des cavernes ont été étudiés pour la première fois à la fin du XVI^e siècle (**Scopoli, 1760**), les a décrits et a été frappé par leur transformation, qui apparaît comme des coraux marins et des crustacés.

1.3 Ecologie microbienne des grottes

Quand vous entrez dans une grotte, vous êtes immédiatement frappé par l'environnement inconnu dans lequel vous entrez alors que la lumière s'estompe et que l'air frais et humide vous entoure. En utilisant la lumière artificielle pour éclairer votre voyage dans cet environnement

majoritairement rocheux, vous pourriez penser qu'il n'y a pas de vie, mais les biologistes et les microbiologistes ont découvert une abondance de vie dans ces chambres rocheuses sous la surface de la terre. Les scientifiques ont aussi découvert que ces environnements abritent des organismes qui produisent des métabolites secondaires susceptibles d'être utiles aux humains **(Gabriel, Northup,2012)**. Parmi ces microorganismes on trouve un nombre énorme des bactéries (des *Actinomycètes...*) qui jouent un rôle important dans par exemple le maintien de ces écosystèmes souterrains en dominant la production primaire et en alimentant les cycles biogéochimiques **(Zhen zhu et al.,1726)**.

Ces bactéries peuvent aussi produire des métabolites secondaires présentent de fortes propriétés antimicrobienne, anti-inflammatoires ou anticancéreuse **(Kosznik -kwasnicka et al., 2022)**, on trouve également une grande diversité d'algues et de champignons vivant sur les murs de pierre et les spéléothèmes, dans les flaques de boue ou dans les sédiments **(Kosznik -kwasnicka et al., 2022)**.

Chapitre 2 :
Les champignons

1 .Généralités sur les champignons

Les champignons sont des micro-organismes eucaryotes, avec au moins 1,5 million d'espèces (**Hawksworth, 2001**). Dont la majorité n'est pas caractérisée malgré leur importance dans la nature (**Man et al., 2015**).

La variété fongique dans les grottes variait d'un habitat à l'autre, où dans les sédiments étant la plus élevée, suivis des roches altérées et des guanos de chauves-souris.

Les champignons sont cruciaux, surtout en conditions aérobies. Ils sont présents à la surface des roches et se trouvent dans des conditions extrêmement désagréables où il n'y a pas de nutriments disponibles, Incluant des cavernes (**Webstr et Weber, 2007**).

Les champignons sont des organismes eucaryotes unicellulaires ou pluricellulaires avec un noyau et utilisent le carbone organique comme source de carbone (ce sont des hétérotrophes). Leurs parois cellulaires contiennent généralement de la chitine et du glucane. Ils peuvent se reproduire de manière sexuée ou asexuée (**Dufrense ,2021**). Les spores produites peuvent aider à la dispersion des champignons, mais elles peuvent également aider l'organisme à survivre lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables. Leur mode de nutrition osmotrophe se base sur l'absorption en libérant d'abord des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Tous ces organismes sont hétérotrophes et manquent de chlorophylle (**Carlile et Watkinson, 1994**). Ils ne sont pas en mesure de produire de la photosynthèse. En termes structurels, il existe une grande variété de champignons. Ils appartiennent à deux catégories majeures : la forme levure unicellulaire et la forme mycélienne pluricellulaire construite à partir d'hyphes (**Redecker, 2002**).

Les champignons sont des chimiohétérotrophes, c'est-à-dire qu'ils utilisent du carbone organique comme source d'énergie, en termes métaboliques.

De plus, la plupart d'entre eux sont aérobies, mais certaines levures peuvent être aéro-anaérobies et impliquées dans les processus fermentaires (**Carlile et al., 1994**).

2 .Mode de vie des champignons

Pour assurer leur survie, ils adoptent l'un des trois modes de vie possibles :

- **Saprophytes** : ils tirent parti de supports végétaux ou animaux morts, décomposés ou en voie de décomposition, matière organique qu'ils dégradent et qu'ils contribuent de la sorte à recycler.

- **Parasites** : les champignons se développent au détriment des végétaux vivants et peuvent ainsi exercer un préjudice fatal à l'hôte.
- **Symbiotiques** : c'est le mode le plus élaboré d'échanges nutritifs entre la plante vivante et son champignon qui s'associent pour former une association mycorhizienne. Cette fois-ci la cohabitation est équilibrée et profitable pour chacun des deux associés (**Olivier et al.,1991**).

3. Ecologie des champignons

Les champignons sont répandus dans la nature et ont conquis presque toutes les niches écologiques (**Spiteller, 2015**). Les champignons sont totalement dépendants vis-à-vis du milieu pour leurs ressources nutritives et énergétiques. Cette dépendance intervient de nombreux facteurs : climatiques, saisonniers (rythmes biologiques), physicochimiques (substrat, type d'humus, acidité, etc.), biotiques (êtres vivants en relation dans le même milieu). Le regroupement déterminé de ces données définit l'habitat ou « niche écologique » d'un champignon au sein d'un biotope ou d'une biocénose souvent complexe (**Olivier et al.,1991**). Les plus répandues sont les *Penicillium* et les *Aspergillus* (**Florent,1993**).

4. Identification des champignons

Les moisissures sont principalement identifiées en se basant sur leurs caractéristiques culturelles et morphologiques, et rarement sur leurs caractéristiques biologiques. En général, il est nécessaire d'utiliser des environnements standards favorisant la croissance ou la reproduction, afin d'étudier la bonne expression des caractères (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, en particulier) (**Botton et al., 1990**).

Il existe diverses techniques pour détecter les moisissures, ce qui permet de contrôler efficacement l'environnement de production, les matières premières et les produits finis, et ce qui repose sur des observations macroscopiques et microscopiques (les techniques traditionnelles) sont généralement adaptées à ce contexte. Grâce à la spectrométrie de masse, il est possible d'identifier rapidement et à haut débit les champignons fongiques. Les techniques moléculaires offrent des identifications plus précises, tandis que les méthodes de séquençage comparatif multilocus sont plus performantes pour la discrimination des espèces que les méthodes de séquençage comparatif à locus unique (28S ou ITS) (**Carlotti,2014**).

5 .Le genre *Penicillium*

Il est indéniable que le *Penicillium* est l'un des genres fongiques les plus répandus, tant sur le plan géographique que sur le plan environnemental (**Nicoletti et al., 2012**). Ce type de

champignons regroupe des filaments, faisant partie du phylum des Ascomycètes. Environ 227 espèces font partie de ce genre, principalement définies en fonction des caractéristiques du thalle, des pénicilles et des spores (**Pitt, 1988**). L'un des champignons filamenteux microscopiques les plus fréquents dans le secteur agroalimentaire est ce type. Les espèces de *Penicillium*, en tant que mésophiles, sont plus favorables à des températures allant de 5°C à 37°C, avec une activité de l'eau comprise entre 0,78 et 0,88 et un pH compris entre 3 et 4,5. Leur présence se fait dans le sol, sur la végétation et le composé en décomposition, sur les aliments séchés, les épices, les céréales, sur les fruits et légumes frais, ainsi que dans l'air et la poussière. Ils peuvent aussi se former sur les parois des édifices, en particulier lorsque l'humidité des matériaux de construction est élevée (**Demjanova et al ., 2021**).

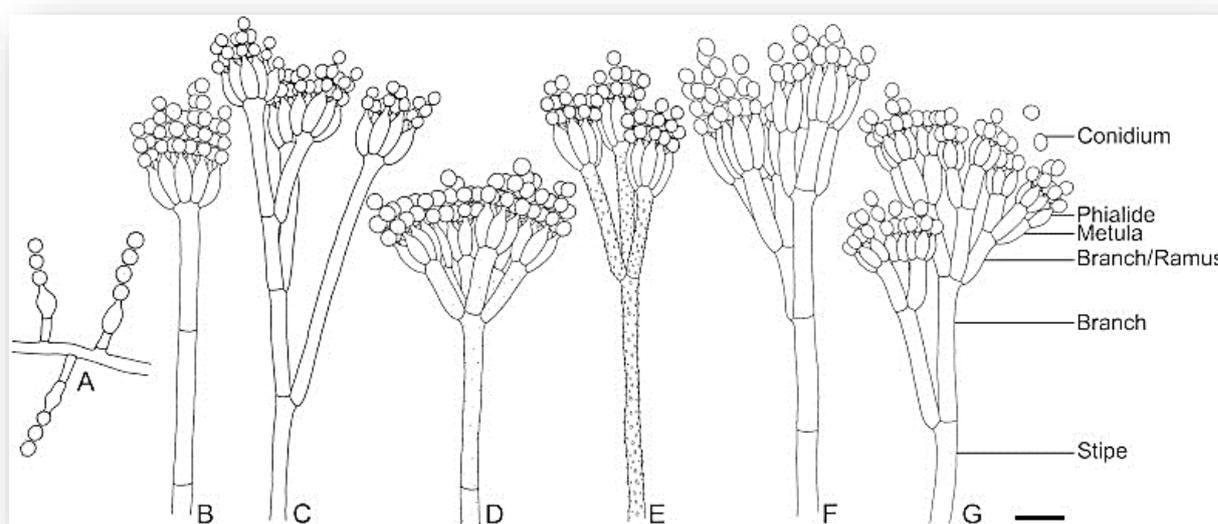


Figure 1 : Modèles de ramification des conidiophores observés chez *Penicillium*. **A.** Conidiophores à phialides solitaires. **B.** Monoverticillé. **C.** Divariquer. **D, E.** Biverticillé. **F.** Terverticillé. **G.** Quaternverticillate (**Visagie, 2014**).

Les conidiophores sont constitués de faisceaux lâches ou agrégés en coremies bien définies, lisses ou agranuleux, ou ramifiés, avec un pinicille à la fin. Selon le cas, il peut s'agir d'une simple verticille de simples phialides, d'une verticille de ramifications (metules) portant les phialides, ou de plusieurs de verticilles successifs comportant des metules et des phialides. Les caractéristiques des penicilles permettent de distinguer les groupes et les espèces (**Botton et al., 1990**).

Certaines espèces ont aussi des conséquences bénéfiques. L'industrie agroalimentaire utilise certaines espèces pour la fabrication de fromages spéciaux tels que le camembert ou le Roquefort. La production de pénicilline a joué un rôle majeur dans son impact et sa renommée, transformant ainsi les applications médicales (**Visagie,2014**).

6 .Le genre de *Aspergillus*

Classification

Division : Mycota

Sub division : Emycotina

Classe : Ascomycètes

Sous classe : Euascomycetidae

Ordre : Aspergillales

Famille : Aspergillaceae

Genre : *Aspergillus* (**Joshi,2013**).

Le genre *Aspergillus* comprend une variété de champignons qui sont parmi les plus abondants au monde (**Krijgsheld et al .,2013**).

Les espèces d'*Aspergillus* sont répandues et présentes sur une variété de substrats et dans presque tous les environnements spatiaux. Le genre comprend plusieurs centaines d'espèces de moisissures hautement aérobies, telles qu'*Aspergillus versicolor*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. nidurans* et *A. parasiticus*, entre autres. Ils ont une variété de couleurs, telles que le rouge, le jaune, le noir, le vert, etc. Des recherches continues ont révélé les caractéristiques morphologiques d'*Aspergillus* (**Zhang et al ., 2022**). Parmi lesquelles, la présence de conidiophores dressés, terminés par une vésicule supportant, soit une seule rangée de phialides(structure unisériée),soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées métules(structure bisériée).

L'aspergillose est une infection opportuniste qui affecte généralement les voies respiratoires inférieures et est causée par l'inhalation de spores du champignon filamenteux *Aspergillus* (**Nicard , 2018**), qui est fréquemment présent dans l'environnement. Les spores germent et se transforment en hyphae, qui pénètrent dans les vaisseaux sanguins et provoquent une nécrose et un infarctus hémorragiques en cas de maladie invasive. L'asthme, la pneumonie, la

sinusite ou une maladie systémique peuvent être associés aux symptômes. Le diagnostic dépend de l'imagerie, de l'histopathologie, de la coloration et de la culture des échantillons. Le voriconazole, le posaconazole ou l'isavuconazonium sont utilisés dans le traitement (Vergidis et al., 2023).

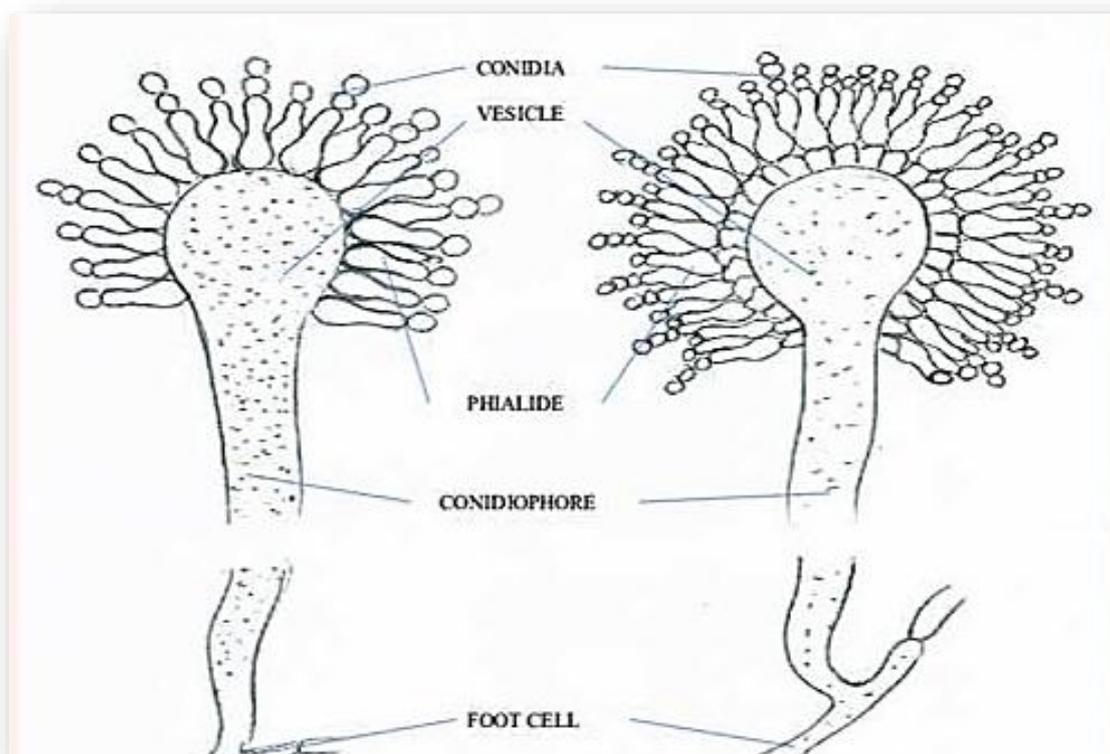


Figure 2 : Structure de base d'Aspergillus spp (Verma,2017).

7. Les métabolites secondaires des moisissures

Les moisissures peuvent parfois produire des métabolites secondaires après la période de croissance du champignon. Ils se démarquent des métabolites primaires tels que les produits de la glycolyse, qui jouent un rôle essentiel dans la vie de tous les êtres vivants.

Le métabolisme secondaire est extrêmement varié, Tous ne causent pas de dommages à l'organisme humain. Cela s'applique également aux Antibiotiques (Sidhu ,2002) : Environ 1600 des environ 10700 antibiotiques recensés dans le monde vivant proviennent de champignons.

a) Bêta-lactamines

La famille des bêta-lactamines comprend les pénicillines naturellement produites par *Penicillium chrysogenum* et les céphalosporines C produites par *Cephalosporium acremonium*. La formation de la paroi bactérienne est inhibée par ces molécules qui interviennent à la fin de la formation des peptidoglycane (**Botton et al., 1990**).

b) Autres antibiotiques

Les griseofulvines produites par *Penicillium griseofulvum* est responsable de l'activité de l'acide fusidique contre différentes bactéries gram +. *Fusidium coccineum* est responsable de l'inhibition de l'allongement des chaînes de protéines, tandis que certaines souches de *Penicillium jenseni* et *Penicillium nigricane* synthétisent la fumajilline. L'utilisation de l'antifongique Siccanine, produit par *helminthosporium siccans*, ainsi que de la variotine et de l'acide aspergillique synthétisés par *Aspergillus flavus*, et de la cerilenine produite par *Cephalosporium caeruleus*, est efficace contre différentes bactéries, levures et champignons. (**Botton et al., 1990**).

C) Les mycotoxines

L'expression « mycotoxine » provient du mot grec « mycos », qui signifie « champignon », et du latin « Toxicum », qui signifie « poison ». Les mycotoxines sont des substances qui peuvent avoir un effet toxique à des concentrations faibles (**Reboux et al., 2006**).

Différents types de moisissures sont reconnus pour leur capacité à produire des mycotoxines. *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Claviceps* sont parmi eux. Selon les conditions de culture, une même espèce de champignons peut générer différentes formes de mycotoxines, tandis qu'une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces de champignons différentes.

8 .Classification

Le mode de reproduction sexuée ou la phase téléomorphe (**Chabasse et al., 2002 ; Chabasse, 2008**) est utilisé pour classer les champignons. Il existe quatre catégories distinctes : Chytridiomycotina, Zygomycotina, Ascomycotina et Basidiomycotina. De plus, la division est appelée Deuteromycotina où la reproduction sexuée n'est pas connue qui sont des champignons imparfaits (**Blackwell et al., 1998**).

	DIVISION	CLASSE	GENRE
SEXUÉ	ZYGOMYCOTA (mucoromycotina)  zygospore	Ordre : MUCORALES	<i>Rhizopus, Mucor, Lichtheimia</i>
	ASCOMYCOTA  asque	SACCHAROMYCETES ASCOMYCETES	<i>Saccharomyces, Candida</i> <i>Arthroderma (= dermatophytes)</i> <i>Ajellomyces (= Histoplasma, Blastomyces)</i>
	BASIDIOMYCOTA  baside	TREMELLOMYCETES	<i>Filobasidiella neoformans</i> (= <i>Cryptococcus neoformans</i>)
ASEXUÉ		BLASTOMYCETES	<i>Candida, Cryptococcus, Rhodotorula, Trichosporon</i>
	FUNGI IMPERFECTI (DEUTEROMYCOTA) Attention! Classification taxonomique obsolète.	HYPHOMYCETES:	
		MONILIACEAE	<i>Aspergillus, Blastomyces, Coccidioides, Fusarium, Histoplasma, Microsporium, Trichophyton</i>
		DEMATIACEAE	<i>Alternaria, Cladosporium...</i>
	COELOMYCETES	<i>Phoma</i>	

Figure 3 : Classification des champignons (Dufresne,2021).

Les chytridiomycotina

Le Chytrid est un champignon aquatique doté d'un gros mycélium, ont peu ou pas de divisions (siphons). Les chytridiomycotina sont généralement unicellulaires et les seuls champignons qui possèdent des cellules mobiles au cours de leur cycle (les spores sont équipé de flagelles (Chabasse, 2008).

Basidiomycotina

La production des spores sexuelles, appelées basidiospores, formées par bourgeonnement située au sommet d'une cellule allongée, on l'appelle baside. Les basidiomycètes ont un thalle cloisonné dans lequel « Looping » au niveau de la partition (Chabasse *et al.*, 2002). Beaucoup

d'entre eux sont des parasites des plantes, d'autres sont les terribles opportunistes de l'humanité.

Zygomycotina

Mycélium sans cloisons. Reproduction asexuée le plus souvent par sporocystospores , reproduction sexuée par fusion de gametocystes .

Ascomycotina

Thalle a mycélium septe ou unicellulaire. Reproduction sexuée par formation de spores, reproduction asexuée par conidies.

Deuteromycotina

Thalle a mycélium septe ou unicellulaire. Pas de reproduction sexuée connue, reproduction asexuée par conidies et parfois absence (**botton et al.,1990**).

Chapitre 03
Les microorganismes tests

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, peut être soit mobile, soit immobile, Gram-négatives. On la retrouve dans la famille des Enterobacteriaceae, cette bactérie est aérobie-anaérobie facultatif. Elle est fine et allongée, avec des extrémités arrondies, et elle se déplace grâce à une ciliature péritriche (**LOBRIL J ,1998**), ce germe est non exigeant produit des colonies lisses, brillantes et uniformes sur une gélose de taille ordinaire.

On la retrouve dans le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux à sang chaud (35-43°C), avec une longueur de 2 à 4 µm et un diamètre d'environ 0,6 µm. (**Andysanabria, 2020**). Cependant, certaines souches de *E. coli* sont dangereuses car elles ont développé des caractéristiques de virulence. Selon les symptômes cliniques observés chez les patients, les souches de *E. coli* pathogènes sont classées en différents pathovars (ou pathotypes) (**Anses, 2019**). Le fait qu'il soit présent dans l'eau indique une contamination fécale, et ayant le potentiel de causer une maladie grave d'origine alimentaire.

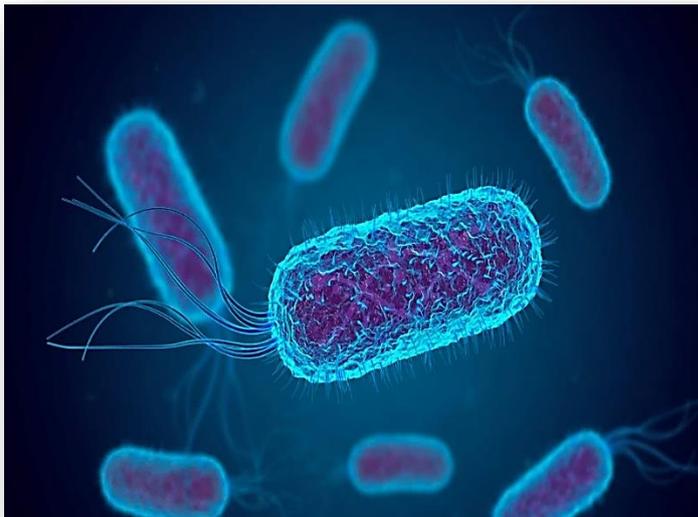


Figure 4 : *Escherichia coli* (**Rabille , 2022**).

2. *Enterococcus faecalis*

Les *Enterococcus faecalis* sont des micro-organismes à Gram positif ou des ellipsoïdes qui se trouvent en paires ou en chaînes courtes (**Karayasheva et Radeva, 2015**). Ils sont anaérobies facultatifs, immobiles et dépourvus de capsule (**stuck et al ., 2014**).

Ces germes sont peu exigeants et peuvent supporter des conditions difficiles, Ils peuvent également rester sur différentes surfaces pendant de longues périodes. Cependant (**Stuck et al ., 2014**), elle se caractérise par sa capacité à s'agglutiner, à adhérer aux surfaces et à former des biofilms, et est très résistante aux antibiotiques (**Karayasheva et Radeva, 2015**).

Les maladies les plus fréquentes les infections urinaires, les péritonites, les abcès intra-abdominaux, les bactériémies nosocomiales ou les endocardites peuvent être causées par ces germes (**stuck et al ., 2014**).



Figure 5 : *Enterococcus faecalis* (**haberfeld , 2022**) .

3. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est une espèce de bacille Gram négatif, qui présente une aérobie stricte et ne se fermente pas. Formé en bâtonnet, cette cytochrome-oxydase positive est mobile par des cils polaires, ce qui génère les pigments de fluorescéine et de pyocyanine (**Yvon,baysse,2002**). Sa participation à des infections opportunistes est principalement observée dans un environnement de soins intensifs. On observe une résistance naturelle de cette bactérie à de nombreux antibiotiques, ce qui restreint le nombre de traitements efficaces

(Bousquet,2018). Sont des êtres vivants communs du sol, de l'eau douce et des environnements marins (Yvon,baysse,2002).

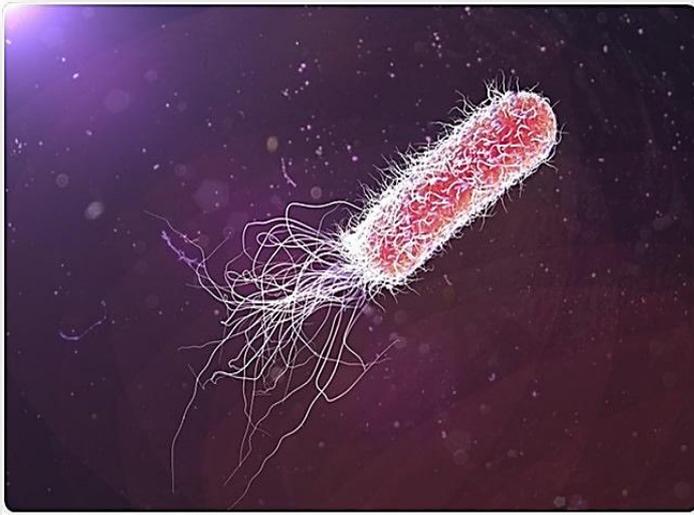


Figure 6 : *Pseudomonas aeruginosa* (sheley , 2019) .

4. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une bactérie Gram-négative de la famille des Enterobacteriaceae qui se présente sous la forme d'un bâtonnet, elle est immobile, non sporulée et a des facultés anaérobies (El Fertas-Aissani, 2012).En fermentant le lactose à l'aide d'une capsule visible (Beil et al.,2014), *klebsiella pneumoniae* opportuniste a un impact principal sur les individus dont le système immunitaire est affaibli.

L'espèce *K. pneumoniae* est présente partout, elle peut être éloignée de l'environnement (sols, eaux de surface, eaux usées, végétaux) ainsi que des activités humaines et animales (Kassis-Chikhani ,2012).



Figure 7 : *klebsiella pneumoniae* (cooper , 2020) .

5. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est une bactérie à Gram-positive qui présente une forme de cocci et a tendance à se former en amas. Les colonies sont généralement de couleur dorée ou jaune (aureus signifie doré ou jaune). Ces organismes ont la possibilité de se croître de façon aérobie ou anaérobie (**Taylor et unakol, 2023**).

Staphylococcus aureus demeure un agent pathogène majeur dans la société et les établissements hospitaliers, provoquant une morbidité et une mortalité importantes (**faster timathy,2002**). Il est souvent responsable d'infections de la peau et des tissus cutanés, ainsi que d'infections des articulations chez les enfants. Les cas de septicémie, d'endocardite infectieuse, de pneumonie, d'infections oculaires et d'infections du système nerveux central sont également caractérisés par la présence de *Staphylococcus aureus* (**ondusko et dawn ,2018**).

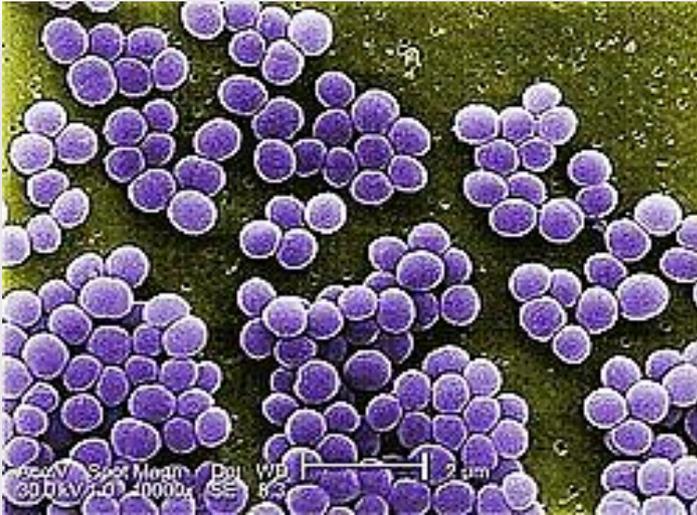


Figure 8 : Analyse microscopique électronique raster de *staphylococcus aureus* (carr,2001).

6. *Candida albicans*

Candida albicans est le champignon morbifique humain le mieux étudié et le plus courant (Judith,2012), qui peut se développer sous au minimum trois formes dissemblables: levure, pseudohyphes et hyphes. Il existe d'autres formes qui surviennent lors des changements de colonies (Sudbery et al ., 2004).

Elle peut causer des infections courantes et cliniquement significatives (niewerth , 2001) , allant d'infections cutanées superficielles à des infections systémiques virtuellement létales (Mayer et al ., 2013).

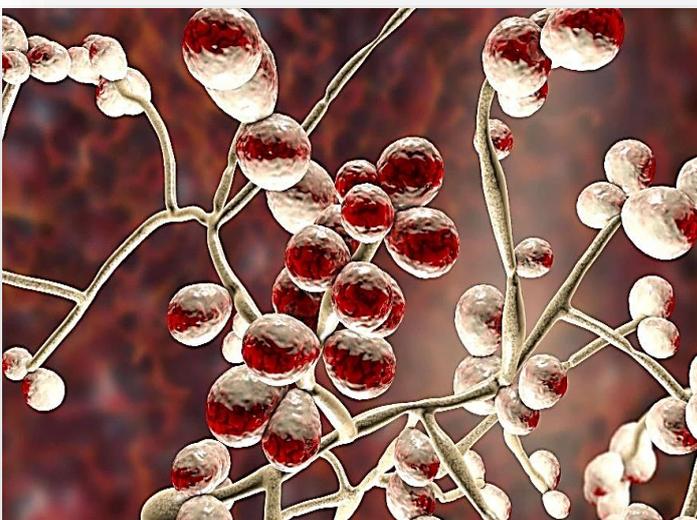


Figure 9 : *Candida albicans* (Felix,2020) .

7. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis est une bactérie Gram-positif célèbre pour sa capacité à se décomposer en spores métaboliquement désœuvrés et sa grande résistance aux stress environnementaux. (Lopezet *et al.* , 2008).

Est une espèce type pour étudier la division cellulaire, la ségrégation des protéines, la création de biofilm, fixation aux racines végétales ou aux hyphes fongiques, la production de métabolites secondaires, la libération de vésicules extracellulaire (kovacsakos,2019). Elle peut être isolée du sol ou d'autres environnements et présente différents avantages parmi lesquels la production des enzymes intéressantes pour l'industrie (Ray ,2016).



Figure 10 : *Bacillus subtilis* (Félix,2020).



Matériel et Méthodes

1 . Echantillonnage

Le 13 février 2024 à partir d'une grotte dans la région de Tagma (Gherf El mit) de la wilaya de Tlemcen (**figure 11**) , on a réalisé les prélèvements par écouvillonnage à partir des roches de cette nouvelle grotte (Tagma)(**figure 14**) .

Région	Altitude (mètre)	Latitude (N)	Longitude	Etage bioclimatique
Tlemcen	800	34° 55'	1° 20' ouest	Semi-aride

Tableau 1 : Situation géographique de la station d'échantillonnage.

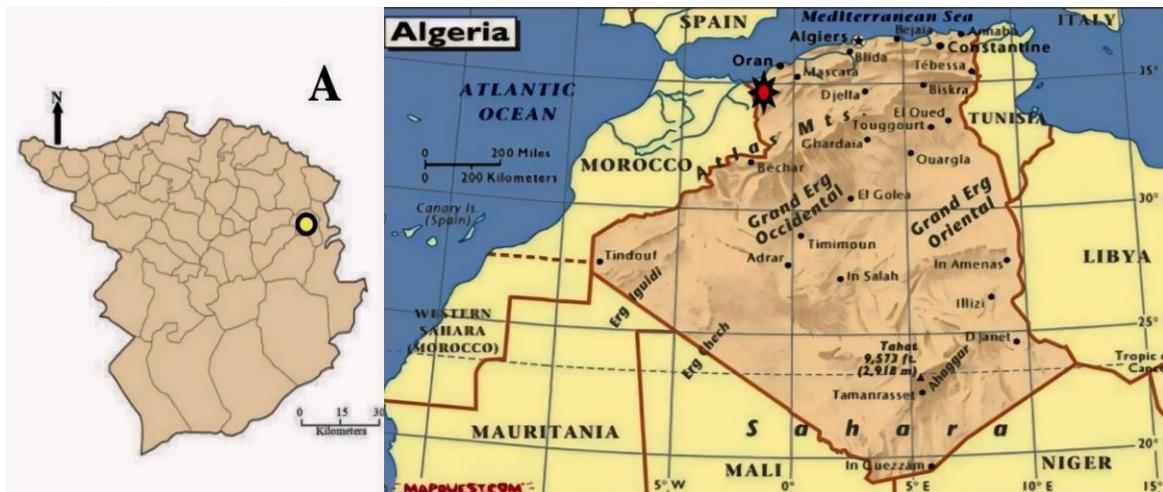


Figure 11 : Carte d'Algérie montrant la région d'échantillonnage (Belyagoubi et al.,2018).



Figure 12 : Zone d'échantillonnage .



Figure 13 : Quelques photos à l'intérieure de la grotte.



Figure 14 : Le prélèvement effectué par l'écouvillonnage (A) , (B) : Zone d'écouvillonnage .

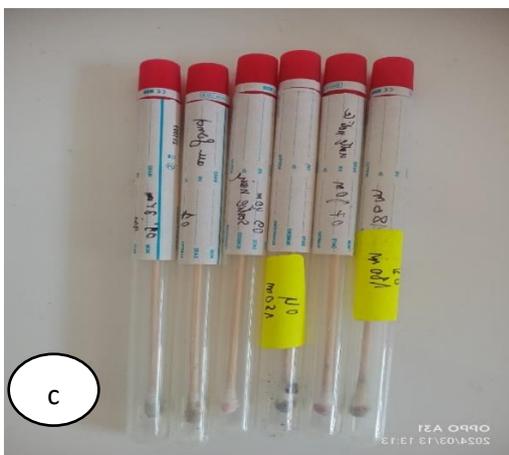


Figure 15 : Zone d'écouvillonnage (D) , prélèvements effectués par écouvillonnage (C) .

2. Isolement des moisissures

Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface de la gélose CDAr (Czapek Dextrose Agar rose bengal), de haut en bas, en stries serrées et on répète l'opération 3 fois, en tournant la boîte 45° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même (**Figure 15**).

L'incubation se fait à 25°C pendant 5 à 7 jours.

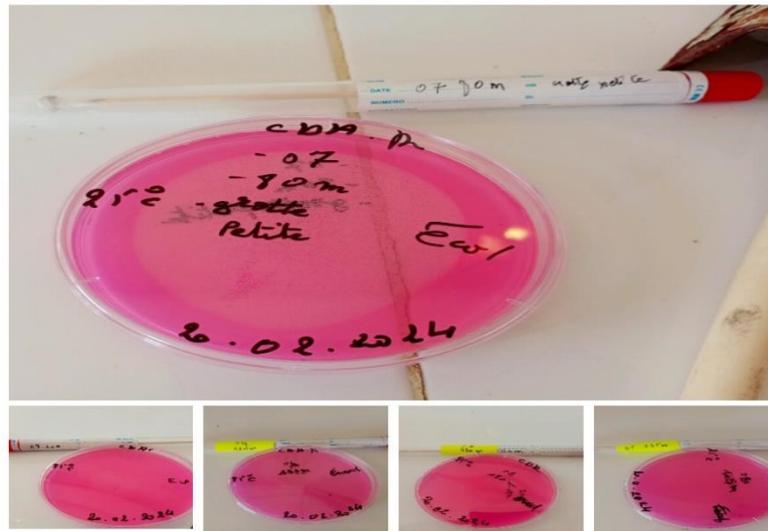


Figure 16 : Les boîtes d'écouvillonnage après ensemencement.

3. Identification des moisissures

3. 1 Observation macroscopique

La détection des espèces fongiques repose sur l'examen de critères de culture tels que le taux de croissance, ainsi que sur les caractéristiques morphologiques.

Il est composé de paramètres macroscopiques tels que l'apparence de la colonie, la couleur et la forme), ces caractères sont étudiés à l'œil nu.

3. 2 Observation microscopique

On effectue une identification microscopique en utilisant la méthode de scotch. Afin d'effectuer la méthode suivante, il est nécessaire d'appliquer une goutte à deux gouttes de bleu de coton sur une lame de verre (annexe). Ensuite, en utilisant un ruban adhésif (scotch), il est nécessaire de découper un morceau, de l'appliquer sur la colonie de moisissure et de le déposer sur la lame. Finalement, l'observation est réalisée à l'aide d'un microscope optique avec des grossissements allant de $\times 10$ à $\times 40$ (**Figure 16**).

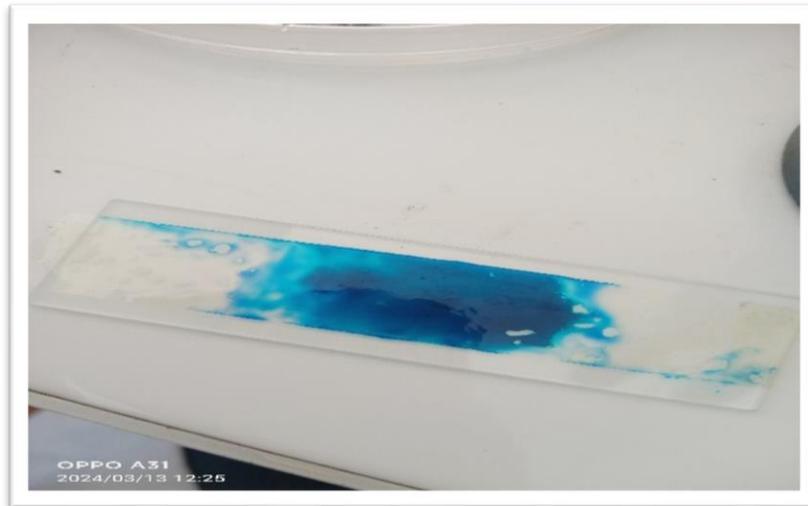


Figure 17 : Méthode de scotch.

4. Teste d'activité antimicrobienne

Les souches de références mentionnées dans le tableau ont été employées pour effectuer les tests d'activité antimicrobienne.

	Microorganismes	Gram	Code
Bacteries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 29213
	<i>Bacillus Subtilus</i>		ATCC 6633
	<i>Enterococcus faecalis</i>		ATCC 29212
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
	<i>Escherichia coli TEM-1</i>		ATCC 35218
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 700603
Levures	<i>Candida Albicans</i>		ATCC 10231

Tableau 2 : Les souches de référence.

5. Criblage par la technique des cylindres d'agar

Des disques de papier filtre, imbibés par 10 µl de l'ampicilline.

5.1. Test d'activité antibactériennes

Les moisissures isolées qui ont été ensemencées en stries serrées sur le milieu PDA (Potato Dextrose Agar), sont incubées pendant 5 jours à 25°C, nous allons faire des cylindres (6 mm), en les prenant et en les déposant sur la surface de Muller Hinton qui est déjà ensemencée par les bactéries tests à l'aide d'un écouvillonnage par des stries très serrées, et on les laisse dans le frigo pendant 2 à 4 heures à 4°C (Genovese *et al.*, 2013), et après les incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures (Belyagoubi *et al.*, 2018).

5.2. Test d'activité antifongique

Les mêmes étapes sont répétées, mais dans ce cas application pour *Candida albicans* et la préculture sur bouillon Sabouraud, alors que l'ensemencement est réalisé sur la gélose Sabouraud, et incubé 24 h à 48h à 37 °C.

Remarque : inoculum réalisé pour toutes les souches de référence, via d'une culture de 24 h, et calibré par le bouillon de milieu Muller Hinton stérile, sauf que *Candida albicans* est calibré par Sabouraud, pour une densité optique (0,08-0,1) et longueur d'onde de 625 nm (Normes CLSI, 2021).

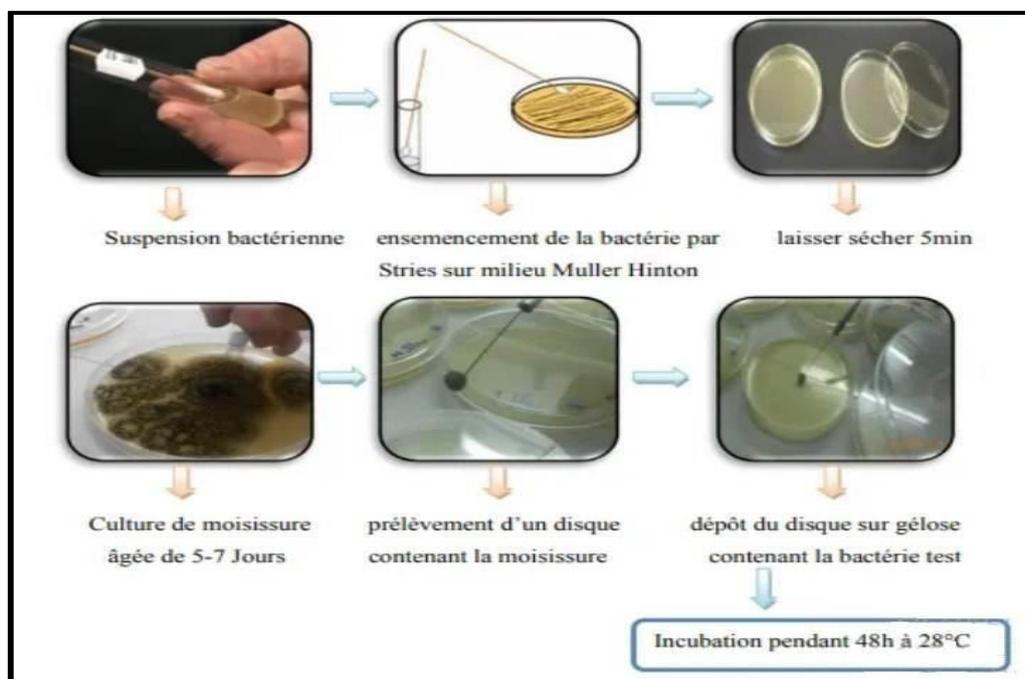


Figure 18: Test de l'activité antibactérienne par la technique de cylindres d'agar (Amara et Benchikh, 2023).

6. Criblage par la technique des puits

La culture des champignons a été réalisée en milieu liquide de PDB (Potato Dextrose Broth), incubation à 25°C pendant 14 jours. On va faire à l'aide d'un écouvillon l'ensemencement des bactéries tests sur la surface de milieu Mueller Hinton, et laissée sécher pendant 5min, après creusés des puits de 9 mm et les remplis par 200 µL de filtrat, puis on laisse les boîtes à température ambiante pendant 30 min, puis les incubées à 37°C pendant 18 à 24 H.



(B)

(A)

Figure 19 : Culture de *Penicillium* sur milieu liquide (A) ; et filtration du milieu liquide (B).



Résultats et Discussion

1. Les champignons

1.1 Isolement des moisissures

Toutes les souches isolées en CDAr. On a identifié 10 souches de moisissures à partir des roches, on a procédé à la purification en repiquant la souche sur le milieu PDAac jusqu'à ce qu'elle soit pure (**Figure 21**).

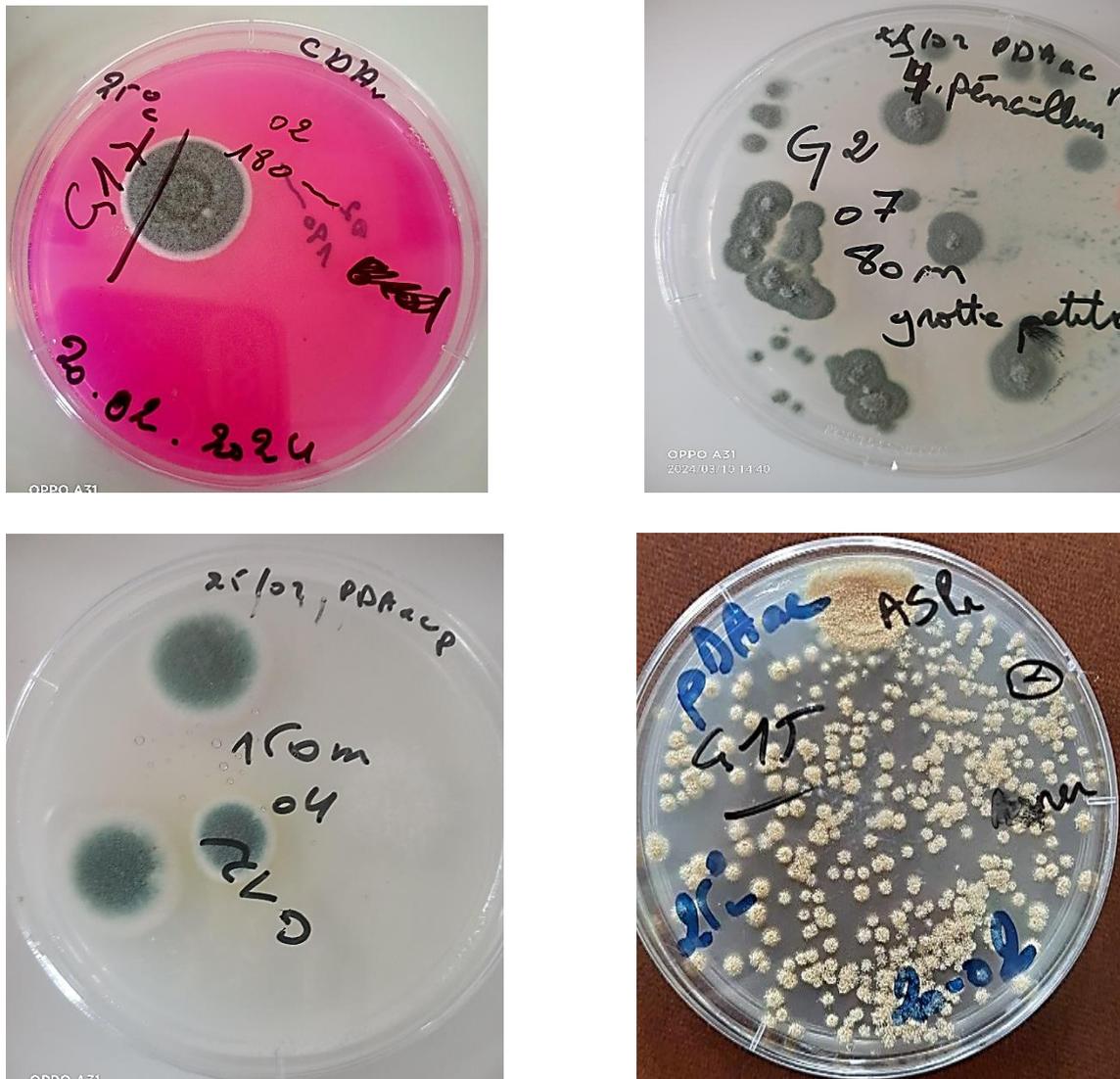


Figure 20 : Photos montrent les champignons isolés de la grotte dans les milieux PDAac et CDAr.

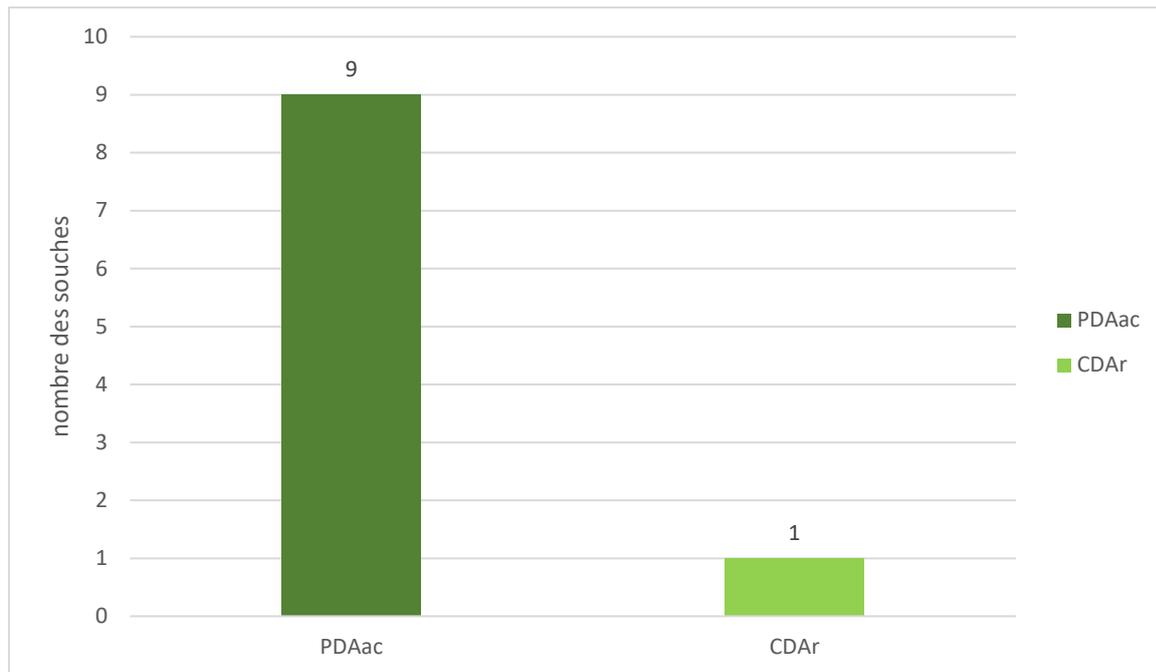


Figure 21 : Nombre des souches isolées après la purification des échantillons de la grotte.

Le nombre de souches isolées après la purification des échantillons de la grotte dans différents milieux est illustré dans la **figure 21**. On observe un nombre important de souches fongiques (09/10) dans le milieu PDAac, suivi par le milieu CDAr avec une estimation de 1 moisissure.

Les conditions de culture sur PDA semblent être avantageuses, lorsque le champignon croît et se développe, il conserve son aspect nuageux et cotonneux, ainsi que sa couleur blanche, même après une période d'incubation prolongée, et à des températures allant de 4°C à 20°C (**ALAOUI et al.,2022**).

Sur le milieu PDA, on a observé une croissance optimale des moisissures. La croissance d'un champignon est lente et dense, ce qui permet au mycélium de bénéficier des ressources nutritives du substrat.

2. Identification des mycètes

Les souches sont identifiées en se basant sur les observations :

Observation macroscopique : cette méthode permet de définir la teinte de la colonie pendant son développement (**Lamarche – Perrin et al., 2011**).

Observation microscopique : Qui peut détecter la présence du thalle, la présence ou l'absence de septum, le mode de production, ainsi que les caractéristiques des fructifications et des spores (**Jacquet et al., 1963**).

(A)

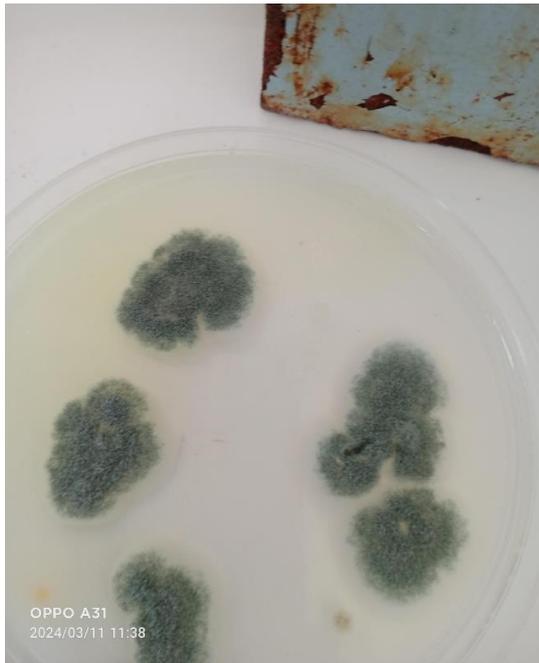


(B)

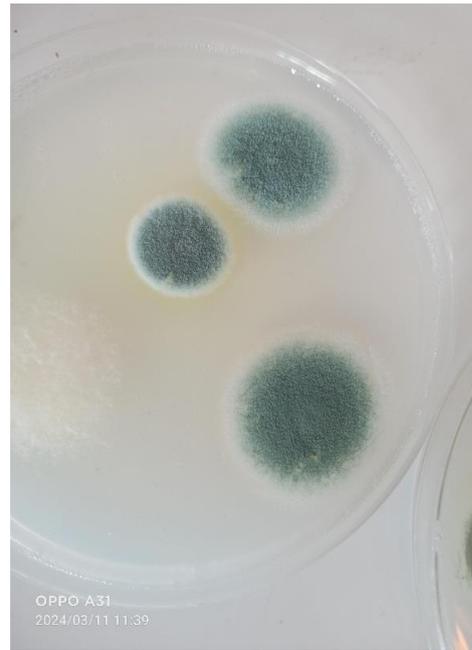


(C)



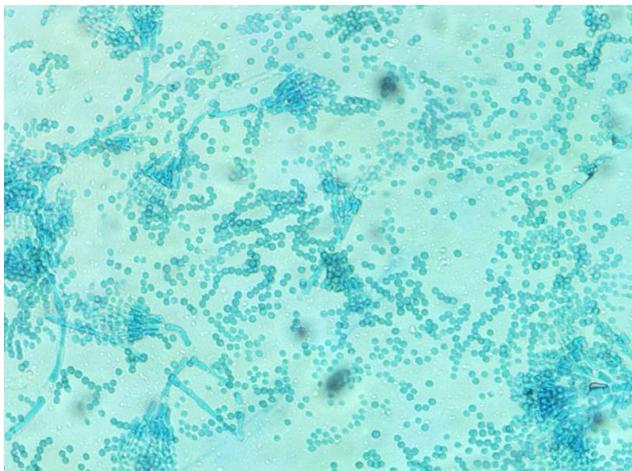


(D)

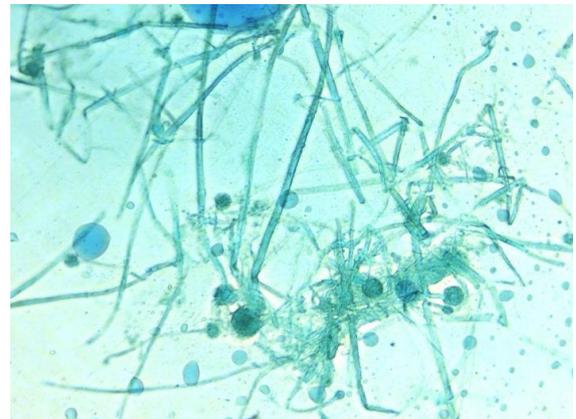


(E)

Figure 22: Aspects macroscopique d'*Aspergillus* (A) ; *Penicillium* (B;C;D;E) .



(A)



(B)

Figure 23 : Aspects microscopique de *Penicillium* (A) ; et *Aspergillus* (B) (G×100).

Tableau 3 : Aspect macroscopique et identification microscopique des souches isolées.

Code de la souche	Milieu /prélevement	Aspect macroscopique	Aspect microscopique
G2	Ecouv . ≈80 m PDAac	Colonie laineux (Poudre verte)	<i>Penicillium</i>
G2	Ecouv .≈ 80 m PDAac	Colonie jaune	<i>Aspergillus</i>
G11	Ecouv ; ≈150 m PDAac	Colonie laineux (Poudre verte)	<i>Penicillium</i>
G12	Ecouv ; ≈150m PDAac	Colonie verte entourée par une zone blanche	<i>Penicillium</i>
G13	Ecouv ; ≈150 m PDAac	Colonie laineux (Poudre verte)	<i>Penicillium</i>
G15	Ecouv ;≈ 60m PDAac	Colonie jaune	<i>Aspergillus</i>

G17	Ecouv ; ≈ 180 m CDAr	Colonie verte entourée par une zone blanche avec des pores	<i>Penicillium</i>
G28	Ecouv ; ≈ 145m PDAac	Colonie laineux (Poudre verte)	<i>Penicillium</i>
G29	Ecouv ; ≈ 145m PDAac	Colonie laineux (Poudre verte)	<i>Penicillium</i>
G30	Ecouv ; ≈ 145 m PDAac	Colonie verte entourée par une zone blanche	<i>Penicillium</i>

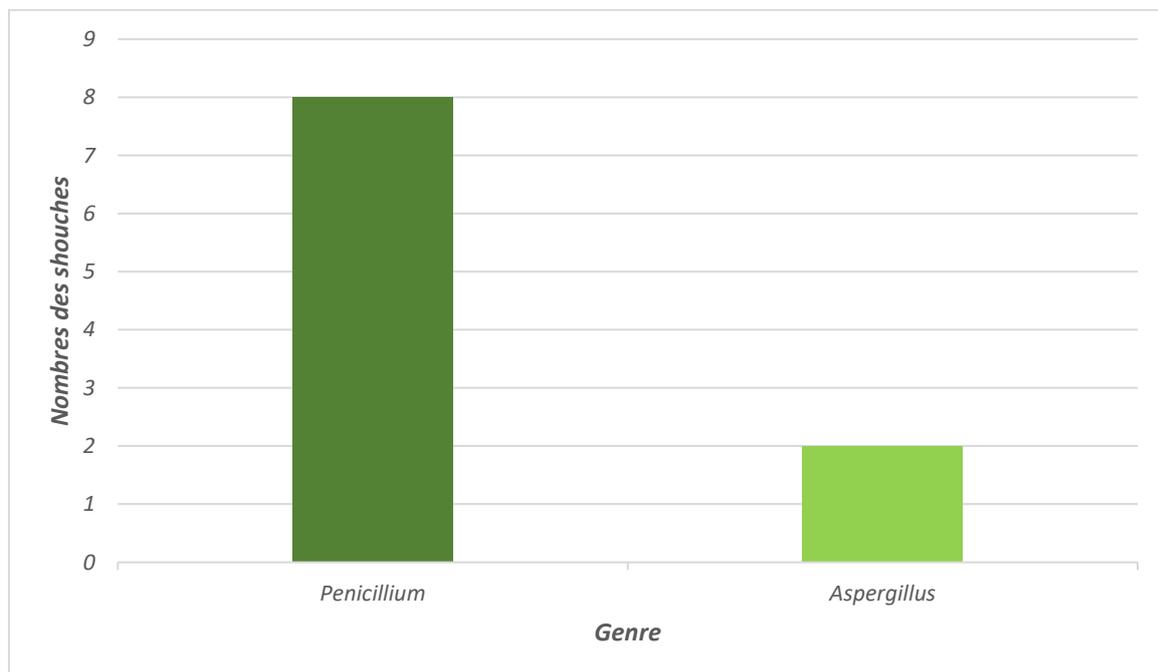


Figure 24 : Nombre de genres isolés à partir de la grotte.

La représentation graphique indique que le genre prédominant est *Penicillium*, avec 8 isolats sur 10 souches, suivi par le genre *d'Aspergillus*, Le moins répondu est d'environ 2 isolats.

L'étude microbiologique des grottes a révélé la présence d'une population bactérienne (**Gounot, 1970**), et la croissance de nouvelles moisissures est principalement liée au changement climatique (**Etienne, 2008**). De plus, les résultats concordent avec ceux rapportés par plusieurs auteurs qui soulignent la présence constante de *Penicillium* dans la mycoflore de diverses régions du monde.

Selon les études menées par **Isuru Priyaranga Silva et al., (2021)**, sont identifiées les espèces suivantes dans la grotte de Gneissique (Sri Lanka) : *Penicillium panissaguineum*, *Penicillium cremeogriseus*, *Aspergillus bertholletius*.

D'autres résultats de l'extraction des champignons de la grotte de Lascaux ont révélé que les débris organiques sont souvent recouverts de conidies d'*Aspergillus*, de *Penicillium* et de *Mucor* Min (**1988**).

D'après les conclusions de **Kholkhal (2006)**, la majorité des échantillons du sol de la grotte d'Ain Fezza ont été identifiés en tant que des *Penicillium*.

D'après les conclusions de **Zekri et Rahmani (2017)**, la plupart des moisissures détectées dans la grotte de Honaine (Tlemcen) font partie du genre *Penicillium* (3/9). Cependant, lors de notre étude, le genre prédominant est *Penicillium* (8/10), donc ce résultat est cohérent avec notre étude.

D'après les conclusions de **Belyaghoubi et al., (2018)**, 38 isolats des champignons filamenteux ont été prélevés à partir de la grotte de Chaabe (wilaya de Tlemcen). Parmi les espèces trouvées : Le genre *Penicillium sp* (60,53%) et *Aspergillus sp* (7,89%).

Selon les recherches menées par **Djebbah Fatima Zohra (2016)**, sur la grotte dans la région de Tlemcen (Tagma), que le genre majoritaire est *Penicillium* avec un nombre de 6 souches sur 8 isolats, donc il est le plus rencontré dans le sol, tandis que les autres espèces sont les moins répondus.

Selon les recherches menées par **RAHMANI Nadia (2017)**, à partir de la Grotte Kaws – Honaine que le nombre majoritaire est *Penicillium* avec un nombre de 3 souches sur 9 isolats, donc il est le plus rencontré dans le sol, tandis que les autres espèces sont les moins répondus.

3. Résultats de l'activité antimicrobienne

Tableau 4 : Les résultats de l'efficacité antimicrobienne des souches (application de la méthode des cylindres d'agar des moisissures).

Diamètre de la zone d'inhibition (mm) sur les bactéries test								
N° d'isolat	Les souches fongique	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
1 (G12)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	–	–	–	–
2 (G2)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	18±0	–	–	–
3 (G13)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	–	–	–	–
4 (G30)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	–	–	–	–
5 (G11)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	–	–	–	–
6 (G29)	<i>Penicillium</i>	–	–	–	–	–	–	–
7 (G15)	<i>Aspergillus</i>	07±0	–	07±0	–	–	11±0	–
8 (G17)	<i>Penicillium</i>	07±0	–	–	–	–	–	–
9 (G28)	<i>Penicillium</i>	07±0	–	–	–	–	–	–
10 (G8)	<i>Aspergillus</i>	8,5±0,71	–	–	–	–	07±0	–

(-) : pas d'activité

Remarque : les souches fongique (9/9) dans la technique des puits, aucun résultat positif n'a été marqué (pas d'activité antimicrobienne).

Le test d'activité antibactérienne des isolats à révéler que 5 souches présentent une activité antibactérienne sur au moins une des bactéries tests, et les souches 7,8,9,10 ont une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, les souches 7,10 développé activités contre *Candida albicans*, et la souche 7 développe une activité contre *klebsiella pneumoniae*, et la souche 2 développée une activité contre *Staphylococcus aureus* (**Tableau 4**).

On connaît que les souches de *Penicillium* produisent une substance antibactérienne (**Botton et al., 1990**). Il est également connu que les espèces *Aspergillus* et *Penicillium* sont les principaux réservoirs de ces substances.



Figure 25 : Effet de la souche *Penicillium* (G2) sur *Staphylococcus aureus* ATCC.



Figure 25 : Effet d'*Aspergillus* (G15) sur *Candida albicans* ATCC.

Tableau 5 : Analyse des résultats des tests de sensibilité des bactéries aux antibiotiques positif.

Méthode	Puits			
Souches ATB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Amp	07±0 (R)	07±0 (R)	7,5±0,71 (R)	07±0 (R)

Amp : Ampicilline

R : Résistante : selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de la Microbiologie en 2022.

Tableau 6 : Résultats de la sensibilité à la nystatine de la levure (mm).

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

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

Les résultats suivants montrant que *Candida albicans* présente une sensibilité à la nystatine (**Tableau 6**).

Selon les recherches menées par **Belyaghoubi et al., (2018)**, un total de 23 souches de *Penicillium* a été choisies pour évaluer leur capacité à agir contre des micro-organismes pathogènes. Le *Penicillium spp* examiné a démontré une activité antimicrobienne envers au moins un micro-organisme, les micro-organismes ont été testés avec des agents à base de cylindres d'agar (à l'exception de *P. aeruginosa*, qui est la plus résistante), ce qui suggère que ces champignons produisent un certain type de substance(s) antimicrobienne(s) qui inhibent les micro-organismes testés. Les souches actives ont démontré une activité inhibitrice significative contre les micro-organismes pathogènes, avec des diamètres d'inhibition allant de 7,5 à 26 mm. La plus grande efficacité a été observée contre *C. albicans*, avec une inhibition de 43,38 % des souches (10/23).

Selon les recherches menées par **Isuru Priyaranga Silva et al ., (2021)**, seuls (3/8) isolats fongiques testés (SKW 301, SKW 404 et SKW407) ont démontré au moins une activité antimicrobienne contre un agent pathogène. Par conséquent, la souche de champignons du l'isolat fongique de la paroi de la grotte SKW 407 a montré une activité antimicrobienne contre *S. aureus* à Gram positif, tandis que le plafond de la grotte SKW 301 et le du mûr de la grotte SKW 404 ont montré une activité antimicrobienne contre *P. aeruginosa*. L'activité antimicrobienne des isolats a été démontré contre *E. coli*, *C. albicans* et *C. parapsilosis*.

Suite à l'étude menée par **Pipite et ses collègues (2022)** sur une grotte en Fidji, 34 isolats de la grotte étudiée présentaient des zones moyennes qui inhibaient la croissance de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Klebsiella pneumoniae* , Et le *Bacillus cereus*. En général, parmi les 34 isolats bioactifs, 50% des isolats des cavernes ont démontré une activité inhibitrice contre *Staphylococcus aureus*, 47 % contre *Streptococcus aureus*, 50% contre *Enterococcus faecalis*, 32 % contre *Klebsiella pneumoniae* et 41 % contre *Bacillus cereus* pour chaque pathogène considéré. Deux souches (W14 et W43) ont montré une forte inhibition (allant de 37 mm à 39 mm) contrairement à quatre agents pathogènes, à l'exception de *Bacillus cereus*.

Selon les recherches menées par **Djebbah Fatima Zohra (2016)**, sur la grotte dans la région de Tlemcen (Tagma), des isolats a révélé que 4souches présentent une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test et les souches S12, S14 ont une activité contre *S. aureus*, cependant, les souches S12, S13, S14, S15ont développées l'activité antibactérienne sur *C.albicans* et les souches S12 et S 15 ont développé une activité contre *M. luteus*.

Selon les recherches menées par **RAHMANI Nadia (2017)**, à partir de la Grotte kaws – Honaine des isolats a révélé que 4 souches présent une activité antibactérienne sur au moins, une des bactéries test et les souches S10, S17, S18 et S19 ont une activité contre *M.luteus*. Cependant, les souches S17 et S18 ont développées l'activité antifongique sur *C.albicans* et les souches S17, S22 et S23 ont développé une activité contre *B.subtilis*.



Conclusion

La résistance aux antibiotiques est l'une des menaces les plus importantes pour la santé à l'échelle mondiale. La résistance microbienne augmente rapidement en même temps que la découverte de nouveaux traitements diminue.

Le but de ce travail est de découvrir des moisissures à activité antibactériennes et antifongiques dans les roches de la nouvelle grotte de Tagma dans la wilaya de Tlemcen.

La recherche sur les caractéristiques microscopiques et macroscopiques des moisissures nous a permis d'identifier 10 souches choisies de différents genres, avec le champignon le plus répandu étant *Penicillium* (08/10) et *Aspergillus* (02/10).

L'identification est effectuée essentiellement, en se basant sur des critères morphologiques et physiologiques propres à un environnement particulier.

Pour sélectionner les souches qui produisent des métabolites antimicrobiens, divers milieux tels que CDAR et PDAac, ainsi que diverses techniques telles que la technique des cylindres d'agar et la technique des puits sont utilisés. Ces techniques ont également été utilisées pour démontrer leurs capacités inhibitrices.

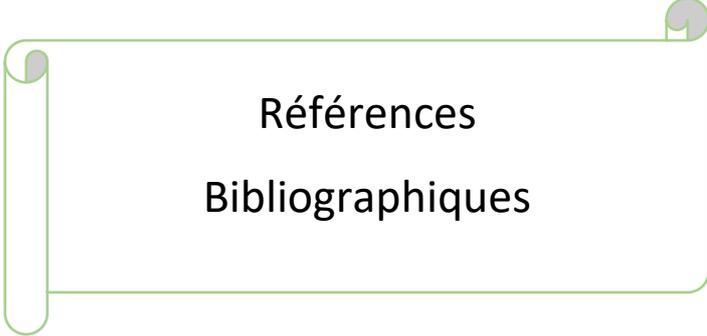
Les tests d'activité antibactérienne des souches isolées ont montré que 5 souches présentaient une activité antibactérienne contre au moins une des bactéries testées, avec des zones d'inhibition allant de 07 à 18 mm (technique du cylindre d'agar).

Les résultats obtenus dans cette étude nous laissent penser que les grottes algériennes constituent une source intéressante pour l'évaluation, le développement et la découverte de nouvelles souches microbiennes ayant une puissante activité antimicrobienne contre les pathogènes, afin d'utiliser leurs métabolites antimicrobiens pour des applications médicales et pharmaceutiques, telles que des probiotiques et dans l'industrie agroalimentaire, comme conservateurs.

Pour compléter ce sujet sur la flore fongique nous proposons :

- ✓ Réaliser une étude plus approfondie de la biodiversité des sites de prélèvement.
- ✓ Identification moléculaire des souches obtenues et l'analyse de la nature des substances antimicrobiennes par des méthodes performantes.
- ✓ Identifier les molécules produites.
- ✓ Recherche d'espèces produisant des métabolites (enzymes, antibiotiques, etc.) d'importance industrielle et biotechnologique.

✓ Evaluation de d'autres activités biologiques des souches fongiques isolées.



Références
Bibliographiques

(A)

Anses. (2019). *Escherichia coli* Entérohémorragiques (EHEC). Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments.

Andysanabria. (2020). *Echerichia coli*. Fundamentos de microbiologia de alimentos.

ALAOUI, K. chafik, Z. khoulati, A. mikdam, H. saalaoui, E. kharmach, E. (2022). Effets de différents milieux de culture sur la croissance Et la conservation in vitro de *Phytophthora* infestans. *Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires*, 10(2), 244-252.

AMARA, S. BENCHIKH, M. (2023). Isolement des moisissures productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Grotte D'Ighzer – Timimoun. Université ABOUBEKR BELKAID – TLEMCEM, faculté des sciences de la nature et de la vie, et sciences de la terre et de l'univers. 81P.

(B)

Botton, B. Breton, A. Fevre, M. Gauthier, S. Guy, Ph. Larpent, P, J..... (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle (paris milan Barcelone Mexico).

Biswas, J. (2010). Kotumsar Cave biodiversity: a review of cavernicoles and their Troglotrophic traits. *Biodiversity and conservation*, 19(1), 275-289. DOI: 10.1007/s10531-009-9710-7.

Bie, I. Zhao, Y. Liu, C. Chen, Z. Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Medicine Ltd*, 9(9), 1071-1081.

Biswas, D., & Biswas, J. (2017). Major Deteriorative, Pathogenic and Beneficial Fungi Reported from Various Subterranean Caves of the World: A Mini Review. Doi : X 5923 je 2017070102.

Bousquet, A. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* : résistance aux antibiotiques, lecture et interprétation de l'antibiogramme. Département des laboratoires, Hôpital d'instruction des Armées Bégin. Doi : 10.1016/S2211-9698(18)67954-3.

Belyagoubi, L. Belyagoubi-Benhammou, N. Jurado, V. Dupont, J. Lacoste, S. Djebbah, F(...). (2018). Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria. *International Journal of Speleology*, 47(2), 189-199.

(C)

Carlile, M. J., Watkinson S.C. *The Fungi*. (1994). (Academic Press eds).

Carr, M.J. (2001). *Staphylococcus aureus*. <https://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/mikrobio/forschungsschwerpunkte/staphylococcus-aureus/>.

Chabasse D., Bouchara J.P., DE Gentile L., Bruns S., Cimon B., Penn P. (2002). Les Moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n°25, Bioforma. 159p.

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

Carlotti, A. (2014). Identification des moisissures. *urafin idmyk*, (42) 11.

Cooper, J. (2020). Clearance of Klebsiella bacteria and its symptoms.

(D)

Deluzarche, C. (2018). Spéléologie : qu'est-ce que c'est ?. Journaliste, (1979-2021).

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.

Dufresne, P. (2021). Identification des champignons D'importance Médicale. Laboratoire de santé publique du Québec.

Demjanová, S. Jevinová, P. Pipová, M. Regecová, I. (2021). Identification of *Penicillium verrucosum*, *Penicillium commune*, and *Penicillium crustosum* Isolated from Chicken Eggs. 9, 53. <https://doi.org/10.3390/pr9010053>.

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.

(E)

Etienne, J. (2008). La grotte de Lascaux sauvée d'une attaque par les champignons.

El Fertas-Aissani R., Messai Y., Alouache S., Bakour R. (2012). Virulence profiles and Antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different Clinical specimens. PATBIO-3048 ; No. Of Pages 8.

(F)

Florent. J. (1993). Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriels. Ed. Lavoisier Tec et Doc. 612p.

Fostert imothy, J. (2002). Aureus staphylococcus. Microbiologie médicale moléculaire, 839-888.

Felix, M, J. (2020). Bacillus subtilis : how it affects thé pharmaceutical in dastry . Bibliothèque des microorganismes pharma.

(G)

Gabriel, C, R. Northup, D, E. (2012). Microbial ecology : caves as an extr habitat.Cave microbiomes : a novel resource for drug discovery, 85-108, 2012.

Genovese, G. Romeo, O. Morabito, M. Alessi, D. Criseo, G. Faggio, C. (2013). Activity of ethanolic extracts of *Asparagopsis taxiformis* against the major Molecular types of *Cryptococcus neoformans/C. gattii* complex.Department of Biological and Environmental Sciences, University of Messina, Viale F. Stagno d'Alcontres, 31, 98166 Messina, Italy,7(21),2662-2667,DOI : 10.5897/AJMR2013.5423.

(H)

Hawksworth D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity : the 1.5 million species estimate revisited. Mycol. Res. 105 1422–1432. 10.1017/s0953756201004725.

Haberfeld,I.(2022).Enterococcus faecalis : définition, urine, est-ce grave ?.<https://sante.journaldesfemmes.fr/>.

(J)

Jacquet, J. Boutibonnes, ph. cicile, J. (1963). Observation sur la toxicité d'Aspergilluse clavatus pour les animaux.Bulletin de l'academie vétérinaire de France, 116(4),199-208.

Joshi,R.(2013). Aspergillus.M.sc bio science (Micro) 09924113838 surat , Gujarat.

(K)

Kassis-chikhani, n. (2012). klebsiella pneumoniae pathogene nosocomial resistance et virulence ,l'universite pierre et marie curie paris 6 .

Krijgsheld, p. Bleichrodt, R. Veluw, G. Wang,F. Müller, W. Dijksterhuis, J. Wösten ,A. (2013).Études en mycologie 74 (1), 1-29.

Karayasheva, D. Radeva, E. (2015). Importance of Enterococci (*Enterococcus faecalis*)For Dental Medicine – Microbiological characterization, Prevalence and Resistance.International Journal of Science and Research (IJSR),6(7),2319-7064.DOI : 10.21275/ART20175821 .

Kovasakos, T. (2019). subtilis bacillus. Tendances en microbiologie,27(8),724-725.

Kosznik-Kwaśnicka, K. Golec, P. Weronika , J, D. Lubomska , L .(2022). Into the unknown : microbial communities in caves, their role, and potential use.Microorganisms 10 (2), 222.

(L)

LOBRIL JR . (1998). Réévaluation du modèle de croissance de Monod : effets des antibiotiques sur l'énergie de maintenance. Thèse de l'université de Lyon I France , 42-77.

Lopez,k,D. Vlamakis, M . Roberto. (2008).Génération de plusieurs types de subtilis cellules chez bacillus.Revues de Microbiologie, 33(1), 152-163.

Lamarche -perrin, R. Demageau, y. Vincent, J. (2011). Observation macroscopique et émergence dans les SMA de très grande taille. Jfsma,53(62).

LABIOD, F. CHAIBRAS, S. (2015). Isolement, identification et activité antibactérienne des moisissures d'un sol forestier a Constantine.Université des Frères Mentouri Constantine ,Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.74p.

(M)

Malbos, M. (1854). Les grottes du Vivarais (l'académie impériale des sciences, inscriptions et belles-lettres de Toulouse).

Man, B. Wang, H. Xiang, X. Wang, R. Youn,Y. Et Gong, L. (2015). Phylogenetic diversity of culturable Fungi in the Heshang Cave, central China. Front. Microbiol. 6 :1158.Doi : 10.3389/fmicb.2015.01158

Mizielinska , A.(2018). Les grottes.

(N)

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

Niewerth, k. (2001). Phospholipase de candida albicans . Thy coses, 44(9-10),361-367.

Nicoletti,R. Buommino,E. Tafuno, A.(2012).patenting Penicillium strains.2Department of Experimental Medicine, the Second University of Naples, Via De Crecchio 7, I-80100 Napoli, Italy.

Nicard ,Q.(2018). Aspergillose. Journaliste scientifique .

(O)

Olivier, M, J. Laborde, J. Guinberteau, J. Doitou, N. (1991). La culture des champignons (Armand colin éditeur, 103, bd Saint Michel). 75240 paris cedex 05.

Ondusko, N, S, Dawn. (2018). Aureus staphylococcus. Revue de la pédiatrie, 39 (9), 287-298.

(P)

Pitt, J. (1988). Laboratory guide to common *Penicillium* species, Academia Press editor, London.

(R)

Redecker D. (2002). New views on fungal evolution based on DNA markers and the fossil. *Research in Microbiology*. 153 : 125-130.

Reboux, G. (2006). Mycotoxins : health effects and relationship to other organic compounds. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* ,46, 208-212.

Ray, M, C. (2016). *Bacillus subtilis* : qu'est-ce que c'est ?. Journaliste.

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.

Raji, R. O., Oyewole, O. A., Ibrahim, O. H., Tijani, Y. N., & Gana, M. (2019). Microbial Communities and activities in caves. *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 6(14), 557-564. DOI : 10.21472/bjbs 061407.

Rabille, H. (2022). Comment la bactérie *Echerichia coli* fabrique son bouclier. *Microbiologie*.

(S)

Sudbery, B, P. Grow, N. Judith. (2004).les états morphogénique albicans distincts de *Candida* . *Tendances en microbiologie*, 12(7), 317-324.

Stucki, K. Harbarth, S. Nendaz, M. (2014). Infections à entérocoques : du plus simple au plus complexe. Service de médecine interne générale Département de médecine interne, Réhabilitation et gériatrie, *Revue Médicale Suisse* , www.revmed.ch.

Spiteller, p. (2015). Chemical Ecology of Fungi. *Natural Product Reports*, DOI : 10.1039/c0xx00000x , www.rsc.org/xxxxxx

Sheley, P, H. (2019). Quorum Sensing and *Pseudomonas aeruginosa*.

(T)

TOUATI, R. AMOR-CHELIHI, L. (2016). Isolement et Identification des Moisissures d'une Zone Aride. Mémoire master, Université des Frères Mentouri Constantine , Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. 51p

Taylor, T, A. Unakal, C, G. (2023). Infections à staphylocoques aureus. National library of médecine.

(V)

Verma, A, K. (2017). *Aspergillus* and Cervicovaginal Papanicolaou Smear. *International Clinical Pathology Journal* 4(2), DOI :10.15406/icpjl.2017.04.00086.

Vergidis ,P.(2023). *Aspergillose* . Mayo Clinic College of Medicine & Science.

(W)

Webstr, J. weber, B. (2007). *Introduction to Fungi*(Published in the United States of America by Cambridge University Press, New York).www.cambridge.org/9780521807395.

Wibbelt, G. Kurth, A. Hellmann, D. Weishaar, M. Barlow, A. Veith, M.(2010). White-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in Bats, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 16 1237–1243. 10.3201/eid1608.100002.

(Y)

Yun, Y., Xiang, X., Wang, H., Man, B., Gong, L., Liu, Q., ... & Wang, R. (2015). Five year monitoring of bacterial communities in dripping water From the Heshang Cave in Central China : implication for paleoclimate reconstruction and ecological Functions. *Geomicrobiology Journal*, 33(7), 1-11. DOI : 10.1080/01490451.2015.1062062 . <http://dx.doi.org/10.1080/01490451.2015.1062062> .

(Z)

Zhen Zhu,H. Zhang, Z.Zhou, Z. Cheng-Ying Jiang Bao-Jun Wang Lei Cai.(1726).des com Zhang, S.Meng, Z. Zhao, G. Wu, H. Cao,F.(2022).*Aspergillus versicolor* as a source of diversified metabolic products with pharmacological activities. *Studie in natural productry chemistry*, volume (74),225-277.



ANNEXES

Composition des milieux de culture**Potato Dextrose Agar (PDA) :**

On met 200 g de la pomme de terre, laver et couper en petits morceaux dans 700 ml d'eau distillée et porter à ébullition après filtrer et compléter à 1L :

Saccharose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Czapek Dextrose Agar (CDA):

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

Rose bengal :

Rose bengal	1 g
Eau distillée	100 ml

Lactophénol

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

Bleu de coton

Lactophénol

Bleu de méthylène 0,5 g

Sabouraud

Peptone de gélatine 10 g

Glucose 20 g

Agar 17 g

Eau distillée 1000 ml

pH 7,2