

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur en

Sciences de la Mer

Option: Biotechnologie Marine

Thème:

**Caractérisation et effet antimicrobien des biomolécules
produites par des micromycètes marins du port d'Alger**

Présenté par:

OULDKHELIFA Ikram

Soutenu le: 03 / 11 / 2021 devant le jury composé de:

Mr. BOUAICHA F	Maître-Assistant A	ENSSMAL	Président
Mme.ALOUACHE S	Maître de conférence A	ENSSMAL	Examinatrice
Mme.BENTCHIKOU L	Maître Assistante A	ENSSMAL	Examinatrice
Mme.BOURABAIN F	Maître Assistante A	ENSSMAL	Promotrice
Mme.AISSOU-AKROUR C	Maître de conférences B	ENSSMAL	CO-Promotrice

Année universitaire: 2020/2021

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la Vie

Filière: Hydrobiologie Marine et Continentale

Spécialité: Biotechnologie Marine

Caractérisation et effet antimicrobien des biomolécules produites par des micromycètes marins du port d'Alger

Présenté par:

OULDKHELIFA Ikram

Soutenu le: 03 / 11 / 2021, devant le jury composé de:

Mr. BOUAICHA F	Maître-Assistant A	ENSSMAL	Président
Mme.ALOUACHE S	Maître de conférence A	ENSSMAL	Examinatrice
Mme.BENTCHIKOU L	Maître Assistante A	ENSSMAL	Examinatrice
Mme.BOURABAIN F	Maître Assistante A	ENSSMAL	Promotrice
Mme.AISSOU-AKROUR C	Maître de conférences B	ENSSMAL	CO-Promotrice

Année universitaire: 2020/2021

DEDICACES

A mes parents,

Tarek et Leila TAHARI

Pour m'avoir donnée les moyens de réussir et m'avoir toujours encouragée. Quoi que je fasse, je ne pourrais vous rendre ce que vous avez fait pour moi. Si je suis arrivée là c'est bien grâce à vous.

Merci pour votre éducation, les valeurs que vous m'avez transmises, votre présence et votre amour depuis toujours. Je vous aime.

A mes sœurs,

Asma et Sarah

Pour leur soutien moral dans les moments les plus difficiles, merci pour tous vos encouragements. Je vous souhaite toute la réussite et le bonheur que vous méritez. Bon courage pour ces années à venir et sachez que je serai toujours là pour vous.

A mon frère Mohamed Islem,

Merci pour tous les moments de joies que tu m'as apporté mon petit ange.

A mes chers grands-parents. Ainsi qu'à toute ma famille.

Merci pour votre présence.

A mes amies,

Leila, Farah et Nada. Habiba, Billal Pour votre soutien et votre encouragement.

Merci d'être toujours là pour moi.

REMERCIEMENTS

*Ce travail rentre dans le cadre de la préparation de la thèse de **Mme F.BOURABAINÉ**.*

*Je tiens tout d'abord à manifester toute ma gratitude à **Mme F.BOURABAINÉ** maître assistance A à l'ENSSMAL, ma promotrice, Pour sa patience, sa responsabilité, de sa bienveillance, ses précieux conseils et ses encouragements durant ce travail. Ainsi que le temps qu'elle a consacré à m'apporter des outils méthodologiques indispensables à la conduite de cette initiation à la recherche.*

*J'exprime également toute ma reconnaissance à Mme **C.AISSOU** maître conférences B à l'ENSSMAL. Pour son encouragement et ses orientations.*

*Je tiens à remercier **Mr F.BOUAICHA** pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail en acceptant de le présider.*

*Je voudrais ensuite remercier **Mme S.ALOUACHE** et Mme **L.BENTICHIKOU** membres de mon jury, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de la microbiologie de l'ENSSMAL, je remercie **Mr N.DJERRAI**, **Mr Y.MAATOUK** et **Mme HOUDA**. Pour l'ambiance chaleureuse du travail et l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de la durée de la réalisation de la partie pratique de mon travail.*

*J'exprime mes sincères reconnaissances pour **Mr T.BENAYAD** chef de service qualité alimentaire et contrôle environnemental du pour son accueil au sein du laboratoire de la police scientifique de CHATEAUNEUF. Ainsi que toute son équipe.*

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	1
LISTES DES FIGURES	1
LISTE DES TABLEAUX	2
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I	3
SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES	3
I. 1. Mycologie	4
I.1.1 Historique	4
I.1.2. Caractères généraux.....	5
a- Les moisissures utiles	5
b- Les moisissures nuisibles	5
I.1.3. Classification des champignons.....	6
I.1.3.1. Chytridiomycotina	7
I.1.3.2. Zygomycotina	7
I.1.3.3. Ascomycotina	7
I.1.3.4. Basidiomycotina	7
I.1.3.5. Deuteromycotina	7
I.1.4. Propriétés principales des champignons.....	8
I.1.5. Champignons filamenteux.....	8
I.1.5.1. Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux	8
I.1.5.3. Mode de reproduction	10
I.1.5.3.1. Une reproduction asexuée	10
I.1.5.3.2. Une reproduction sexuée	10
I.1.5.4. Croissance	11
I.1.5.5. Facteurs influençant le développement des champignons filamenteux	11
I.1.5.5.1. Facteurs intrinsèques (physico-chimique)	11
I.1.6. Mycologie marine.....	14
I.1.6.1. Champignons marins	14
I.2. Définition des lipides	17
I.3. Champignons marins et leurs activités biologiques	18
a- Les métabolites primaires	18
b- les métabolites secondaires	19
CHAPITRE II	20
MATERIEL ET METHODES	20
II.1. Matériel biologique	21

II.1.1 Source des souches répertoriées dans cette étude.....	21
III.1.1.1. Origine et conservation des souches –LA MYCOTHEQUE-	21
II.2. Repiquage	23
II.3. Purification.....	23
II.4. Conservation	23
II.5. Identification des micromycètes filamenteux	23
II.5.1. Observation macroscopique.....	24
II.5.2. Observation microscopique.....	24
II.6. Criblage des souches pour l'identification de l'espèce par la méthode OSMAC.....	25
II.7. Fermentation en milieu liquide.....	26
II.8. Extraction des métabolites à partir des filtrats fongiques issu après fermentation.....	29
II.8.1. Extraction liquide-liquide.....	29
II.9. Identification des métabolites par Chromatographie sur Couche Mince CCM	32
II.9.2. Mode opératoire	32
II.10. Activité antibactérienne	33
II.10.1. Réactivation des souches bactériennes.....	33
CHAPITRE III.....	35
RESULTATS ET DISCUSSION	35
III .1. Description et illustration des deux genres étudiés.....	36
III.1. 1. Genre <i>Aspergillus</i> / Section <i>Aspergelli</i>	36
III.1.1.2. Classification	36
III.1.2. Genre <i>Penicillium</i>	49
III.1.2.1. Généralités.....	49
b.Penicillium sp 02	52
III.2. Extraction et identification des métabolites obtenus à partir des filtrats fongiques obtenus après fermentation	54
III.3. Étude de l'activité antimicrobienne <i>in vitro</i> des micromycètes filamenteux par la méthode de diffusion des disques.....	58
CONCLUSION	68
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	71
ANNEXES	77
Résumé.....	80

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Les trois domaines du vivant selon WOESE et <i>al.</i> , (1977).	4
Figure 2. Classification des mycètes (champignons) d'après BLACKWELL et <i>al.</i> , (1998).	6
Figure 3. Structure d'un hyphes et son développement vers la formation d'un mycélium: (A), hyphes coenocytique ; (B), hyphes cloisonnées (CHABASSE et <i>al.</i> , 2002).	9
Figure 4. Cycle de vie des moisissures.	10
Figure 5. Les deux modes de reproduction chez les champignons (CARLILE & WATKINSON, 1994).	11
Figure 6. Mode de reproduction des champignons marins.	15
Figure 7. Carte du port d'Alger avec les sites de prélèvement.	21
Figure 8. Fermentation pendant 15 jours à 25 °C.	27
Figure 9. L'étape de filtration sur papier filtre (0.45µm) des gazes.	28
Figure 10. Étape de centrifugation.	28
Figure 11. Schéma représentant le protocole d'extraction des lipides (RUIZ, 2007).	30
Figure 12. Extraction liquide-liquide.	31
Figure 13. Evaporation des solvants par rotavapeur.	31
Figure 14. Principaux caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i> . (CHABASSE et <i>al.</i> , 2002).	36
Figure 15. Courbes de croissance des souches <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Aspergillus terreus</i> ,	41
Figure 16: <i>Aspergillus terreus</i> 01, (A,B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose GN25, CYA, MEA, CZ, PDA incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.	44
Figure 17: <i>Aspergillus terreus</i> 02, (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose PDA, CYA, GN25, CYAs, MEA, CZ incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.	45
Figure 18: <i>Aspergillus terreus</i> 03, (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose CYA incubé à 37°C, MEA, CYAs incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.	46
Figure 19. <i>Aspergillus sp.</i> , (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose MEA, CYAs, CYA, GN25 incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.	47
Figure 20: <i>Aspergillus Eurotium</i> , (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose CYA incubé à 37°C, CZ, MEA, PDA, CYAs incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.	48
Figure 21: Schéma général de l'organisation des pinces de <i>Penicillium</i> , utilisé dans l'identification d'après SAMSON et COLL A: monoverticillé, B: terverticillé, C: biverticillé... ..	50
Figure 22: <i>Penicillium sp</i> 01, (A,B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose GN25, CYA, MEA, CZ, PDA incubé à 25°C, CYA incubé à 37°C	51
Figure 23: <i>Penicillium sp</i> 02, (A,B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose GN25, CYA, MEA, CZ, PDA incubé à 25°C et CYA incubé à 37°C de droite vers la gauche respectivement.	52
Figure 24: <i>Penicillium chrysogenum</i> , (A,B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose GN25, CYA, MEA, CZ, PDA incubé à 25°C et, CYA incubé à 37°C, de droite vers la gauche respectivement.	53
Figure 25. Résultats des taches apparues après la révélation par des cristaux d'iode.	54
Figure 26. Résultats de la chromatographie du système (chloroforme 'méthanol 90/10 v/v) après la deuxième révélation par l'acide phosphomolybdique.	55
Figure 27. Inhibition, in vitro du développement d'une souche bactérienne par des souches fongiques	59

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Illustration de quelques propriétés principales des champignons	8
Tableau 2. Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement ...	12
Tableau 3. Tableau récapitulatif représentant le lieu, la date et la matrice des souches étudiées dans la présente étude.....	22
Tableau 4. Composition des milieux de culture utilisés dans la méthode OSMAC	26
Tableau 5. Composition des milieux de fermentation utilisés	27
Tableau 6. Germes tests de référence et leurs milieux sélectifs utilisés dans le présent travail. .	33
Tableau 7. Taxonomie des <i>Aspergillus</i>	36
Tableau 8. Caractères cultureux du genre <i>Aspergillus</i>	37
Tableau 9. Caractères macroscopiques du genre <i>Aspergillus</i>	38
Tableau 10. caractères microscopiques du genre <i>Aspergillus</i>	43
Tableau 11: Classification du genre <i>penicillium</i>	49
Tableau 12: Caractères cultureux du genre <i>Penicillium</i>	50
Tableau 13. Signification des codes cité sur la figure 27.....	55
Tableau 14: Couleur des taches des extraits avant et après la révélation par l'acide phosphomolybdique.	56
Tableau 15. Résultats de l'extraction des métabolites primaires.	57
Tableau 16. Résultats de la chromatographie par solvant: chloroforme/méthanol.....	57
Tableau 17. Le poids des extraits.....	58
Tableau 18: les quatre groupes des isolats fongiques en fonction du diamètre de la zone d'inhibition.	59
Tableau 19: Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les souches testées après 24h d'incubation.	60
Tableau 20: Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les souches testées après 48h d'incubation.	63
Tableau 21. Tableau récapitulatif des espèces fongiques potentiellement actives.....	69

LISTE DES ABRÉVIATIONS

%: Pourcentage

°C: Degre Celsius

AW: Activité de l'eau (Activité water)

BN: Bouillon Nutritif

CH₄: Méthane.

Cétr: Cétrimide

Cf: Conformément

CCM: Chromatographie sur Couche Mince

CO₂: Dioxyde de carbone

CYA: Czapek + Extrait de levure (Czapek Dextrose Agar).

CYA s: Czapek Yeast Autolysate agar 5% NaCl

CZ: Czpeck dox liquide (Cz).

D: Débris.

ELL: Extraction liquide-liquide,

EM: Eau de mer

g: Gramme

GM: Antibiotique Gentamicine

GN: Gélose Nutritive

GN25: Gélose au nitrate de glycérol 25% (en anglais: Glycerol Nitrate Agar).

GPY: Glucose Yeast Peptone agar

E.F 1: extrait fongique 1

E.F 2: extrait fongique 2

LBCM1: Laboratoire de Biologie Cellulaire et Moléculaire 1

h: heure

HNO₃: Acide nitrique.

MC: Macconkey

MEA: milieu gélosé d'Extrait de Malt.

MH: mueller hinton

MgCl₂: chlorure de Magnésium.

ml: Millilitre.

mm: Millimètre

MP: Moule du port

Na Cl: Chlorure de Sodium

NaOH: Hydroxyde de Sodium

NH₃: Ammoniac

nm: nanomètre

OD: Oxygène dissout

OP: Oursin du port

OSMAC: One Strain-Many Compounds

PDA: Gélose dextrose à la pomme de terre (Potato Dextro Agar)

pH: Potentiel Hydrogène.

UV: Ultra-Violet

v: volume

SB: Slanetz and Bartley agar

SM: Sédiments marins.

SP: Sédiment profonds

GM: antibiotique gentamicine

T(-): eau distillé stérile

T: Témoin négatif

INTRODUCTION

La surface de la terre est occupée à 71% par des océans qui sont un immense réservoir et sont encore rarement explorés ; ils sont constitués d'une multitude d'habitats, s'étendant des zones côtières aux grands fonds océaniques, dans lesquels les communautés microbiennes jouent des rôles essentiels, notamment par leur implication dans les cycles biogéochimiques ; la décomposition des éléments ligneux et herbacés (JEAN-MARIE PÉRÈS, 2016).

Les micro-organismes existent sur la terre depuis des milliards d'années. Ils constituent un ensemble important et diversifié d'organismes microscopiques existant en tant que cellule seule ou en groupe. Ils représentent environ 70 % de la biomasse marine, ils sont divers et comprennent toutes les bactéries et archées, la plupart des protozoaires tels que les algues et les micromycètes (BRISOU, 1975).

La présence de champignons filamenteux microscopique ou micromycètes dans le milieu marin est, aujourd'hui, un fait reconnu par la communauté scientifique. De nombreuses moisissures ont été isolées du milieu marin à partir de: sédiment, eau de mer, oursin, moule... (KOHLMEYER, 1983 ; VISHWAKIRAN *et al.*, 2001, PANG *et al.*, 2004).

Les micromycètes sont microscopiques, unicellulaires, eucaryote, peu pigmentés ou translucides et plus fragiles que les champignons terrestres. Ils semblent moins accessibles, mais peuvent être facilement échantillonnés *in situ* dans le milieu (en pleine eau ou sur divers supports) ils sont encore relativement mal connus bien que largement répandus.

Les champignons aquatiques sont des pathogènes importants de végétaux et d'animaux. Ils peuvent développer des relations symbiotiques avec d'autres organismes marins ou d'eau douce et dans le recyclage de la matière organique, la production de divers métabolites comme les mycotoxines qui sont des métabolites secondaires, de faible poids excrétés (MAAMAR, 2015) certains d'entre eux sont très utiles pour l'homme comme dans la fabrication des aliments, comme des médicaments et dans l'environnement....

L'objectif principal de cette étude:

- l'extraction et la purification des biomolécules produites à partir des souches fongiques de la collection 2018 et 2020, appartenant à Mme BOURABAIN F, énumérées à partir de différents compartiments (eau de mer, sédiments, organismes marins et débris) du port d'Alger.

. - De rechercher l'effet antimicrobien des métabolites produits sur des souches bactériennes et fongiques de références.

Ce travail est réparti en trois chapitres:

Le premier chapitre représente une synthèse bibliographique résumant les rappels sur les peuplements fongiques. Ainsi que les métabolites primaires produits par les souches fongiques du milieu marin.

Le deuxième chapitre la partie d'étude expérimentale et les méthodes analytiques utilisées pour l'isolement et l'identification des souches fongiques, la méthode d'extraction et l'identification des métabolites ainsi que l'identification de leurs activités antibactériennes et antifongiques.

Le troisième chapitre est consacré aux résultats obtenus.

Enfin ce travail est clôturé par une conclusion générale et quelques recommandations pertinentes.

CHAPITRE I
SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralités

I. 1. Mycologie

I.1.1 Historique

Les champignons ont presque toujours intrigué les hommes, mais c'est en 1795 qu'un botaniste nommé Jean-Jacques Paulet (1740-1826) définit la science du champignon comme étant la mycologie.

A cette époque les champignons étaient considérés comme des plantes dépourvues de chlorophylle.

Haeckel (1894) découpe le monde vivant en trois règnes: Animal, Végétal, et les Protozoaires. Les champignons sont toujours classés parmi les végétaux du fait de la présence d'une paroi cellulaire et de plusieurs similitudes entre leurs cycles de reproduction et ceux des algues. C'est en 1969 que Whittaker propose un découpage en cinq règnes: Animal, Champignon, Végétal, Protistes, et Monères (les Procaryotes).

Par la suite WOESE (1977) subdivise le règne des Monères en Archéobactérie et Eubactérie. C'est le même *WOESE* qui en 1990 posera les bases du système actuel découpant le vivant en trois domaines: Eucaryotes, Archéobactéries et Eubactéries (Procaryotes) (Cf. Figure.1) Actuellement ces regroupements sont toujours discutés, ainsi en 2004 Cavalier-Smith a proposé un regroupement en deux empires (eu et procaryotes) et six règnes: Animal, Champignon, Végétal, Chromistes, Protozoaires et Bactéries.

<https://www.univbrest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Classification/Historique>

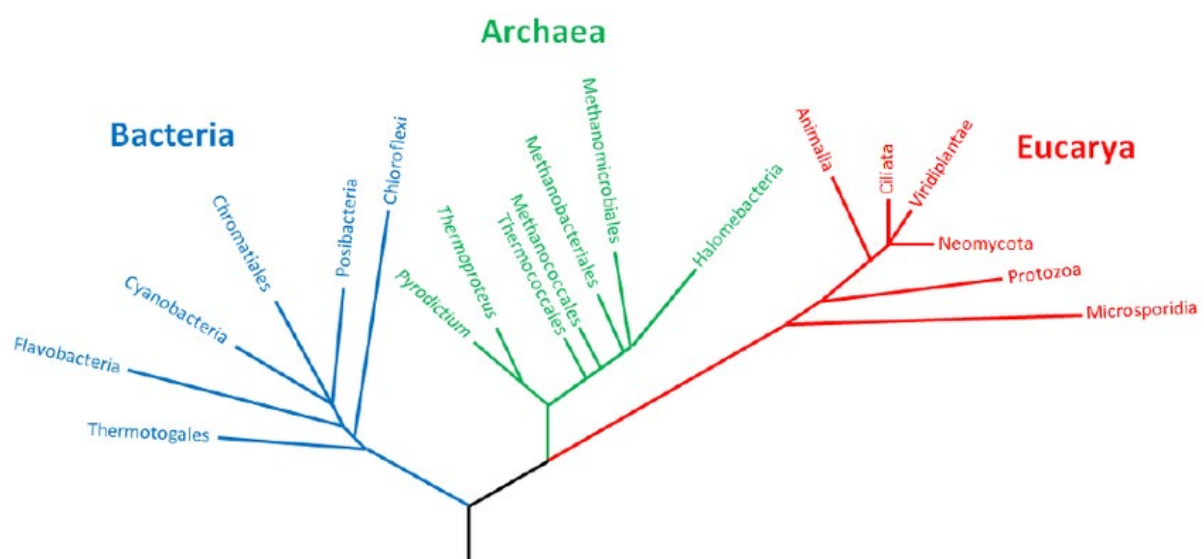


Figure 1. Les trois domaines du vivant selon WOESE *et al.*, (1977).

I.1.2. Caractères généraux

Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre Et jouent un rôle clé dans un grand nombre d'écosystèmes (MUELLER & SCHMIT, 2007), Ce sont des organismes eucaryotes (Cf. Figure.1 -page 4), à mode de reproduction sexuée ou asexuée. Les spores produites peuvent jouer un rôle dans la dispersion des champignons, mais peuvent également jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (MADELIN, 1994).

Leur mode de nutrition se fait par absorption en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur. Ces organismes sont dépourvus de chlorophylle et sont tous hétérotrophes ; le glycogène est le polysaccharide de réserve principal (CARLILE & WATKINSON, 1994 ; REDECKER, 2002). Tous les champignons ont une paroi constituée de chitine, polysaccharide très résistant constitué de résidus N-acétylglucosamine (CARLILE & WATKINSON, 1994).

D'un point de vue métabolique les champignons sont des chimiohétérotrophes, c'est à dire qu'ils utilisent du carbone organique comme source d'énergie (CARLILE & WATKINSON, 1994 ; REDECKER, 2002). Ce sont des organismes aérobies pour la grande majorité, mais certaines levures peuvent être aéro-anaérobie et participer à des processus fermentaires (CARLILE & WATKINSON, 1994).

Les moisissures peuvent être utiles ou nuisibles

a- Les moisissures utiles

Qui interviennent dans de nombreux domaines, et, en particulier, en agroalimentaire. Leur utilisation confère aux produits alimentaires des propriétés organoleptiques et technologiques recherchées. Elles sont aussi capables de produire des substances à propriétés intéressantes, pharmacologiques notamment, et l'exemple le plus connu étant la production de la pénicilline par *Penicillium notatum* (MATALAH-BOUTIBA, 2009).

b- Les moisissures nuisibles

Qui, en se développant sur les aliments, vont en altérer les qualités technologiques, organoleptiques et nutritionnelles. Il s'ensuit alors des pertes alimentaires qui entraînent donc des

répercussions économiques parfois très importantes et une incidence non négligeable sur la santé humaine (MATALAH-BOUTIBA, 2009).

I.1.3. Classification des champignons

Les champignons sont des organismes vivants constitués en grande partie de filaments de cellules de structure simple et de quelques cellules plus spécialisées qui donneront naissance à des spores. Les champignons ont un matériel génétique confiné dans un noyau au même titre que les plantes et les animaux.

L'ensemble de ces caractéristiques fait en sorte que les taxonomistes classent les champignons dans un règne distinct, soit celui des mycètes ou cinquième règne (KENDRICK, 1999 ; MALLOCH, 1997).

À l'instar des autres organismes vivants, les champignons sont subdivisés en classes, en ordres, en familles, puis finalement, en genres et en espèces.

La classification des moisissures, tout comme celle des autres champignons, est d'abord basée sur le mode de reproduction sexuée ou phase téléomorphe. Ce critère définit quatre des cinq ordres des mycètes, soit les Chytridiomycètes, les Zygomycètes, les Basidiomycètes et les Ascomycètes. En outre, lorsque la reproduction sexuée n'est pas connue, la division est appelée Deuteromycotina ou champignons imparfaits (BLACKWELL et al., 1998) (Cf. Figure 2).

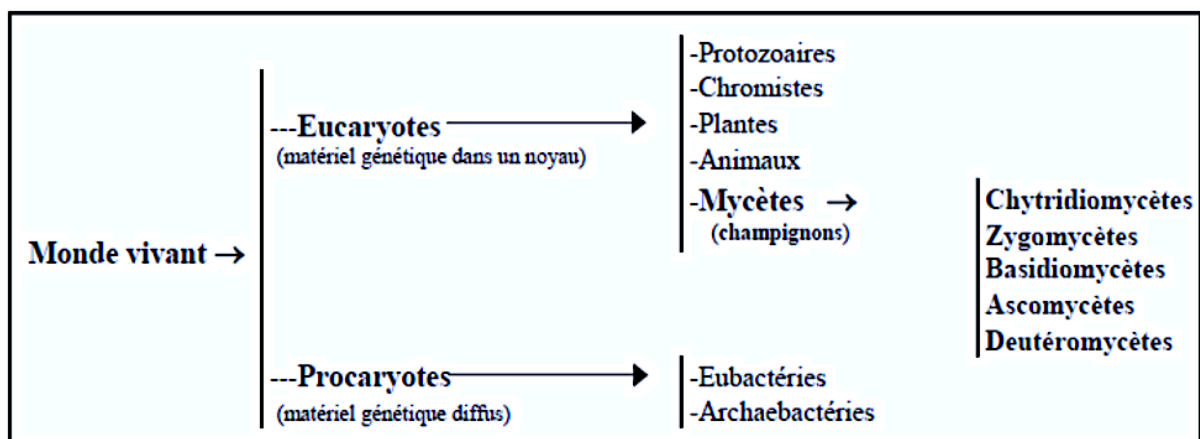


Figure 2. Classification des mycètes (champignons) d'après BLACKWELL et al., (1998).

I.1.3.1. Chytridiomycotina

Ce sont les champignons les plus primitifs. Ils sont aquatiques, au mycélium large peu ou pas cloisonné, dont les spores sont munies d'un flagelle.

I.1.3.2. Zygomycotina

Sont des champignons microscopiques à mycélium siphonné, de diamètre irrégulier, pourvu de nombreux noyaux non séparés par des cloisons. Essentiellement saprophytes, ils se présentent sous forme de moisissures (BOUCHET et *al.*, 1999). Ils produisent des spores sans flagelles. La reproduction sexuée aboutit à la formation de zygospores d'où le nom « Zygomycètes » donné à cette division (CHABASSE, 2008).

I.1.3.3. Ascomycotina

Ces champignons, à thalle septé ou levuroïdes, présentent une structure caractéristique appelée asque qui est un sporocyste particulier formé au cours de la reproduction sexuée. L'asque renferme le plus souvent un nombre défini de spores ou ascospores formées après fusion de deux noyaux suivis de la méiose. Il peut être globuleux, cylindrique ou plus ou moins claviforme (BOTTON et *al.*, 1990).

I.1.3.4. Basidiomycotina

Ils sont caractérisés par la production de spores sexuées, appelées basidiospores, formées par bourgeonnement à l'apex de cellules allongées, les basides. Les Basidiomycètes ont un thalle cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons Beaucoup d'entre eux sont des parasites de végétaux, d'autres de redoutables opportunistes chez l'homme (CHABASSE et *al.*, 2002).

I.1.3.5. Deuteromycotina

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores et qui se multiplient au moyen de conidies. Ils sont unicellulaires (levures) ou à thalle filamenteux septé. Sur le plan taxinomique, ils représentent un groupe artificiel en attente de regroupement définitif parmi les Ascomycètes et les Basidiomycètes (BOTTON et *al.*, 1990).

I.1.4. Propriétés principales des champignons

Les propriétés principales des champignons sont illustrées dans le tableau ci-dessous (Cf. Tableau 1).

Tableau 2. Illustration de quelques propriétés principales des champignons (DELARRAS, 2007).

Formes	<ul style="list-style-type: none"> - Structure filamenteuse, hyphes ou filaments à paroi souvent composé de chitine, septée ou siphonnée. - 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 général	<ul style="list-style-type: none"> - Chimio hétérotrophe. - Source de carbone et d'énergie: molécules carbonées 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	-Sexué 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, qui peuvent être contaminés par des moisissures toxigènes.

I.1.5. Champignons filamenteux

I.1.5.1. Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux

Les champignons filamenteux sont composés d'un appareil végétatif appelé thalle. Il est composé de filaments ou hyphes enchevêtrés les uns par rapport aux autres, et l'ensemble des hyphes constituent un réseau appelé mycélium (GONÇALVES et *al*, 2005).

Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés. (CF. Figure 3 -page 9).

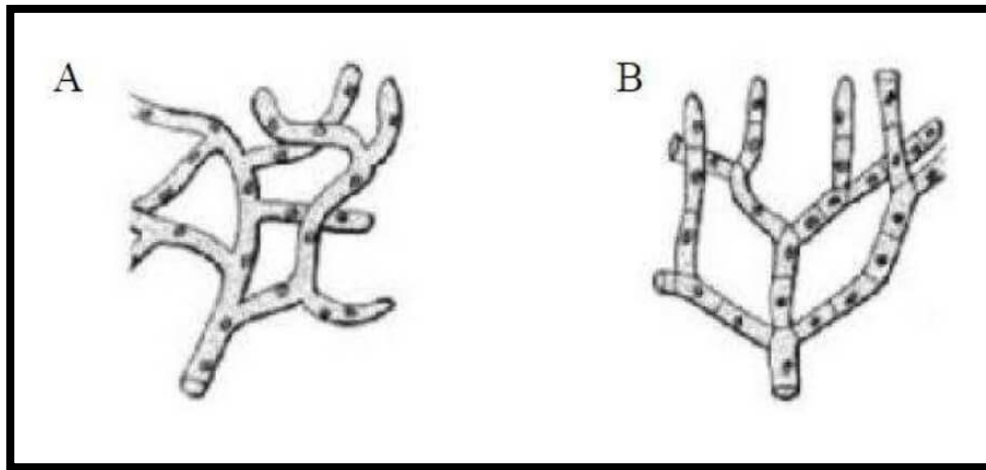


Figure 3. Structure d'un hyphe et son développement vers la formation d'un mycélium: (A), hyphe coenocytique ; (B), hyphe cloisonnée (CHABASSE et *al.*, 2002).

I.1.5.2. Cycle de vie des champignons

Le cycle de vie des champignons débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenche par la présence d'eau combinée ou non à certains facteurs très spécifiques comme l'intensité lumineuse, certaines températures ou types d'éléments nutritifs. La spore germera alors et donnera naissance à un premier filament non différencié, appelé hyphe, qui s'allongera pour former un ensemble appelé mycélium. Cet ensemble de filaments, plus ou moins ramifiés, constitue le thalle des champignons. En présence de conditions favorables à la sporulation, le mycélium donnera naissance à des structures plus spécialisées, qui produiront des spores asexuées (conidies) ou, plus rarement, des spores sexuées.

Chaque champignon produit un très grand nombre de spores dont l'ensemble, appelé sporée, se présente très souvent sous un aspect poudreux et coloré à la surface de la moisissure. La taille, la forme et la couleur des spores de moisissures varient grandement d'une espèce à l'autre. Par contre, au microscope, toutes les spores d'une même espèce sont de couleur, de dimension et de forme relativement constante ce qui, dans bien des cas, constitue un élément d'identification taxonomique (Cf. Figure 4 -page 10) (CHABASSE et *al.*, 2002).

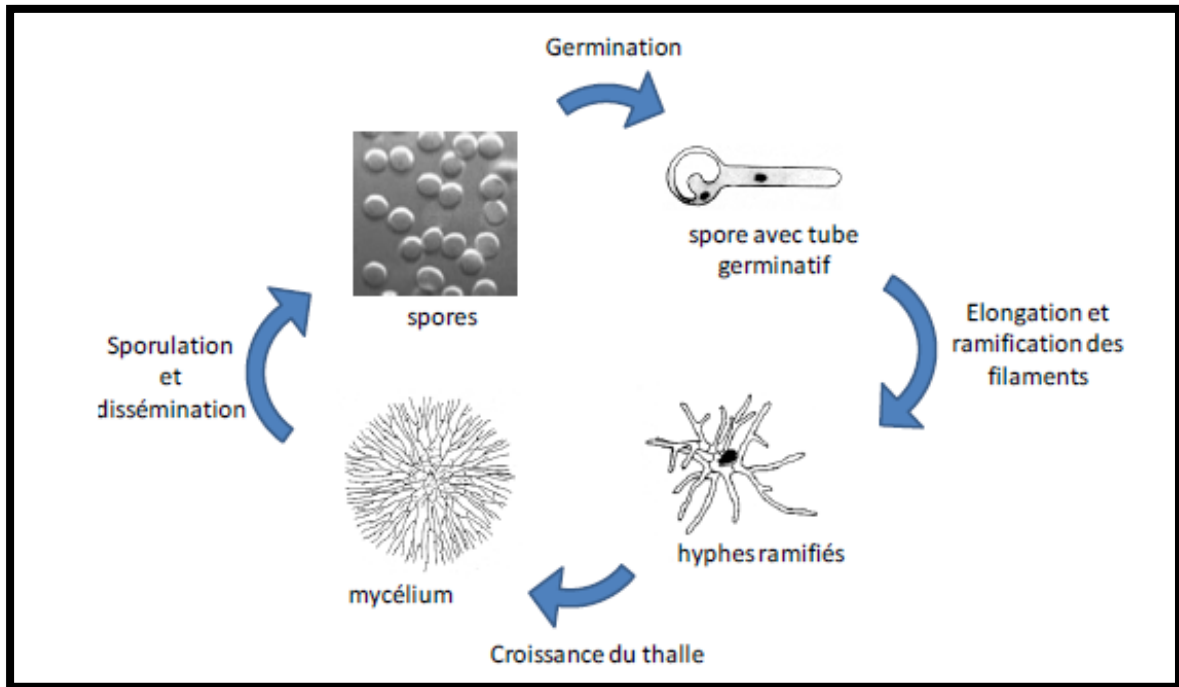


Figure 4. Cycle de vie des moisissures.

(www.Aspergillus.man.ac.Uk)

I.1.5.3. Mode de reproduction

Les champignons filamenteux se reproduisent de deux manières (Cf. Figure 5 -page 11).

I.1.5.3.1. Une reproduction asexuée

Les spores représentent le mode de reproduction asexué le plus commun chez les champignons, elles sont produites soit dans des sporanges, soit à partir de cellules d'hyphes appelées cellules conidiogènes (CARLILE ET WATKINSON, 1994).

I.1.5.3.2. Une reproduction sexuée

Elle est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose. Cette reproduction sexuée est très variable tant sur le plan de la diversité des organes que sur celui des cycles de développement. La fécondation peut s'effectuer chez un même individu (homothallisme) ou entre deux individus différents.

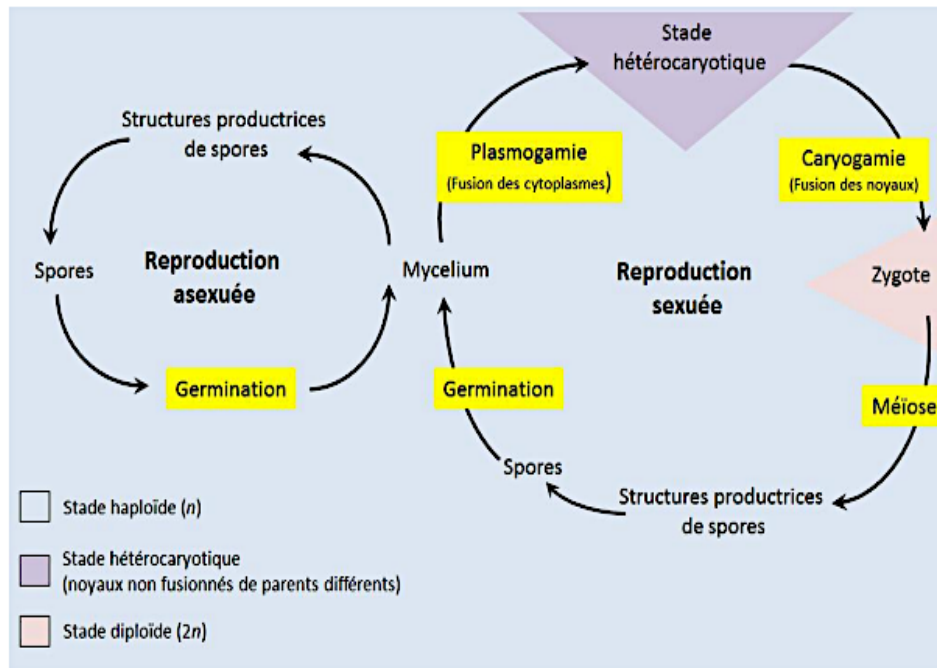


Figure 5. Les deux modes de reproduction chez les champignons (CARLILE & WATKINSON, 1994).

I.1.5.4. Croissance

La croissance mycélienne est assurée par des hyphes constitués de cellules hétérocaryotiques (ascomycètes et basidiomycètes) ou *coenocytiques* (*zygomycètes* et *glomérormycètes*). Son extension est limitée aux sommets. Après division, le mycélium apical nouvellement formé peut être séparé du mycélium restant par un septum (mycélium septé) ou non (mycélium siphonné) (JENNINGS ET LYSEK, 1996). Les hyphes sont connectés à un réseau qui détermine en partie la morphologie macroscopique des frondes. La croissance et la nutrition se produisent en même temps. La croissance est obtenue en étendant la paroi jusqu'à la pointe grâce à un apport continu de chitine. Dans le même temps, même au sommet, des hydrolases sont libérées dans le milieu extérieur (CARLILE ET WATKINSON, 1994).

I.1.5.5. Facteurs influençant le développement des champignons filamenteux

I.1.5.5.1. Facteurs intrinsèques (physico-chimique)

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

a-Température

Les champignons sont classés selon la gamme de température à laquelle ils se développent. On distingue 04 catégories citées ci-dessous, des plus fréquentes au moins fréquentes, indiquées en tableau 02. (BOUDIH, 2011) (Cf. Tableau 2).

Tableau 3. Catégories de champignons selon leur gamme de température de développement (ROQUEBERT, 1997)

Types de champignons	Gamme de température	Température optimale
Mésophiles	0 à 50°C	15 à 30 °C
Thermophiles	20 à 50 °C	35 à 40°C
Thermotholérants	0 à 50 °C	15 à 40°C
Psychrophiles	0 à 20 °C	0 à 17 °C

b- Humidité

Les champignons filamenteux ont en général un besoin en eau faible par rapport aux autres microorganismes (DAVET, 1996). Néanmoins, l'humidité a une grande influence sur le développement des champignons filamenteux non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores (BOURGEOIS, 1989). Les champignons filamenteux à mycélium non cloisonné sont les plus sensibles à la dessiccation ; leur développement cesse lorsque le potentiel hydrique descend au-dessous de -4 MPa (méga pascal). Les champignons filamenteux à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'à -10 MPa. Cependant, les *Aspergillus* et les *Penicillium* peuvent en général se développer à des potentiels hydriques de l'ordre de -20 MPa (DAVET, 1996).

c- pH

La grande majorité des champignons filamenteux se développent dans une zone de pH de 4.5 - 8.0 (BOTTON et al., 1999), bien qu'ils soient capables de croître dans une large gamme de pH avec une tendance à croître dans des milieux légèrement acides. C'est le cas de *Fusarium culmorum*, *Trichoderma harzianum* et *Aspergillus oryzae* (URBANEK et al., 1984 ; DELGADO-JARANA et al., 2002). Cependant, les enzymes extracellulaires produites dans des milieux complexes peuvent avoir des optima de pH d'activité très différents (plus acides ou plus basiques) (BOTTON et al., 1999). Le pH influe sur la croissance de ces microorganismes soit indirectement en agissant

sur la disponibilité des éléments nutritifs (à pH acide, le fer reste sous forme d'ions ferreux assimilable), soit directement par action sur la membrane cellulaire. Par ailleurs, les champignons filamenteux modifient souvent le pH du milieu par absorption sélective et échange d'ions, production de CO₂ ou de NH₃ ou par production d'acides (BOIRON, 1996).

d- Oxygène

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

e- Lumière

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

f- Salinité (NaCl)

Les microorganismes peuvent être classifiés selon leur concentration en sel de NaCl:

- Les halophiles, se développent de façons optimales à 0.2 et 0.85 mol/L (2-5%) de NaCl ;
- Les halophiles modérés se développent de façons optimales à 0.85 et 3.4 mol/L (5-20%) de NaCl ;
- Les halophiles extrêmes se développent de façons optimales à 3.4 et 5.1 mol/L (20-30%) de NaCl ;

En revanche:

- Les non halophiles se développent de façons optimales à moins de 0.2 mol/L ;
- Les halotolérants peuvent se développer dans la salinité élevée et en l'absence d'une concentration élevée des sels (GALINSKI, 1993).

I.1.5.5.2. Facteurs extrinsèques

Bien que leurs exigences ne soient pas très élevées, mais pour répondre à certains facteurs, la nutrition et l'environnement sont toujours nécessaires au développement des moisissures (OSWALD, 2000). Par conséquent, outre certains ions minéraux et des éléments à très faible teneur, le Carbone et l'Azote sont les nutriments les plus importants pour les moisissures (NAJIH, 2008).

Les moisissures peuvent également avoir besoin d'autres éléments, tels que des acides aminés, des protéines, de l'amidon et de la cellulose. Ces nutriments sont généralement abondants, mais ils sont généralement une bonne combinaison de facteurs environnementaux décisifs tels que l'humidité, l'oxygénation, la température et le pH. L'absence de ces facteurs entravera le développement des moisissures (NAJIH, 2008).

I.1.6. Mycologie marine

L'histoire de la mycologie marine commence par trois faits majeurs:

- La description par Desmazières en 1849 de la première espèce isolée du milieu marin (*Phaeosphira Typharum*) ;
- La découverte du premier champignon marin (*Halottia Posidoniae*) par des botanistes français en 1869 ;
- L'isolement des levures du milieu marin par Fischer puis Brebeck en 1894. (MATALLAH-BOUTIBA, 2009).

En 1944, une publication intitulée 'Marine fungi, their taxonomy and biology' publiée par Berghoorm et Linder, a permis d'identifier des centaines d'espèces marines (strictes / facultatives) (KOHLMEYER, 1983).

I.1.6.1. Champignons marins

Les champignons marins sont des organismes microscopiques eucaryotes pluricellulaires. Ils sont hétérotrophes pour la matière organique. Leur mode de reproduction est sexué et/ou asexué. (Cf. Figure. 6 -page. 15)

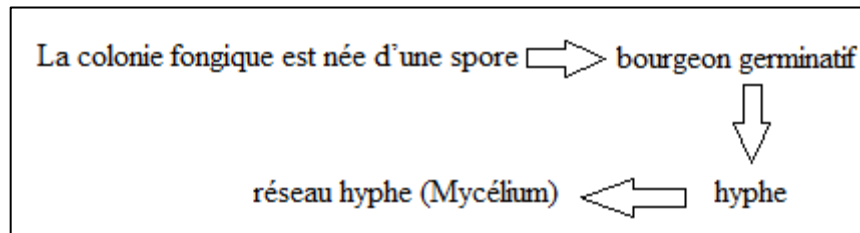


Figure 6. Mode de reproduction des champignons marins.

Les champignons marins sont définis selon leurs besoins environnementaux et physiologiques.

D'après KHUDYAKOVA *et al.* (2000), 98 % des espèces fongiques trouvées dans le milieu marin sont marines facultatives, représentées surtout par les genres *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Wardomyces*, *Chrysosporium* et *Chaetonium*.

Afin d'étudier le rôle et l'influence des champignons marins, KOHLMAYER (1979) a proposé deux concepts dans la définition de l'écologie, champignons marins obligatoires et facultatifs.

- Les champignons marins obligatoires, se développant et sporulant exclusivement dans les environnements marins ou estuariens.
- Les champignons marins facultatifs, provenant des eaux douces ou du milieu terrestre, qui sont capables de se développer et éventuellement de sporuler en milieu marin (KERZAON, 2009).

I.1.6.2. Répartition géographique et biotope

La biogéographie de la microfonge marine dépend de:

- La température ;
- La salinité ;
- La teneur en éléments nutritifs ;
- La pression hydrostatique ;
- La concentration d'oxygène. (KOHLMAYER, 1983 ; CUOMO *et al.*, 1995 ; HYDE *et al.*, 1998).

Les micromycètes marins sont présents les mers et océans: le littoral, les plages sablonneuses et les eaux profondes (même profondeur abyssales -5000 m). (KOHLMAYER, 1977 ; BRISOU, 1975 ; PANG *et al.*, 2004).

La répartition des champignons marins et leurs fréquences restent plus constantes au niveau de: des sédiments – de plancton côtier et de haute mer – des mollusques et intestins de poissons. (BRISOU ,1975) Mais aussi beaucoup de micromycètes marins vivent sur des substrats variés (algues, bois, feuilles et autres corps organiques végétaux et animaux en décomposition, boues, sables et coraux) (HYDE et *al.*, 1998).

I.1.6.3. Relation biologique

Les champignons marins sont capables de se propager dans différents environnements grâce à leurs aptitudes métaboliques, les relations biologiques des champignons marins avec le monde vivant sont de plusieurs types:

a. Saprotophes: ce sont les espèces saprophytes qui se développent aux dépens des substances mortes d'origine animale ou végétale (BOUVHET et *al.* 1999), qui dégradent les cadavres d'animaux marins (SRIDHAR et PRASANNARAI ,2001) mais aussi sont responsables de la dégradation des substrats ligneux marins (KOHLMEYER et *al.*,1995).

b. Parasites: Le parasitisme est généralement nuisible et souvent nocif (FLORENT, 1993) (BOUCHET et *al.* ; 1999). Ils provoquent de sérieuses infections chez les invertébrés marins, et affectent le développement des œufs et des larves de crustacés. (POLGLASE et *al.*,1986).

c. Symbiotes: la symbiose se définit comme une association étroite entre les organismes d'espèces différentes, vivant en équilibre les uns avec les autres mais pouvant vivre séparément. Pour cela les champignons forment un lichen en s'associant avec une algue ou peuvent former aussi une mycophybiose qu'est une relation d'intérêt naturel entre un champignon et une macro-algue) (RAVEN et *al.*, 2000 ; MAROUF et REYNAUD 2007).

I.1.6.4. Rôle des champignons marins

Bien qu'ils jouent un rôle important dans le développement des antibiotiques, et qu'ils soient nombreux pour la production de métabolites biologiquement actifs, les champignons ont reçu peu d'attention dans le milieu marin, en particulier dans la biosphère profonde (IMHOFF, 2016). Néanmoins, ils synthétisent 40 à 60 % des molécules microbiennes marines décrites (SKROPETA et WEI, 2014 ; BLUNT et *al.*, 2016). De plus, le nombre de nouvelles molécules fongiques marines décrites chaque année augmente (BLUNT et *al.*, 2014, 2015a, 2016), ce qui

suggère que les champignons du milieu marin pourraient représenter une nouvelle source de composés biologiquement active.

Les substances biologiquement actives de champignons marins conviennent à l'axe de la biotechnologie à grande échelle et offrent d'excellentes opportunités dans d'autres domaines nombreux domaines tels que (SILBER *et al.*, 2016):

- Pharmaceutique
- Cosmétique
- Alimentaire et agriculture

Les champignons représentent une originalité en termes de lipide et d'acides gras (AG) comme stockeur d'énergie (lipides totaux ou triglycérides) et comme éléments structuraux basiques (phospholipides). Chez certaines espèces une proportion de lipides pouvant dépasser 25% en poids de la biomasse (RUIZ, 2007).

Deux revues de références, publiées en 1975 (BRENNAN *et al*) et 1988 (LÖSEL) ont répertorié tous les travaux concernant l'étude des lipides de champignons depuis les années 1950. Ces travaux offrent une mise au point sur ces lipides, en s'intéressant aussi bien à leur production qu'à leur composition lipidique.

I.2. Définition des lipides

Les lipides sont des corps gras constitués de carbone, d'hydrogène et d'oxygène. Sont caractérisés par leur insolubilité dans l'eau et, au contraire, par leur solubilité dans les solvants organiques non polaires c'est-à-dire des molécules hydrophobes ou amphipatiques (LOUISOT, 1983).

Les lipides jouent un rôle dans:

- Le stockage d'énergie: sous forme de triglycérides.
- La structure: les acides gras servent à la synthèse d'autres lipides, notamment les phospholipides.

Les familles de ses lipides fongiques sont:

➤ Stérols fongiques.

La plupart des champignons synthétisent des stérols. Ces derniers sont retrouvés sous forme libre, d'ester, de glycosides de stérols ou d'autres formes combinées.

➤ Glycolipides fongiques

Cette famille lipidique est intéressante car elle comprend des molécules biologiquement actives impliquées dans des différents mécanismes cellulaires (RUIZ, 2007).

➤ Acides gras fongiques

Ce sont les champignons inférieurs qui se sont révélés intéressants en tant que source alternative d'AG potentiellement valorisable à l'échelle industrielle.

I.3. Champignons marins et leurs activités biologiques

Compte tenu des fonctions biologiques associées, les chercheurs reconnaissent généralement l'importance des acides gras polyinsaturés pour l'homme. Les micro-organismes pouvant être cultivés à grande échelle représentent le meilleur moyen de trouver des sources alternatives de lipides et d'acides gras utilisables pour la santé et la nutrition. Y compris les champignons. Les organismes aquatiques sont en effet notre principale source d'AG facilement accessible et cultivable.

Parmi ces organismes les champignons marins car ce sont une source importante de métabolites mais aussi une source de contamination de la chaîne alimentaire marine (BELITZ et GROSCH, 1987).

Les champignons marins ont fourni une variété de métabolites pharmacologiques potentiels et représentent donc une ressource précieuse de nouveaux candidats à médicaments (JIN et *al.*, 2016).

Ces métabolites sont:

a- Les métabolites primaires

- Définition d'un métabolite primaire: ils sont synthétisés par la cellule parce qu'elles sont indispensables pour leur accroissement. Les préposés du service significatifs sont des acides

aminés, des alcools, des vitamines (B2 et B12), des polyols, des acides organiques, ainsi que des nucléotides (STEYN, 1980).

b- les métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même. Ils sont de structure et d'activité biologique très diverses.

Les microorganismes produisent leurs métabolites secondaires après avoir terminé leur phase de croissance et avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase (TORTORA *et al.*, 2003).

Les métabolites secondaires englobent tout produit à activités antibiotiques, pharmaceutiques, immunosuppressives et toxiques. (DEMAIN et FANG, 2000).

Les moisissures produisent des métabolites secondaires dont certains, les mycotoxines, peuvent représenter un risque pour la santé humaine.

CHAPITRE II
MATERIEL ET METHODES

II.1. Matériel biologique

II.1.1 Source des souches répertoriées dans cette étude

III.1.1.1. Origine et conservation des souches –LA MYCOTHEQUE-

Les souches sélectionnées dans cette étude ont été collectées entre 2018 et 2020 propre à madame 'F.BOURABAINÉ', au port d'Alger à partir du sédiment profonds, eau de mer, moules, oursin, polystère, corde et bois (Cf. Figure 7) et conservés à la mycothèque de l'ENSSMAL, LBCM1. (Cf.tableau 3 -page. 22).

Les différents sites de prélèvement sont présentés dans la figure 7.

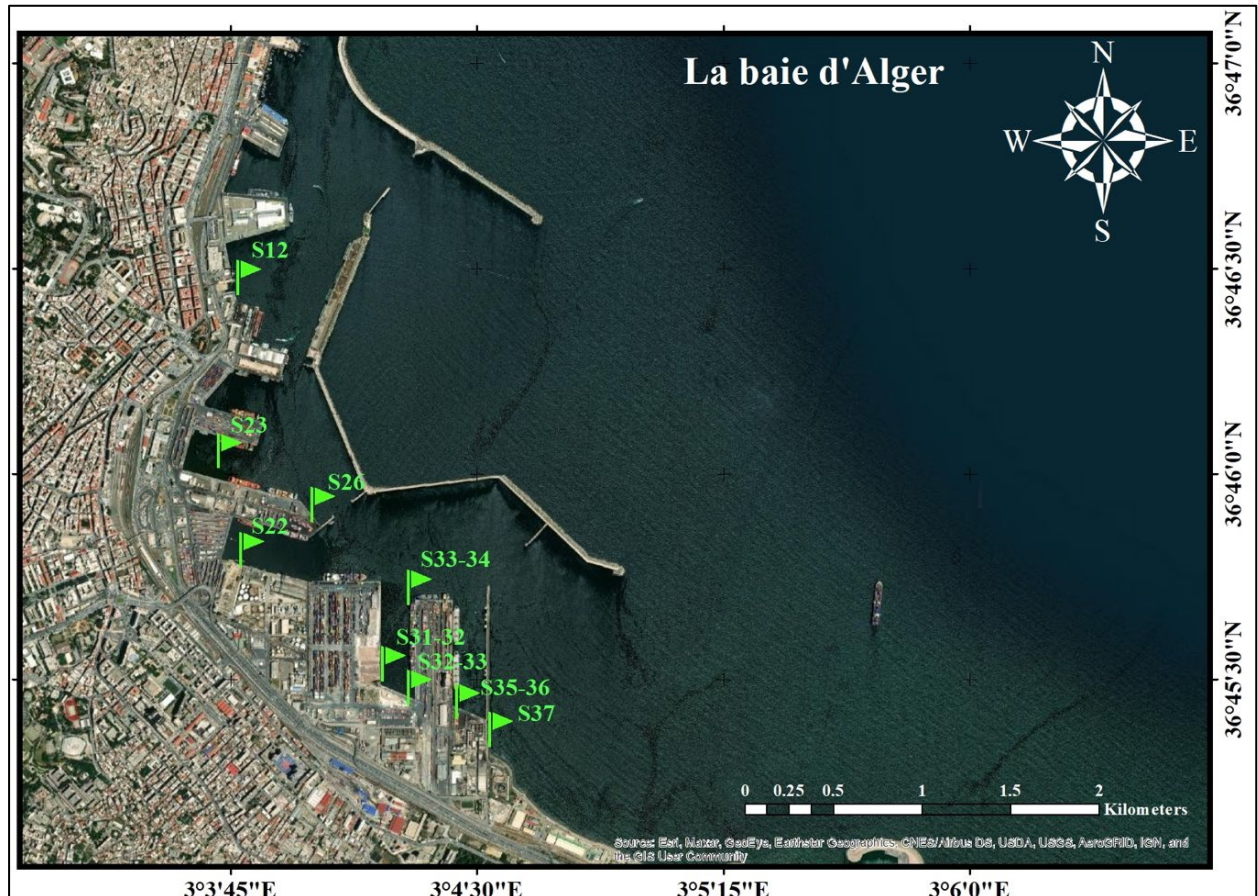


Figure 7. Carte du port d'Alger avec les sites de prélèvement.

Tableau 4. Tableau récapitulatif représentant le lieu, la date et la matrice des souches étudiées dans la présente étude.

Code des souches	Références	Date de prélèvement	Lieu de prélèvement	Matrice
1	003.23.09.20. Q12/A2	03 mars 2020	Port d'Alger	Eau de mer
2	010. C2 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
3	S35-36CZ.012.07.03 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Corde
4	009.23.09/A2/15.04.2021 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
5	AG002.13 09 112 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Polyestère
6	Q12.006.10.2020 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Eau de mer
7	MEA-1 14 SAB5/ blanc PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Vase noir
8	S33-34.043.20/035 23.09.PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir
9	009.23.09 A1 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
10	Bois 007.07 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Bois
11	S 33-34 /-2/ MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir
12	MS-37/03/03 (ATM) MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir
13	15/04/004.03.20 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
14	010.23.09. PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Bois
15	015/23.09.2020	03 mars 2020	Port d'Alger	Moule
16	OP.010055.12.03/09.2	03 mars 2020	Port d'Alger	Oursin
17	015.07-03 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
18	F2-010/004-F9	Fev 2018	Port d'Alger	Sédiment
19	ZC/H4 -19/05 PDA	Mars 2018	Port d'Alger	Vase noir
20	S26-1.03.03 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir
21	016.23.09 Rose 28.09.20 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Eau de mer
22	003 I9/H4-009	Avril 2018	Port d'Alger	Sédiment
23	OPSM2 j .002.07.03 PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Oursin
24	009/F1/003-G6 MEA	Avril 2018	Port d'Alger	Vase noir putride
25	009 G1 Asp Tamari MEA	Mail2018	Port d'Alger	Eau mer
26	MP.B ./011.07.03 A1 PDA	Avril 2018	Port d'Alger	Moule
27	S35.36 CZ 012.01.03 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir
28	056.26.09. MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Eau de mer
29	23-05 CYA 37°C 009 F2 MEA	Fev 2018	Port d'Alger	Sédiment
30	015-1J/028.03-03/8.Nov.2020MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
31	S36-1/MEA 035-08.03/09.20 PDA	03 mars 2020	Port d'Alger	Vase noir(suite)
(suite tableau 3)32	S35 34 03.03-2 MEA	03 mars 2020	Port d'Alger	Sédiment
33	004.F1.25.02.20 MEA	Avril 2018	Port d'Alger	Eau de mer
34	F6 MEA	Octobre 2018	Port d'Alger	Eau de mer

II.2. Repiquage

Pour obtenir des isolats purs, des observations quotidiennes ont été effectuées dès l'apparition des colonies fongiques filamenteuses.

Il consiste à repiquer le contenu des eppendorfs et des boîtes de Pétri conservés entre 2018 et 2020 au niveau du laboratoire pédagogique LBCM1 de L'ENSSMAL pour revivifier les colonies, dans des conditions aseptiques et afin de limiter au maximum les risques de contamination, le repiquage de chaque colonie a été effectué sur les milieux PDA et/ou MEA coulés dans des boîtes de Pétri de 6cm de diamètre, en prélevant un fragment de la colonie à l'aide d'une aiguille stérile et fine et on le dépose au centre de la boîte de Pétri.

II.3. Purification

Afin d'obtenir des isolats purs, des observations quotidiennes ont été effectuées dès l'apparition des souches. Utilisez une anse de platine stérile pour repiquer chacun des isolats développés au centre d'une boîte de Pétri contenant du milieu PDA et MEA additionnée de 50mg/ml d'antibiotique (Chloramphénicol ou Clamoxyl), puis incubé à 25°C pendant 21 jours (BOTTON *et al.*,1990).

II.4. Conservation

Le principe de la méthode de conservation des souches utilisée dans cette étude repose sur l'émergence de boutures de culture fongique dans un tube eppendorf qui sont fermés avec du parafilm et étiquetés.

Ceux-ci peuvent être conservés à 4°C ou à la température ambiante dans des eppendorfs contenant un mélange d'eau de mer et de Tween 80.

Pour une conservation de très longue durée en culture congelées (congélation à -20°C) dans des eppendorfs contenant un mélange d'un milieu liquide (CYA) et 30% de glycérol.

II.5. Identification des micromycètes filamenteux

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des

paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores, ...) (LECELLIER, 2013).

II.5.1. Observation macroscopique

- L'aspect des colonies: représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien) ;
- Le relief des colonies: il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peuvent être variable (molle, friable, élastique ou dure) ;
- La taille des colonies: Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques: petites colonies (*Cladosporium*) ou au contraire, colonies étendues, envahissantes ;
- La couleur des colonies: est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou le bleu, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium ou diffuser dans le milieu de culture. (LECELLIER, 2013).

II.5.2. Observation microscopique

Elle se fait par un microscope optique, en se basant sur les structures reproductrices (le thalle, les spores, aspect des spores, modes de formation des conidies, mode de groupement des conidies, mode d'implantation des cellules conidiogènes, présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée.

Les lames ont été préparées, en ajoutant de l'acide lactique à 60% ou le Rouge Congo, ensuite observées au microscope (10x et 40x) puis identifiées.

II.6. Criblage des souches pour l'identification de l'espèce par la méthode OSMAC

On a utilisé les géloses selon SAMSON et *al*, (2004).

- CYAs.
- GN 25.
- MEA.
- PDA.
- Czapek.
- CYA.

Nous avons coupé un petit fragment de la colonie purifiée puis nous l'avons mis dans Eppendorf contenant un mélange d'eau de mer stérile et 0,05% Tween 80, puis homogénéisé par vortex.

Les boîtes de Pétri CYAs-CYA-Czapek-PDA-MEA-GN25(Cf. Tableau 4 -page. 26) inoculées ont été incubées à $25 \pm 2^\circ\text{C}$, avec des boîtes de Pétri supplémentaire de CYA ont été incubées à 37°C pendant 7jours.

Afin de déterminer la vitesse de croissance des souches fongiques sur les différents milieux de culture, la mesure de la taille des colonies (longueur, largeur) a été pris en considération chaque jour jusqu'à 21 jours.

Pour le control et observation et suivi des boites pendant 21jours.

- Pour les observations macroscopiques: nous avons utilisé l'œil nu et la loupe binoculaire pour clarifier et collecter des indices sur l'identité des souches (couleur du mycélium-la couleur du recto et verso de la boîte...).
- Pour les observations microscopiques: nous avons utilisé un microscope optique avec la réalisation des montages microscopiques dans de l'acide lactique à 60% ainsi qu'avec du bleu du méthylène et le Rouge Congo.

Tableau 5. Composition des milieux de culture utilisés dans la méthode OSMAC (SAMSON et *al.*, 2004).

Compositions	Milieux de culture solides					
	PDA	MEA	CYA	GN25	CZ	CYAs
Glucose (g)		20				
Saccharose (g)					30	
Sucrose (g)			30			30
Extrait de levure (g)			5	3,7		5
Extrait de malt (g)		20				
peptone(g)		1				
PDA en poudre (g)	21					
Agar (g)	15	20	15	15	15	20
K ₂ HPO ₄ (g)			1		1	1
Na cl (g)						50
Glycérol 250g (ml)				198		
Cz concentré (ml)			10	750	10	10
Elément trace (ml)						1
Eau de mer stérile (ml)						
QSP	1000	1000	1000		1000	990

PDA: Gélose dextrose à la pomme de terre

MEA: milieu gélosé d'Extrait de Malt

CYA: Czapek + Extrait de levure (Czapek Dextrose Agar)

GN25: Gélose au nitrate de glycérol 25% (en anglais: Glycerol Nitrate Agar)

CZ: Czpeck dox liquide (Cz)

CYA s: Czapek Yeast Autolysate agar 5% NaCl

Tous ces milieux sont stérilisés et autoclavé pendant 20 min à 121°C.

II.7. Fermentation en milieu liquide

La production de molécules bioactives à partir des souches fongiques a été effectuée par fermentation dans un bouillon autoclavé (CYAL), ce dernier a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des métabolites. Des flacons de 250 ml contenant 100

ml du milieu de culture. Ont été inoculées par cinq disques de culture en pleine sporulation âgées de 9 à 11 jours. Les flacons ont été incubés à 25°C pendant 72h, avec une agitation chaque 24h.

Après 72h, le contenu des flacons a été versé dans d'autres flacons contenant 100 ml du bouillon autoclavé GPY (Cf. Tableau. 5) ; puis ont été incubés à 25°C pendant 12 jours avec agitation chaque 24h (Cf. Figure. 8).

Tableau 6. Composition des milieux de fermentation utilisés (ZHAO et al., 2018).

Compositions	Milieux de culture liquide	
	CYAL	GPYL
Glucose (g)		20
Sucrose (g)	30	
Extrait de levure (g)	5	7
K ₂ HPO ₄ (g)	1	1
Na cl (g)		5
MgSO ₄ (g)		0,5
CaCO ₃ (g)		2
Tryptone(g)		3
Cz concentré (ml)	10	
Eau de mer stérile (ml)QSP	990	1000



Figure 8. Fermentation pendant 15 jours à 25 °C.

Les jus de fermentation ont été soumis à plusieurs filtrations stérilisantes sur membrane de filtration $0.45\mu\text{m}$ et des gazes afin d'évaluer leurs activités (production de métabolite et effet antimicrobien/antifongique) (Cf. Figure. 9).



Figure 9. L'étape de filtration sur papier filtre ($0.45\mu\text{m}$) des gazes.

Les filtrats fongiques ont subi une centrifugation à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ pour 2500 tours /min. (Cf. Figure 10).

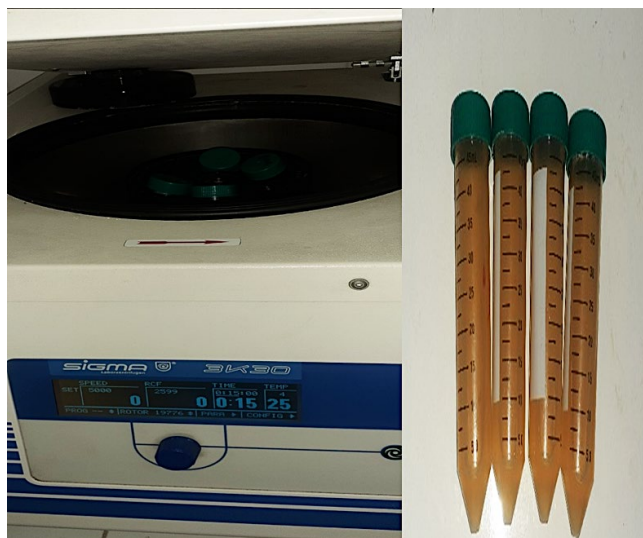


Figure 10. Étape de centrifugation.

II.8. Extraction des métabolites à partir des filtrats fongiques issu après fermentation

Dans l'étape d'extraction on a réalisé 02 méthodes d'extraction avec 02 protocoles différents.

II.8.1. Extraction liquide-liquide

a- Méthode 01:

De nombreuses études ont été entreprises pour optimiser l'extraction des lipides totaux à partir de tissus animaux et végétaux La méthode que nous avons adoptée consiste en l'extraction des lipides totaux par macération de la biomasse fongique dans un mélange de solvants organiques à température ambiante.

Dichlorométhane/méthanol

Ce mélange était jusqu'à présent le plus couramment utilisé pour ce type d'extraction. Il est très efficace pour récupérer rapidement la quasi-totalité des lipides (RUIZ, 2007)

Le protocole utilisé est représenté dans la figure suivante (Cf. Figure. 11 -page.30)

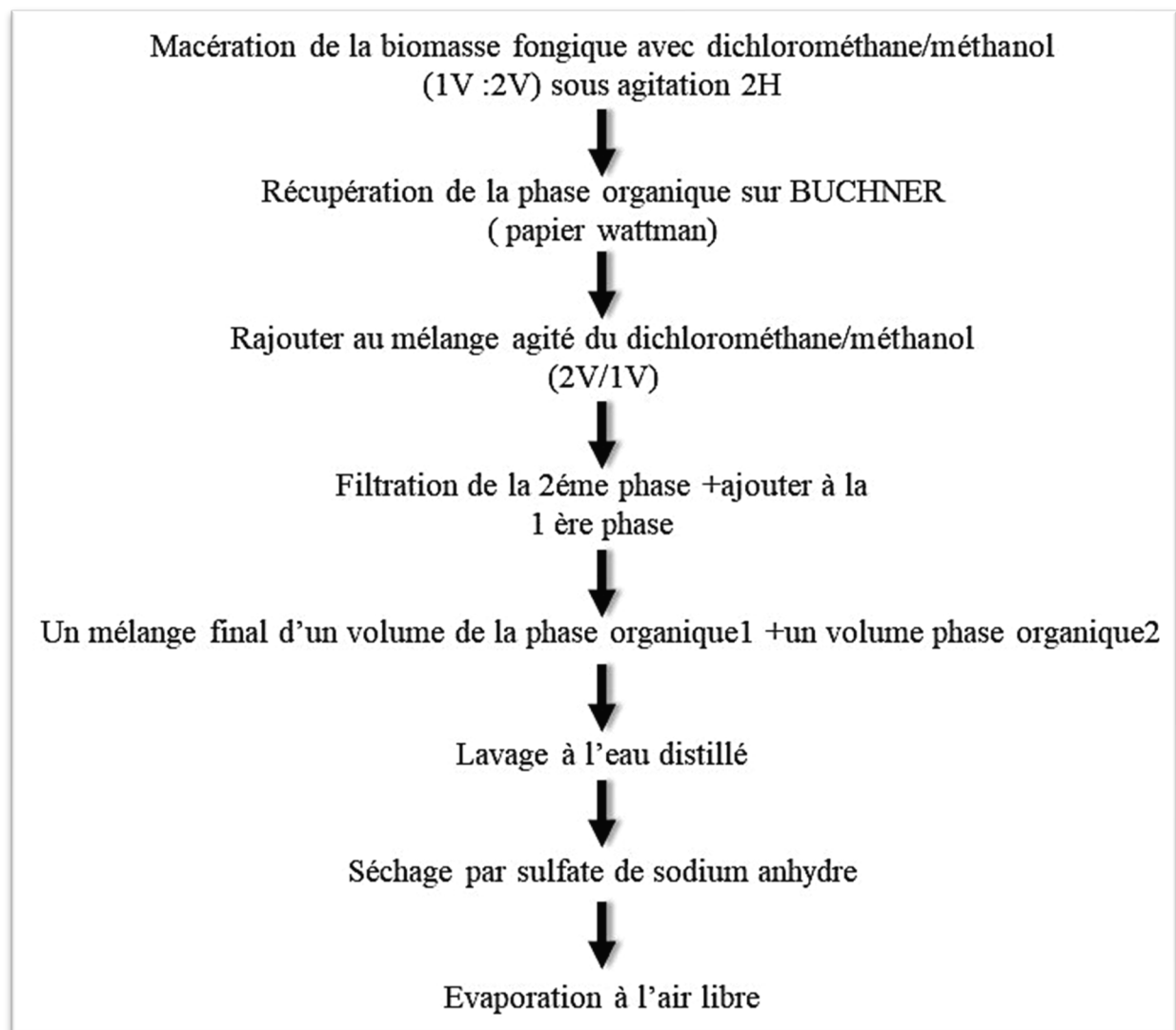


Figure 11. Schéma représentant le protocole d'extraction des lipides (RUIZ, 2007).

a. Méthode 02

Les méthodes d'extraction liquide-liquide (ELL) permettent le transfert d'un soluté initialement contenu dans une phase liquide vers une autre phase liquide non miscible. (ABE *et al.*, 2010)

Dans notre cas, cette méthode a été utilisée pour purifier et concentrer les métabolites primaires et secondaires produite après fermentation de 08 souches fongiques dans une étuve à 25°C pendant 14 jours (Cf. Figure. 8 -page. 27).

Ces métabolites seront déterminés par chromatographie sur couche mince CCM.



Figure 12. Extraction liquide-liquide.

Le mélange binaire de solvants utilisé dans la première étape est composé de chloroforme, de méthanol et de filtrat. Le rapport volumique est de 25 ml: 25 ml: 25 ml. Une fois les deux phases (phase aqueuse et phase organique) formées, verser la phase organique dans l'entonnoir de comptage placé sur un évaporateur rotatif et évaporer à 40°C sous vide pendant quelques minutes. Ensuite, le contenu est récupéré avec 1 ml de chloroforme et 0,5 ml de méthanol pour une séparation CCM (Cf. Figure 13).



Figure 13. Evaporation des solvants par rotavapeur.

II.9. Identification des métabolites par Chromatographie sur Couche Mince CCM

II.9.1. Définition

La Chromatographie sur Couche Mince (CCM) est une méthode de séparation physico-chimique. La couche mince (phase stationnaire), constituée d'une substance finement pulvérisée, est appliquée ou fixée sur une plaque de verre, de métal ou sur une feuille appropriée. La solution du mélange inconnue est déposée à la ligne de départ sous forme d'un point. La plaque ou la feuille est introduite dans une cuve étanche contenant l'éluant approprié (phase mobile). Elle a l'avantage d'être rapide et peut traiter plusieurs échantillons en parallèles.

II.9.2. Mode opératoire

- Principe

Elle se fait sur une plaque en gel de silice par le dépôt de 10 μ l de l'échantillon et l'immigré au sein d'une cuve chromatographique pour 15-20min contenant la phase mobile composée d'un mélange d'éluant (BEHNAS et BENAYACHE, 2015). Après la migration et l'évaporation des produits d'éluions. Les plaques ont été procédées pour la révélation en utilisant des réactifs convenables qui font apparaitre les substances recherchées sous forme de spots (tache colorées) (HAINQUE et *al.*, 2008). L'identification des spots apparus se fait par le calcul des rapports frontaux (RF) (LAMRANI ,2009).

Mode opératoire (C. AKROUR-AISSOU, 2020. Polycopié des travaux pratiques 4^{ème} année Aquaculture).

Afin de préparer la plaque CCM on a suivi les étapes suivantes:

- La plaque CCM est tout d'abord activée à 105°C pendant 1h ;
- Les échantillons sont déposés à 2cm du bord inférieur de la plaque et à 1cm de séparation entre eux.
- Les plaques sont placées dans la cuve de développement contenant la phase mobile qu'est un mélange volumétrique de chloroforme et de méthanol (90/10).
- On a réalisé la révélation en utilisant 02 révélateurs
 - Le premier révélateur (cristaux d'iode): La plaque CCM est placée dans une cuve contenant des cristaux d'iode pendant 20min.
 - Le deuxième révélateur (l'acide phosphomolybdique) Pulvériser la plaque avec le 2^{ème} révélateur: l'acide phosphomolybdique.
 - L'identification des spots apparus se fait par le calcul des rapports frontaux (RF)

Rapport frontal (rétention frontale) est calculé:

RF= hauteur de la tache/ hauteur du front du solvant.

$0 < RF < 1$ (RANDERATH, 1971).

II.10. Activité antibactérienne

II.10.1. Réactivation des souches bactériennes

Le support microbien utilisé est composé de huit souches bactériennes et deux levures issu laboratoire Microbiologique de contrôle qualité de pharmaghreb Melako, Tiaret.

La réactivation des bactéries conservée est faite par ensemencement sur des milieux sélectifs pour chaque bactérie (selon la méthode des quadrants. L'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures.

Les souches tests utilisées sont de la collection du 2019 répertoriées dans l'eau de mer.

Un tableau récapitulatif des souches utilisées ainsi que leurs références, laboratoire et leurs milieux sélectifs. (Cf. Tableau. 6)

Tableau 7. Germes tests de référence et leurs milieux sélectifs utilisés dans le présent travail.

Les souches		Les références	Milieux sélectifs	Laboratoire
Bactériennes	<i>E. coli</i>	SR 001/CM01/CT03:19.11.2019	BEA / GN	Laboratoire Microbiologique
	<i>P.aeruginosa</i>	SR 002/CM01/CT04:19.11.2019	Cétrimide	De contrôle qualité de pharmaghreb
	<i>Enterococcus sp</i>	SR 005/CM01/CT16:19.11.2019	S.B	Melako , Tiaret
	<i>K.pneumoniae</i>	Collection du laboratoire	MAC .C	
	<i>Vibrio</i>	Riad. Vibrio	GN	Souche marine
	<i>Citronbacter</i>	Brakii.daurade d'Ain T	GN	ENSSMAL
	<i>Bacillus sp</i>	-	GN	Mme Chaou
Levuriennes	<i>C.albicans</i>	SR 007/CM01.CT11:18.11.2019	PDA	Laboratoire Microbiologique
	<i>S.cerevisiae</i>	SR 009/CM01/CT20:18.11.2019	PDA	De contrôle qualité de pharmaghreb Melako , Tiaret

II.10.2. Etude de l'activité antibactérienne

II.10.2.1. Préparation des suspensions bactériennes

La suspension bactérienne est préparée à partir de colonies viables fraîchement identifiées dans des tubes à essai stériles contenant de l'eau distillée stériles. La turbidité est ajustée à 0.5 Mac Ferland (une DO de =0.08-0.1 les bactéries à 620nm /et une DO de =0.18-0.2 à 524 nm pour les levures (KARAOUI, 2018).

II.10.2.2. Préparation des boîtes de Pétri

Imbiber un écouvillon avec la suspension bactérienne et l'ensemencer sur toute la surface du milieu gélosé à savoir milieu MH pour les bactéries et milieu PDA pour les levures.

II.10.2.3. La méthode des disques

Afin de déterminer l'activité antibactérienne des extraits obtenus, un volume de 50µl de chaque extrait a été déposé à l'aide d'une micropipette sur des disques en papier stériles de 6 mm de diamètre, les essais sont faits en duplicata pour chaque concentration des extraits fongiques (KARAOUI, 2018).

Également on a utilisé le disque d'antibiotique de Gentamicine à 30 µl comme témoin positif et un disque d'eau distillé stérile comme témoin négatif. Puis on a déposé les disques sur la surface de gélose ensemencée avec les souches bactériennes et levuriennes. Les boîtes de Pétri ont été exposés à une température ambiante pendant 20min, ensuite ont été mise pendant 2 heures à 4°C afin que les métabolites puissent diffuser et enfin elles ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. (KARAOUI, 2018)

La mesure du diamètre des zones d'inhibition a été réalisée après 24h ainsi qu'après 48h.

CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION

III .1. Description et illustration des deux genres étudiés

III.1. 1. Genre *Aspergillus* / Section *Aspergelli*

III. 1.1. 1. Généralités

Le nom *Aspergillus* est donné à un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 180 espèces, réparties en 18 sections (GAM et *al.*, 1986).

Les formes parfaites (téléomorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota (genres *Eurotium* et *Emericella* notamment).

Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les grains et les produits dérivés (farines, aliments composés pour animaux, etc...).

Certains d'entre eux sont pathogènes, et/ou produisent des métabolites toxiques pour les mammifères.

https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Principaux_groupes/Les+Aspergillus

III.1.1.2. Classification

Tableau 8. Taxonomie des *Aspergillus*. <https://www.inspq.qc.ca/moisissures/fiches>

Règne	Fungi
Phylum	Ascomycota
Classe	Eucomycètes (Eurotiomycètes)
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichomaceae
Genre	<i>Aspergillus</i>

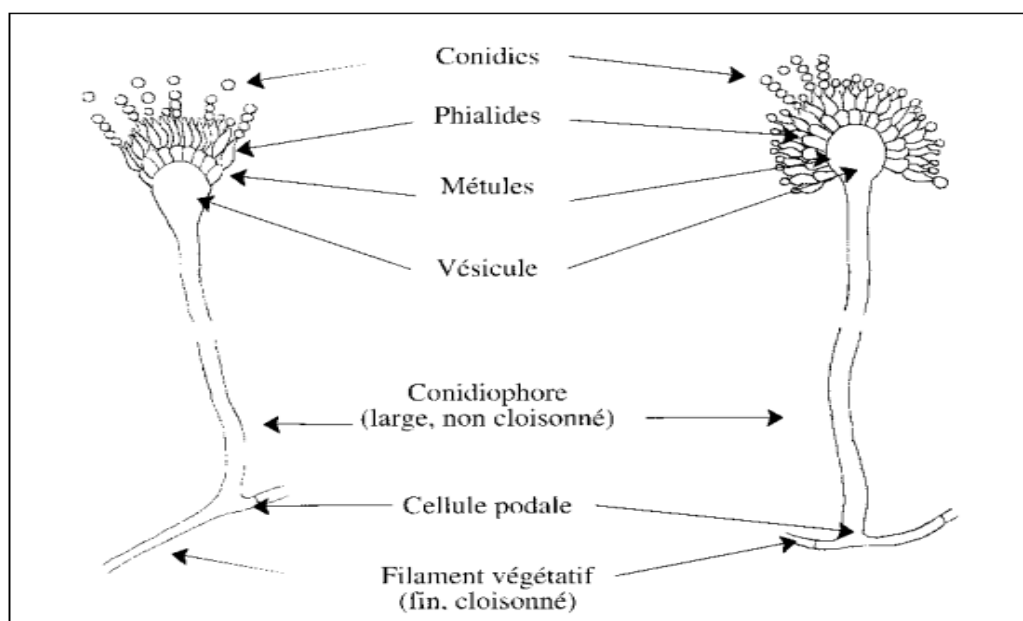


Figure 14. Principaux caractères morphologiques des *Aspergillus*. (CHABASSE et *al.*, 2002).

III.1.1.3. Caractères cultureux

Les caractères cultureux du genre *Aspergillus* sont présentés dans le tableau 8.

Tableau 9. Caractères cultureux du genre *Aspergillus*

Taux de croissance	Rapide sur les milieux de culture classique (MEA, PDA) additionnés d'antibiotique (amoxicilline). Après 48H d'incubation, on observe la présence des colonies. (BADILLET et <i>al.</i> ,1987, MORIN 1994)
Température	La majorité des <i>Aspergillus</i> poussent à 22-25°C . Les espèces thermophiles: 37-40°C allant à 57°C. (BADILLET et <i>al.</i> ,1987, MORIN 1994)
Aspect de la colonie	Des colonies poudreuses ou granuleuses (CHERMETTE et BUSSIERAS ,1993) Duveteux à poudreux (<i>A.flavus</i> , <i>A.nidulans</i> , <i>A.terreus</i>) Granuleux (<i>A.niger</i> ,...) Poudreux: <i>A.glaucus</i> .
La couleur de la colonie	Recto: gris-vert (<i>A.fumigatus</i>), vert-jaune (<i>A.flavus</i>), vert foncé à chamois (<i>A.glaucus</i>), brun cannelle (<i>A.nidulans</i>), chamois clair , jaune et rose (<i>A.terreus</i>), jaune (<i>A.versicolor</i>), noir (<i>A.niger</i>), blanche (<i>A.candidus</i>) Verso: incolore, jaune, il peut brunir ou réagir avec l'âge.

III.1.1.4. Critères macroscopiques

Le criblage des espèces de genre *Aspergillus* a été réalisée par la méthode OSMAC c'est une culture monosporique sur six milieux de culture: PDA. MEA, CYA 25°C, CYA 37°C, CYAs, GN 25, CZ.

L'identification des espèces a été réalisée par l'observation à l'œil nue de la couleur de la gélose recto et verso, la mesure du diamètre des colonies.

Les résultats sont regroupés dans le tableau 9 (Cf. Tableau. 9- page. 40).

Tableau 10. Caractères macroscopiques du genre *Aspergillus*

Références	Espèces	Milieux de culture	Diamètres (cm)	Descriptions
MP.B/011.07.03 /A1	<i>Aspergillus terreus</i> 1	MEA25°C	5.4	-Croissance rapide - Recto: couleur: beige à crème Verso: beige
		PDA 25°C	3.8	- Croissance rapide -recto: couleur marron - Verso:
		CYA 37°C	3.5	-croissance moyenne - recto: couleur chamois -Verso: couleur terreuse
		CYA 25°C	6	-Croissance rapide -couleur: chamois
		CYAs 25°C	5.9	--
		GN 25°C	3.8	-croissance moyenne
		CZ 25°C	4.1	-croissance moyenne -recto: colonies à fond beige et extrémité marron clair -verso: colonies vertes olive
23-05 CYA37°C /009F2MEA	<i>Aspergillus sp</i>	MEA25°C	5.9	--Croissance rapide - Recto: mycélium blanc - Verso: couleur brune sale avec des bords crème
		PDA 25°C	3.8	-croissance moyenne - couleur: centre blanc avec extrémité jaunâtre -verso: orange
		CYA 37°C	3.5	-croissance moyenne
		CYA 25°C	6	-Croissance rapide -Recto: mycélium blanc - Verso: centre marron avec extrémité orange
		CYAs 25°C	5.9	-Croissance rapide -Recto: colonie blanche -Verso: centre marron avec extrémité orange
		GN 25°C	3.8	- Croissance moyenne - Recto: mycélium blanc avec un centre de couleur mercure - Verso: colonie fond jaune extrémité blanche
		CZ 25°C	4.1	- Croissance moyenne

				-mycélium blanc (suite)
(suite tableau 9)		MEA25°C	6.5	-Croissance rapide -Recto: colonies vertes Verso: opaque de couleur verte à marron
		PDA 25°C	5.5	-Croissance rapide - colonies sauvages - Recto: colonies vert foncé -Verso: extrémités vert-militaires avec un centre plus clair
004. F1.25.02.20	<i>Aspergillus glaucus</i>	CYA 37°C	9	- Croissance accélérée - Des colonies de couleurs vertes
		CYA 25°C	6.6	-Croissance rapide - Recto: colonies vert olive -Verso: extrémité verte et un centre marron clair
		CYAs 25°C	5.7	-Croissance rapide - Recto: colonies vertes à marrons -Verso: gélose verdâtre avec des points clairs et des colonies crème
		GN 25°C	3.2	-croissance moyenne - couleur verte
		CZ 25°C	4.4	- croissance moyenne - Recto: colonies marron avec des points verts -Verso: extrémité marronne avec un centre beige
		MEA25°C	3	-croissance la plus lente -Pigmentation de la gélose -Recto: Des colonies sauvages de couleur beige -Verso: marron
F6 MEA	<i>Aspergillus terreus 2</i>	PDA 25°C	3.5	- croissance moyenne -couleur pale
		CYA 37°C	10.3	- croissance la plus rapide -Recto: couleur sablée -Verso: couleur marron clair
		CYA 25°C	6	-croissance rapide

				- Recto: couleur sablée -Verso: extrémité foncée, centre beige fluorescent
		CYAs 25°C	5.9	-croissance rapide -Des colonies non dénombrables -extrémité blanche, centre marron
		GN 25°C	3.8	--
		CZ 25°C	4.1	-croissance moyenne -Extrémité blanche et centre jaune

III.1.1.5. Influence du milieu sur la croissance fongique

La figure16 ci-dessous présente quatre courbes de croissance des souches fongiques testées et mise en culture sur sept différents milieux de culture à savoir: CYA - CZ - GN25 - MEA - PDA -CYAs.

Les boîtes de Pétri inoculés ont été incubées pendant 21 jours à une température de 25°C, ainsi que d'autres boîtes de Pétri supplémentaires de CYA à 37°C.

Ces graphiques présentent une croissance fongique avec une phase de latence, de croissance linéaire, de ralentissement et enfin une phase stationnaire.

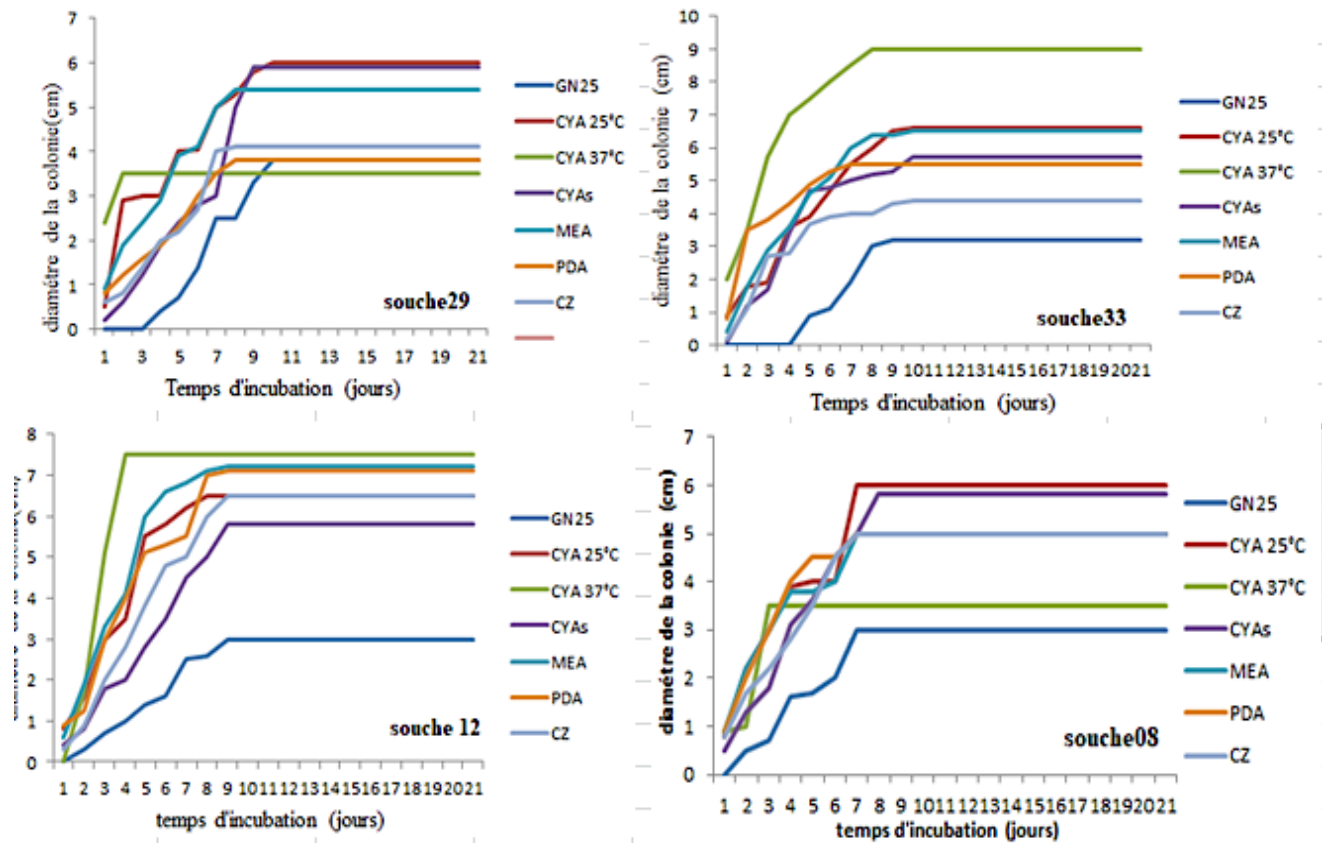


Figure 15. Courbes de croissance des souches *Aspergillus sp*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium sp* 01 et *Penicillium sp* 02 en fonction des milieux de culture

D'après les résultats illustrés dans la figure (Cf. Figure 16) présentant la vitesse de croissance des souches mycéliennes les phases cités précédemment (Phase de latence, phase de croissance linéaire, ralentissement de croissance, phase stationnaire).

La souche 29 - *Aspergillus sp*- représente une croissance variable de la taille des colonies en fonction des milieux de culture avec une croissance rapide et similaire sur les milieux CYA à 25°C et CYAs, mais plus au moins rapide sur les milieux CZ, MEA, PDA, GN25.

La croissance la plus lente se présente sur le milieu CYA à 37°C ou la phase de latence est la plus longue.

La souche 33 -*Aspergillus terreus*-, montre une excellente croissance sur le milieu CYA à 37°C par rapport aux autres milieux: CYA à 25°C, CYAs, MEA, PDA et CZ.

Alors que la croissance la plus lente et faible est enregistré sur le milieu GN25.

Concernant **la souche 12** - *Penicillium sp 01*-, on a pu noter que malgré l'apparence variable de la taille des colonies sur les milieux CYA à 25°C, CYA à 37°C, CYAs, MEA, PDA et CZ , les courbes de croissance sont similaires.

Sur le milieu GN25 la colonie s'est développée plus lentement, un ralentissement de croissance sans jamais envahir toute la surface de la gélose.

Enfinement pour la souche 08 - *Penicillium sp 02*-, on a enregistré une croissance maximale pour le milieu CYA à 25°C, ainsi qu'une croissance moyenne dans les milieux MEA, PDA, CZ, alors que la plus faible croissance est observée sur le milieu GN25.

On a constaté qu'après 7 jours d'incubation la croissance commence à être stable pour toutes les souches sur les différents milieux jusqu'aux derniers jours d'incubation.

On peut dire que les résultats recensés dans cette partie d'étude révèlent que les souches fongiques conservées dans la mycothèque (2018-2020) énumérés au port d'Alger et examinés dans les mêmes conditions de culture (température, pH, temps d'incubation, ...) présentent une croissance différente, ceci est probablement dû aux conditions favorables à leur développement.

La croissance dans certains milieux est optimale ceci est due à la richesse de ces derniers en nutriment et en source de carbone selon la matrice.

III.1.1.6. Critères microscopiques

L'identification microscopique des souches *d'Aspergillus* a été effectuée sous microscope photonique selon différents grossissements Gx10 ; Gx40, en mesurant les différents composants de ce genre (conidiophore, métule, vésicule, tête, phialide).

Les résultats sont enregistrés dans le tableau 10 page 45.

Tableau 11. Caractères microscopiques du genre *Aspergillus*

Souches fongiques	<i>Aspergillus terreus 1</i>	<i>Aspergillus blanc</i>	<i>Aspergillus glaucus</i>	<i>Aspergillus terreus 2</i>
Code	MP.B-/011.07.03/ A1	23-05 CYA37°C /009F2MEA	004.F1.25.02. 20	F6 MEA
Stipe (conidiophore)	Lisse incolore 230 µm	Lisse 280 µm	Lisse	Conidiophore lisse, incolore
Vésicule	Globuleuse (13 µm)	Hémisphérique	Ronde	Globuleuse
Phialides	Bisérié	Portés par la vésicule	Portés par la vésicule	Portés par des métules insérés sur toute la partie supérieure de la vésicule
Conidies	Très petite	--	Globuleuse Très petite	Subglobuleuse
Tête	--	Unisériée	Radiée 220 µm	Bisériée

a. *Aspergillus terreus* 01:

C'est une espèce saprotrophe, productrice des mycotoxines (patuline). (LATGE1999 ; SUGUI et al., 2014; ASHU et al., 2017).

Elle est présente dans les sols, elle contribue à la dégradation des matières organiques en raison de ses activités cellulolytiques. Présente aussi dans les céréales en stockage, les épices et divers végétaux (Cf.Figure17-page46).

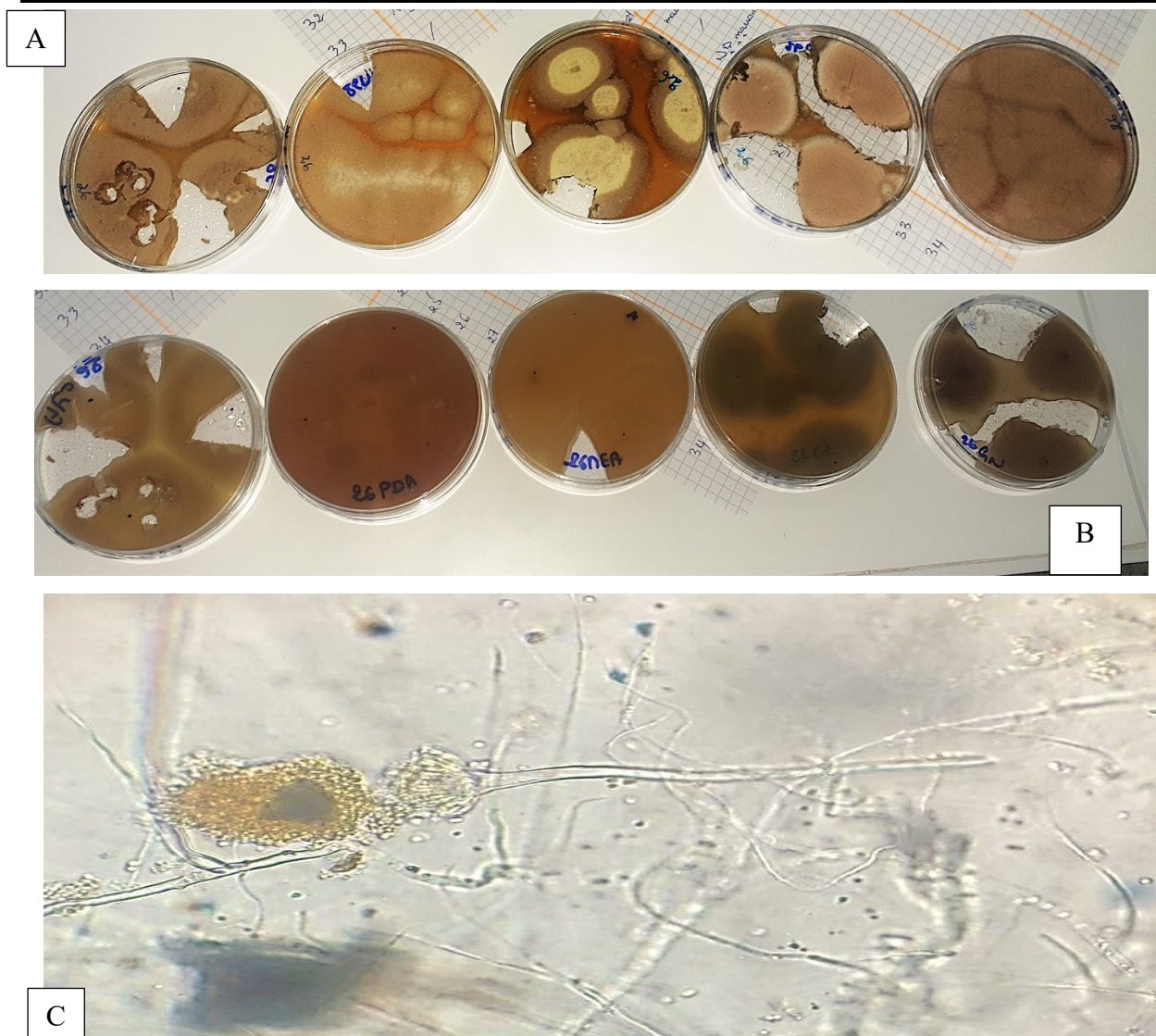


Figure 16: *Aspergillus terreus* 01,(A,B) Aspect macroscopique A:recto ,B: verso sur gélose GN25,CYA,MEA,CZ,PDA incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par l'acide lactique (GX10)

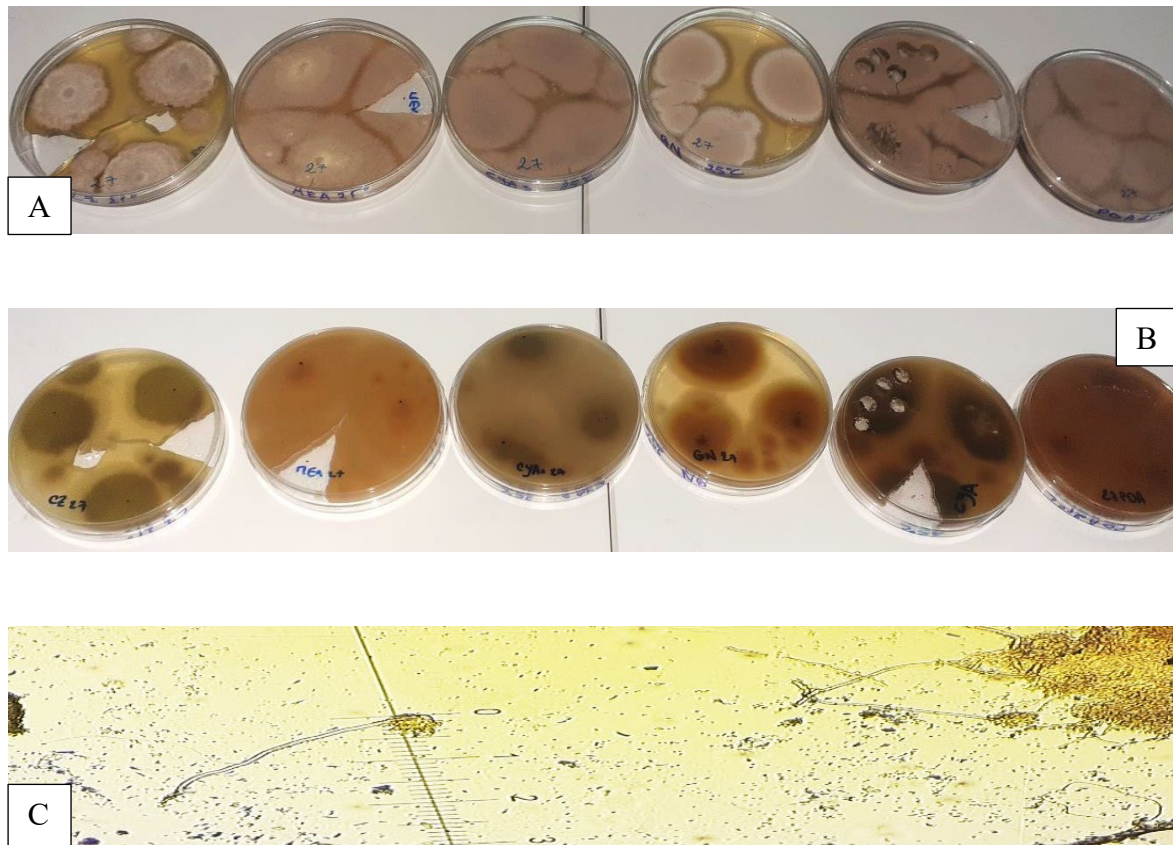
b. Aspergillus terreus 02

Figure 17: *Aspergillus terreus* 02, (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose PDA, CYA, GN25, CYAs, MEA, CZ incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par l'acide lactique (GX10).

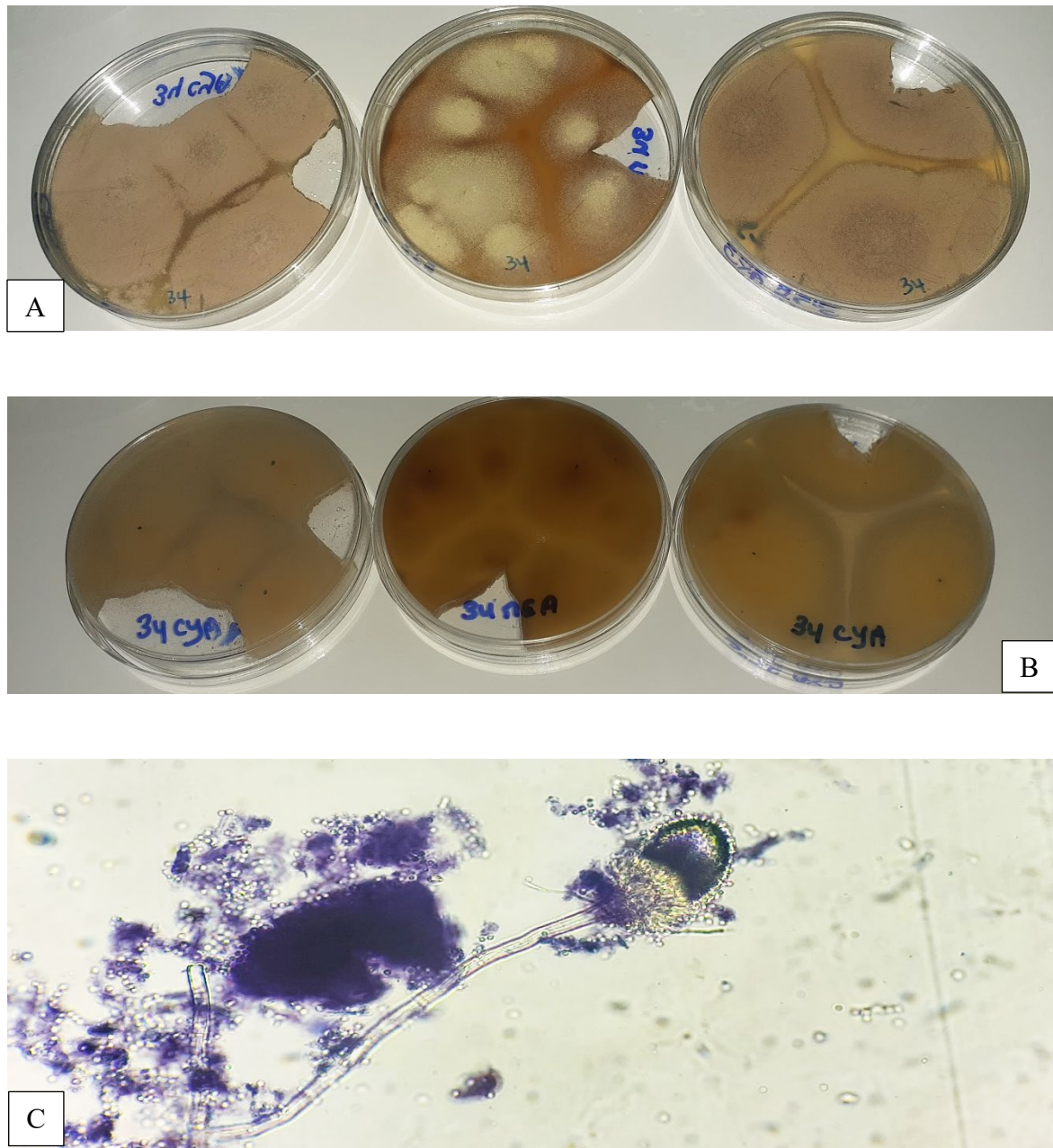
c. Aspergillus terreus 03

Figure 18: *Aspergillus terreus* 03, (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose CYA incubé à 37°C , MEA,CYAs incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par le bleu de méthylène (GX40).

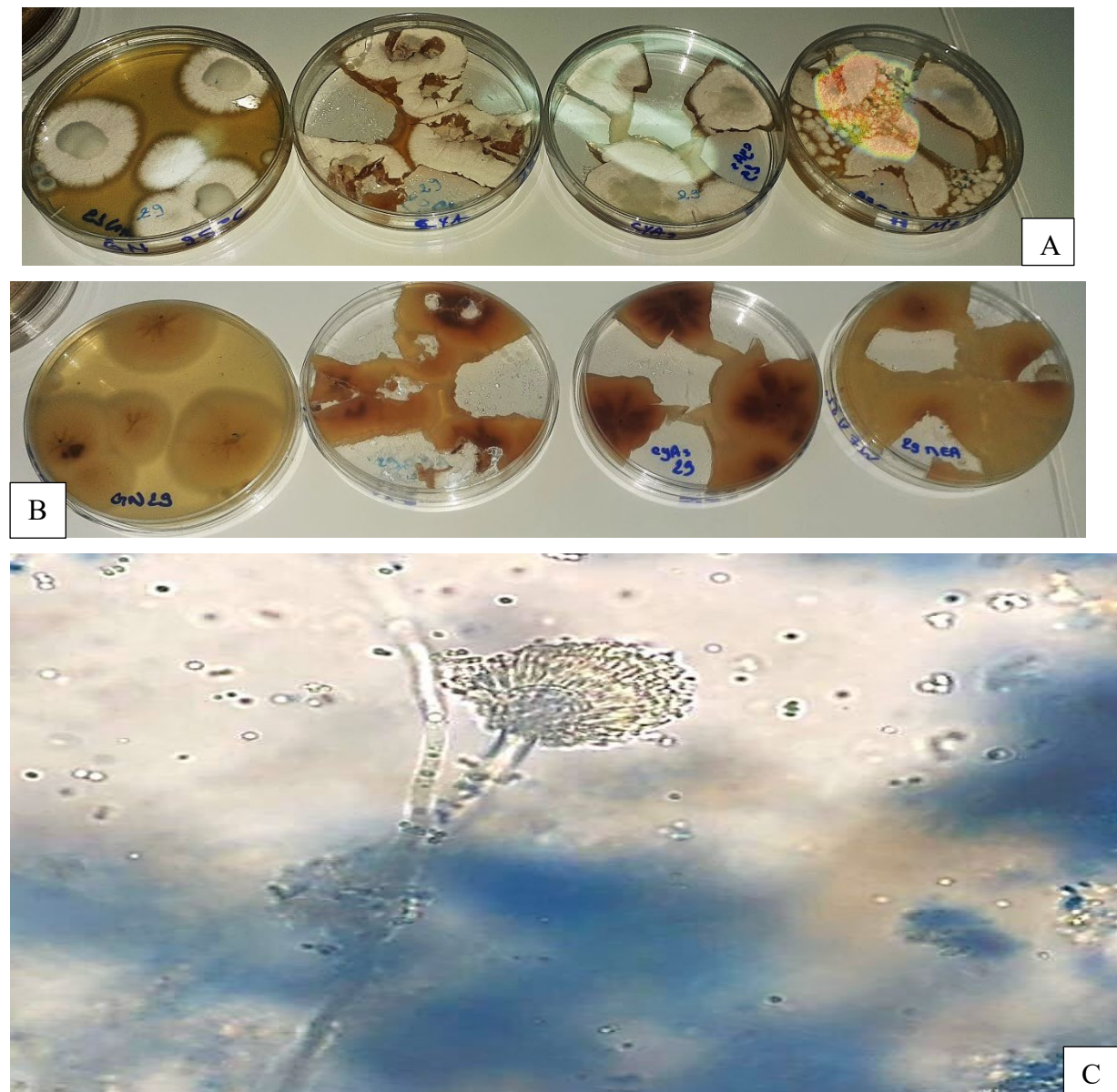
d. Aspergillus sp

Figure 19. *Aspergillus sp*, (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose MEA, CYAs, CYA, GN25 incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par le bleu de méthylène (GX10).

e. Aspergillus glaucus (Eurotium)

Les colonies sont vertes à jaune, parfois brun rouge, selon les espèces, à marge souvent irrégulière. Les *Aspergillus "glaucus" (Eurotium)* sont caractérisés par la présence d'organes de reproduction sexuée: cleistothèces, petites boules jaunes visibles sous la loupe.

Ils produisent des pigments quinoniques. Leur toxicité a été mise en évidence chez les bovins (hyperkératoses), les volailles (baisse de croissance, syndromes hémorragiques), les lapins (entérites, symptômes nerveux), et les porcins (entérites) (Cf.Figure21).

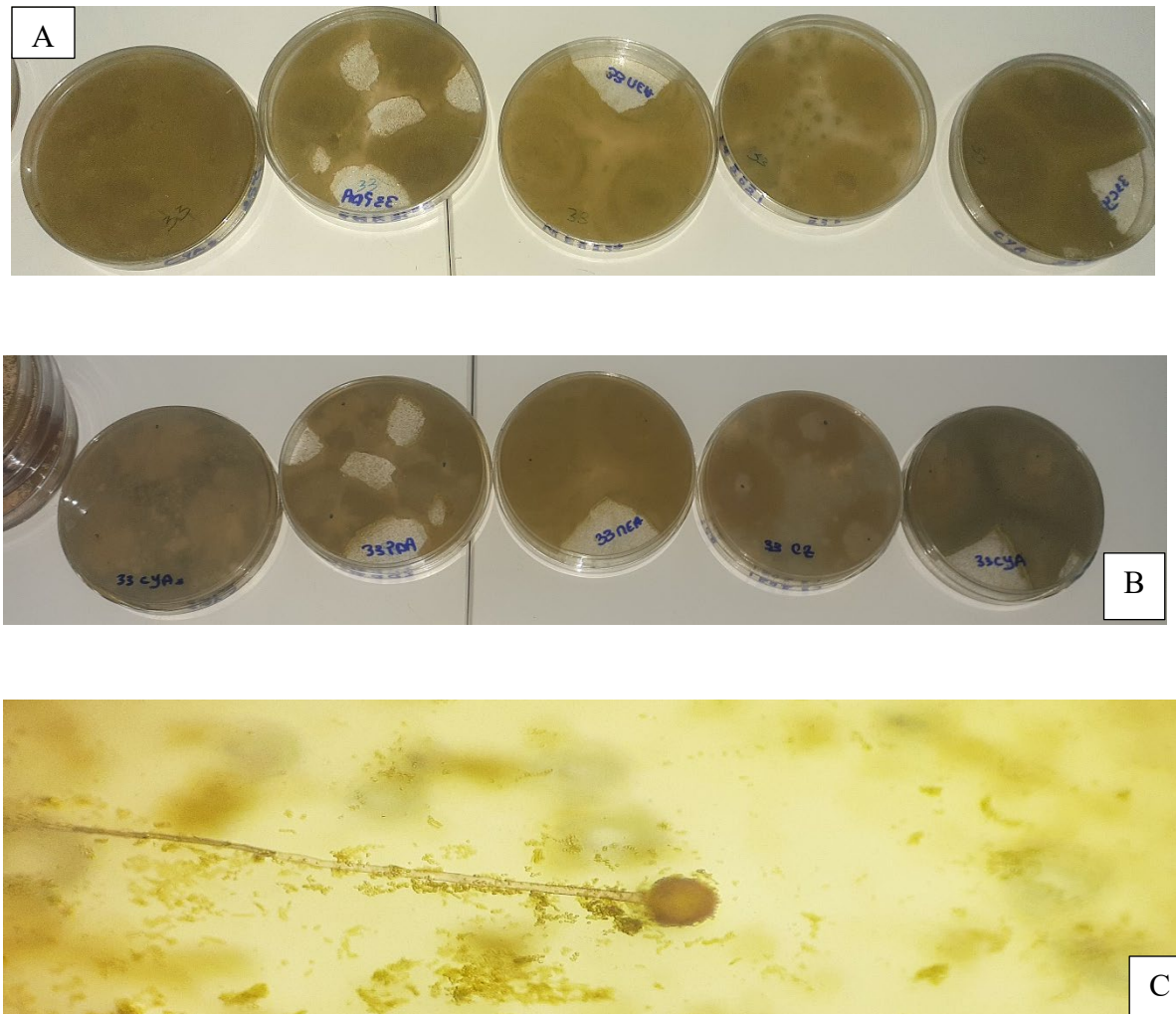


Figure 20: *Aspergillus Eurotium* , (A, B) Aspect macroscopique A: recto, B: verso sur gélose CYA incubé à 37°C ,CZ,MEA,PDA,CYAs incubé à 25°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par le bleu de méthylène (GX40)

III.1.2. Genre *Penicillium*

III.1.2.1. Généralités

Le nom *Penicillium* est donné à un genre de champignons imparfaits (Deutéromycètes) qui comprend environ 300 espèces, réparties en quatre sous genres. Les formes parfaites (téléomorphes) de certaines d'entre elles sont connues, et appartiennent à l'embranchement des Ascomycota à savoir les genres *Eupenicillium* et *Talaromyces*.

Ce sont des contaminants fréquents de nombreux substrats, tels que les aliments. Certains d'entre eux produisent des métabolites toxiques pour les mammifères.

https://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Principaux_groupes/Les+Penicillium

III.1.2.2. Classification

Tableau 12: Classification du genre *penicillium*

Règne	<i>Mycota</i>
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Classe	<i>Euascomycètes (Eurotiomycètes)</i>
Ordre	<i>Eurotiales</i>
Famille	<i>Trichomaceae</i>
Genre	<i>Penicillium</i>

III.1.2.3. Caractères morphologiques

Il se caractérise par la présence de pénicilline, qui est représentée par des tissus en forme de brosse, qui sont portés par des filaments dressés appelés stipes ou conidiophores. L'aspect est lisse ou granuleux, et ses petits sphéroïdes sont disposés en forme ronde ou directement insérés (monospores). Bactéries) ou par son intermédiaire une rangée de métules (double verticille) ou deux rangées de métules continues. (Cf. Figure 22-page. 52) (TABUC.2007)

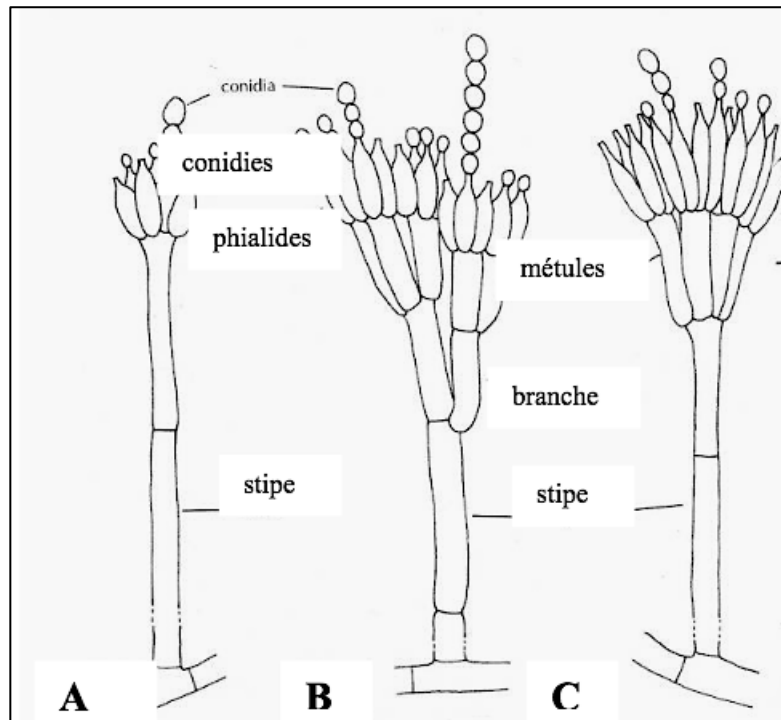


Figure 21: Schéma général de l'organisation des pinceaux de *Penicillium*, utilisé dans l'identification d'après SAMSON et COLL

A: monoverticillé, B: terverticillé, C: biverticillé

III.1.2.4. Caractères cultureux

Les caractères cultureux du genre *Penicillium* sont présentés dans le tableau 12 ci-dessous

Tableau 13: Caractères cultureux du genre *Penicillium*

Taux de croissance	Rapide et commence à s'apparaître des deux (02) jours d'incubation (TABUC, 2007).
Température	Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20-27°C.
Aspect de la colonie	Floconneux (<i>P.camembertii</i> , <i>P.nalgiovensis</i>), funiculeux (<i>P.funiculosum</i>), granuleux (<i>P.expansum</i> , <i>P.griseofulvum</i>), velouté (<i>P.chrysogenum</i>)
La couleur de la colonie	Recto: Blanche (<i>P.camembertii</i>), jaune pâle, chamois (<i>P.nalgiovensis</i>), vert à jaune (<i>P.chrysogenum</i>), vert sombre (<i>P.requiefrotii</i>) (CHERMETTRE et BUSSIERAS, 1993) (suite) (suite tableau 12) Verso: incolore, jaune, rouge, brun ou noir et parfois le pigment diffuse dans la gélose (CHERMETTRE et BUSSIERAS, 1993)

III.1.2.5. Identification macroscopique et microscopique des espèces du genre *Penicillium*

L'identification, et la classification des *Penicillium* sont basées sur différents critères:

- Leurs caractères morphologiques (macro et microscopiques) ;
- Leurs caractères physiologiques (croissance sur différents milieux de culture et à différentes températures) et biochimiques (profils de production métabolites secondaires, profils électrophorétiques, ...) (Cf. Figures 23, 24,25-page 53-54-55).

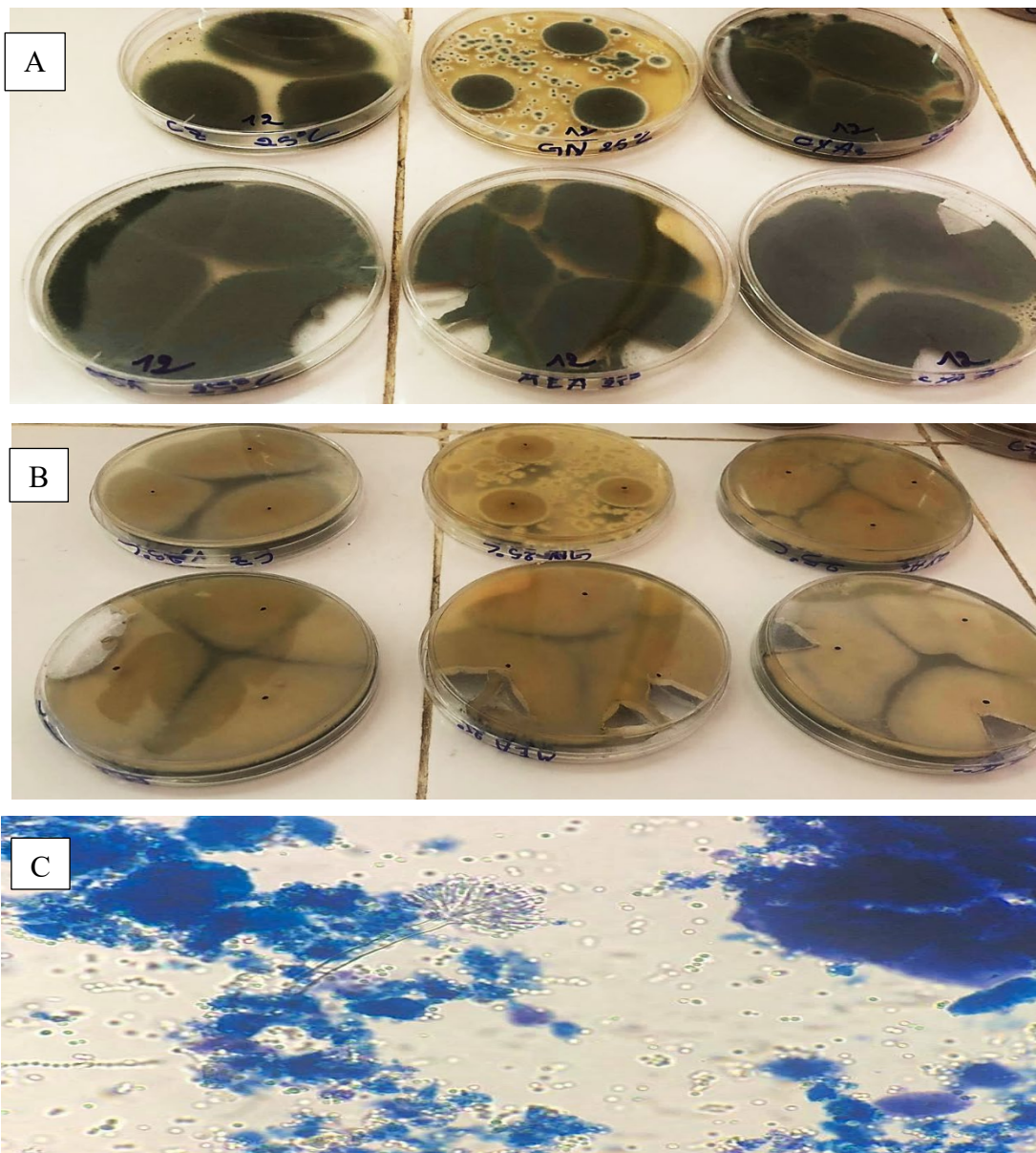
a. *Penicillium sp 01*

Figure 22: *Penicillium sp 01*, (A,B) Aspect macroscopique A:recto ,B: verso sur gélose GN25,CYA, ,MEA,CZ,PDA incubé à 25°C , CYA incubé à 37°C .

(C) : Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (GX40)

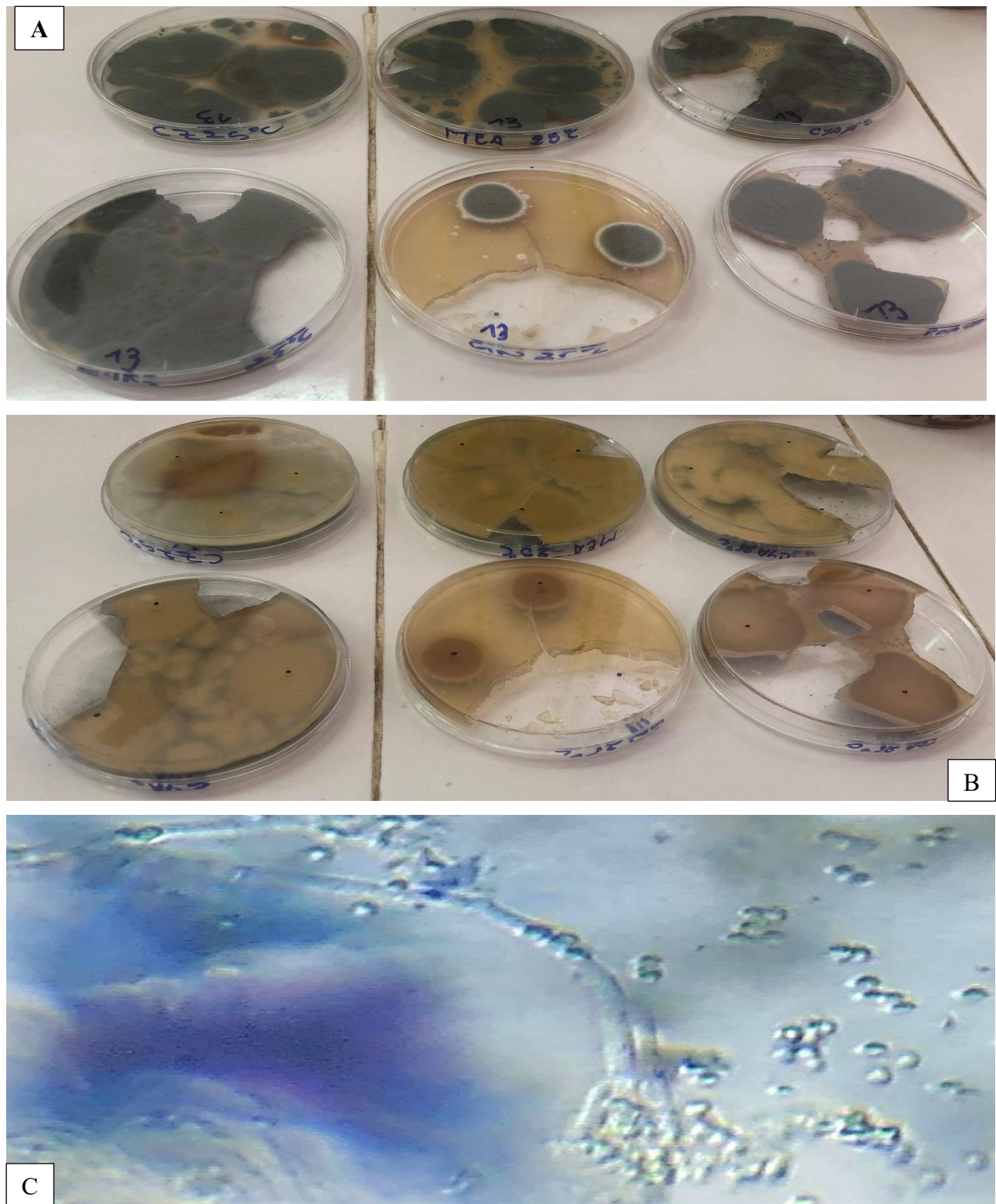
b.Penicillium sp 02

Figure 23: *Penicillium sp 02*, (A,B) Aspect macroscopique A: recto , B: verso sur gélose GN25,CYA, MEA,CZ,PDA incubé à 25°C et CYA incubé à 37°C de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique coloré par le bleu de méthylène (GX40).

c.Penicillium chrysogenum

Les colonies de *Penicillium chrysogenum* sont plates et de texture veloutée. Le mycélium peut avoir des exsudats jaunes.

Les conidiophores sont constitués d'un stipe lisse portant un pénicille terverticillé produisant des colonnes irrégulières de conidies ellipsoïdales lisses et de couleur verte (PITT ,1979) (Cf.figure25)

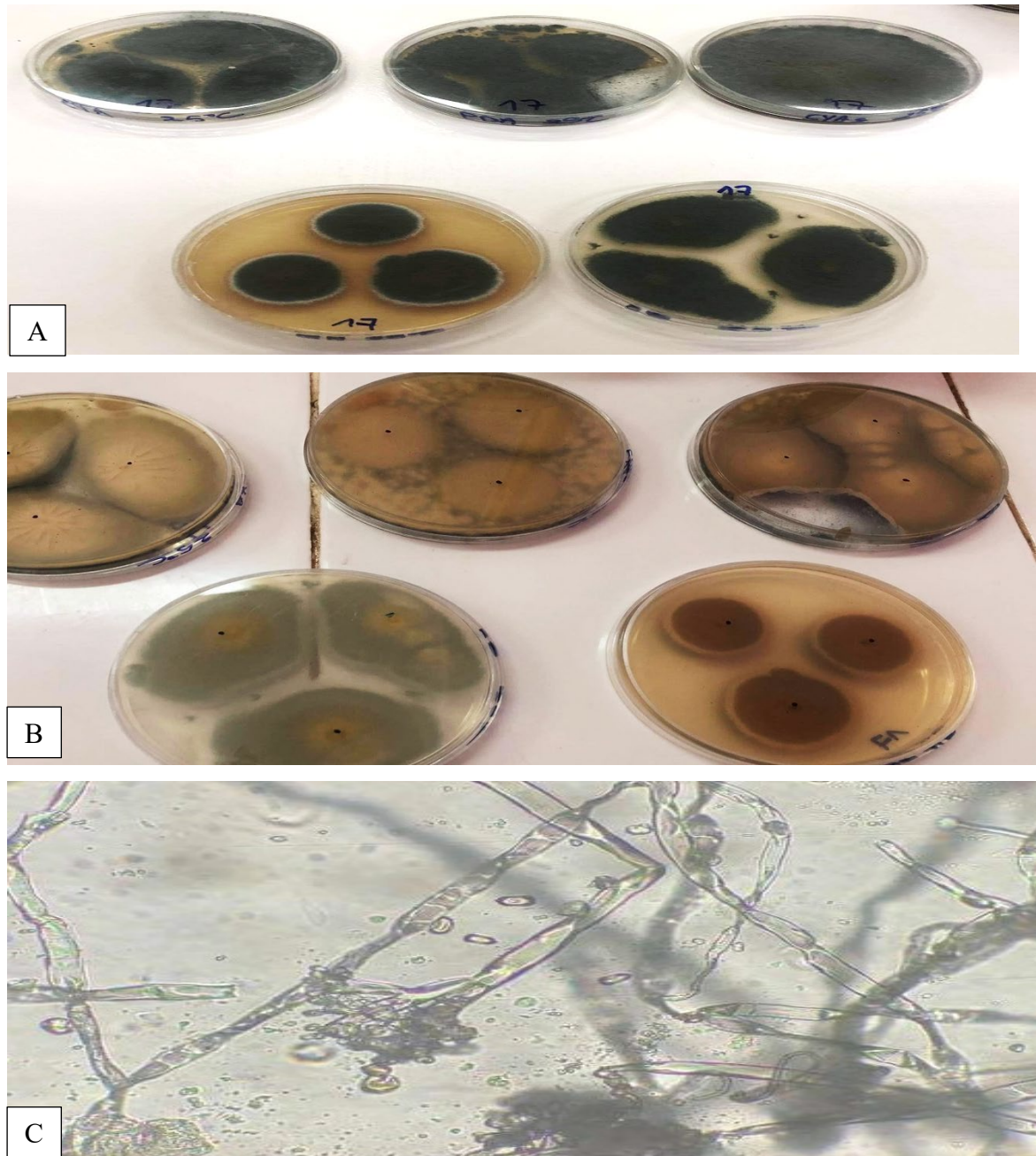


Figure 24: *Penicillium chrysogenum* ,(A,B) Aspect macroscopique A:recto ,B: verso sur gélose GN25,CYA,MEA,CZ,PDA incubé à 25°C et ,CYA incubé à 37°C, de droite vers la gauche respectivement.

(C): Aspect microscopique par l'acide lactique (GX40)

III.2. Extraction et identification des métabolites obtenus à partir des filtrats fongiques obtenus après fermentation

Quatre genres fongiques ont été choisis parmi ceux cités dans le tableau 5 (*Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus* et *Trichoderma*) pour la révélation des métabolites.

1ère révélation

La plaque CCM est placée dans une cuve contenant des cristaux d'iode. L'iode a une grande affinité pour les lipides insaturés. Des taches brunes apparaissent sur la plaque CCM et doivent être marquées avec un crayon afin de calculer le rapport avant, car la couleur s'estompera après la deuxième révélation, qui est une coloration non spécifique. (Cf. Figure 26)

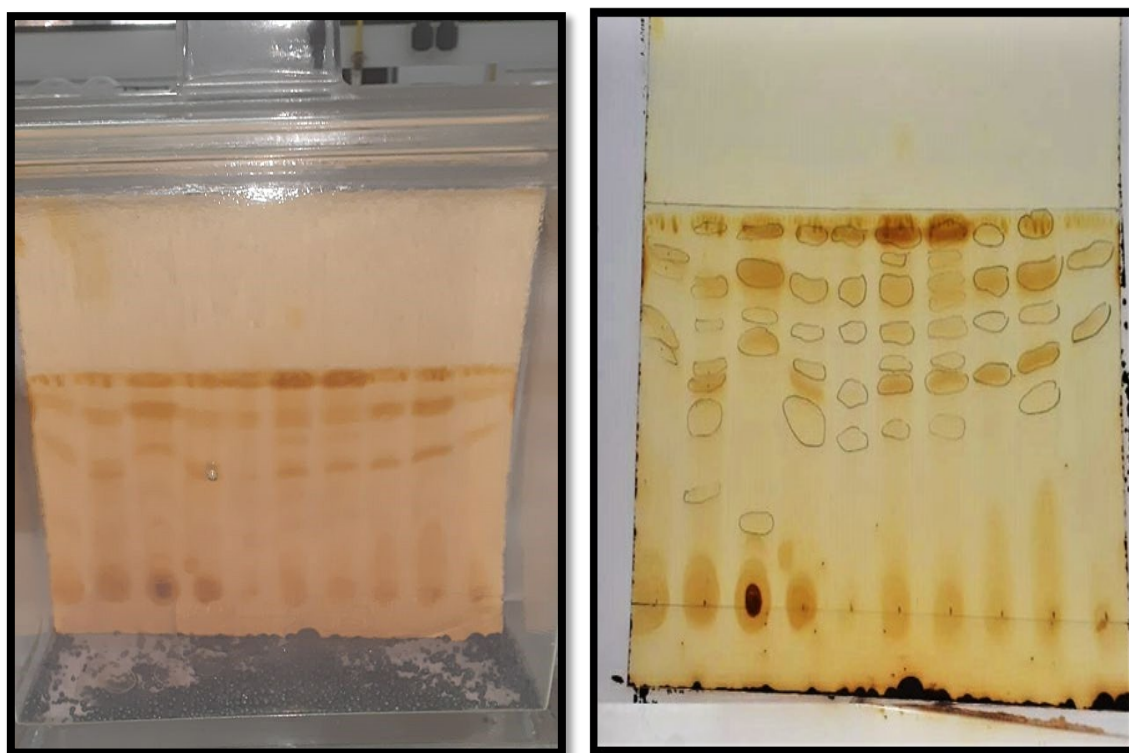


Figure 25. Résultats des taches apparues après la révélation par des cristaux d'iode.

2ème révélation

Cette révélation est faite par l'acide phosphomolybdique. Après avoir aspergé la plaque d'acide phosphomolybdique, la placer dans une étuve à 110°C pendant 30 minutes.

L'apparition de taches violettes indique la présence de phospholipides. (Ollivier et *al.*, 2015)(Cf. Figure 27).



Figure 26. Résultats de la chromatographie du système (chloroforme /méthanol90/10 v/v) après la deuxième révélation par l'acide phosphomolybdique.

Tableau 14. Signification des codes cité sur la figure 27

Code sur la figure	Code de l'extrait	Genre
1	003 I8/H3	<i>Aspergillus terreus</i> 03
2	009 F4/MUC MEA	<i>Mucor</i> sp
3	010 F2 /004 F8 PDA	<i>Fusarium</i> sp 01
4	010F2 /004 F 2 MEA PDA	<i>Aspergillus terreus</i> 01
5	010 F2/ F8 004	<i>Fusarium</i> sp 02
6	Polystère 2020	<i>Aspergillus terreus</i> 02
6'	Polystère 2020	<i>Aspergillus terreus</i> 02
7	004 S2/I6 MEA	<i>Aspergillus Pseudoglaucus</i>
7'	004 S2/I6 MEA	<i>Aspergillus Pseudoglaucus</i>
8	004 F2 /E3 010 MEA	<i>Trichoderma</i> sp

Le deuxième révélateur nous a permis d'observer l'apparition de taches (03 taches) qui indiquent la présence d'autres molécules lipidiques (Cf. Tableau. 14).

Tableau 15: Couleur des taches des extraits avant et après la révélation par l'acide phosphomolybdique.

<i>Genre</i>	Couleur avant révélation	Couleur après révélation
<i>Mucor sp</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Fusarium sp 01</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Aspergillus terreus 01</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Fusarium sp 02</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Aspergillus terreus 02</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Aspergillus terreus 02</i>	Jaune à marron	Violette
<i>Aspergillus Pseudoglaucus</i>	Jaune à marron	Violette

Discussion:

Les taches obtenues sont en nombre de 37 taches avec des RF compris entre 0.2 et 0.97, toutes de couleur jaune à marron.

L'ajout de révélateur 'acide phosphomolybdique' a provoqué une modification de couleur des taches (spots).

La couleur a viré du jaune marron à un violet, ce changement de couleur obtenue confirme la nature des molécules phospholipidiques. Les rapports frontaux sont présentés dans le tableau suivant (Cf. Tableau.15 -page. 59).

Tableau 16. Résultats de l'extraction des métabolites primaires.

Code de l'extrait	Genre	Système de phase mobile
003 I8/H3	<i>Aspergillus terreus 03</i>	0.25 0.7 0.85 0.9
009 F4/MUC MEA	<i>Mucor sp</i>	0.25 0.45 0.56 0.6 0.7 0.8 0.95
010 F2 /004 F8 PDA	<i>Fusarium sp 01</i>	0.2 0.65 0.73 0.82 0.92
010F2 /004 F 2 MEA PDA	<i>Aspergillus terreus 01</i>	0.34 0.6 0.7 0.8 0.93
010 F2/ F8 004	<i>Fusarium sp 02</i>	0.43 0.52 0.68 0.8 0.94
Polystère 2020	<i>Aspergillus terreus 02</i>	0.46 0.56 0.62 0.7 0.77 0.86 0.96 0.57 0.63 0.72 0.76 0.82 0.89 0.94
004 S2/I6 MEA	<i>Aspergillus Pseudoglaucus</i>	0.55 0.63 0.75 0.84 0.53 0.64 0.73 0.85 0.97
004 F2 /E3 010 MEA	<i>Trichoderma sp</i>	0.7 0.9

En absence des témoins de la littérature, il nous a été difficile de déterminer avec exactitude les composants lipidiques contenus dans nos échantillons. Le système éluant chloroforme/méthanol (90/10) a permis une apparition des taches bleu à violette (Cf.Figure. 27 -page. 57) après révélation par l'acide phosphomolybdique qui indique la présence de phosphatidylcholine (RF= 0,34) et phosphatidyléthanolamine (RF=0,60), Sulfate de cérébon (RF=0.25), Cholestérol et acide gras (RF=0.90) . (Cf. Tableau 16)

Tableau 17. Résultats de la chromatographie par solvant: chloroforme/méthanol.

RF	Souches	Métabolites primaires
0,34	<i>Aspergillus terreus 01</i>	Phosphatidylcholine
0,6	<i>Mucor sp Aspergillus terreus</i>	Phosphatidyléthanolamine
0.25	<i>Aspergillus terreus 03 Mucor sp</i>	Sulfate de cérébon
0.90	<i>Trichoderma sp</i>	Cholestérol Acide gras

Tableau 18. Le poids des extraits.

Code de l'extrait	Genre	Poids initial	Poids final	Le rapport Pf-Pi
003 I8/H3	<i>Aspergillus terreus</i> 03	129.1015	130.3574	1.2559
009 F4/MUC MEA	<i>Mucor sp</i>	129.9098	130.2020	0.2922
010 F2 /004 F8 PDA	<i>Fusarium sp 01</i>	107.4037	108.4689	1.0652
010F2 /004 F 2 MEA PDA	<i>Aspergillus terreus</i> 01	129.9221	130.2732	0.3511
010 F2/ F8 004	<i>Fusarium sp 02</i>	99.7823	101.0621	1.2798
Polystère 2020	<i>Aspergillus terreus</i> 02	110.1609	110.8121	0.6512
004 S2/I6 MEA	<i>Aspergillus</i> <i>Pseudoglaucus</i>	99.7803	100.4563	0.676
004 F2 /E3 010 MEA	<i>Trichoderma sp</i>	110.1561	112.7736	2.6175

Après avoir réalisée la méthode d'évaporation des solvants par rotavapeur on a remarqué que le poids final des ballons a augmenté.

Le poids final de l'extrait *Trichoderma sp* est plus élevée parmi les autres extraits avec une différence de 2.6175g cela veut dire qu'il contient plus de molécule lipidique.

III.3. Étude de l'activité antimicrobienne *in vitro* des micromycètes filamenteux par la méthode de diffusion des disques

Le test tend à sélectionner des substances biologiquement actives à partir des isolats fongiques de la présente étude contre huit bactéries pathogènes et 02 levures (Cf. Tableau. 6 -page. 35).

Le diamètre de la zone d'inhibition a été mesuré après 24 heures et 48 heures d'incubation. Toute zone d'inhibition autour du disque de filtrat expérimenté, même de petit diamètre, est considérée comme un résultat positif. (KITOUNI, 2007) (Cf. figure. 28 -page. 62)

GM: antibiotique gentamicine
 T(-): eau distillé stérile
 E.F 1: Extrait fongique 1
 E.F 2: Extrait fongique 2

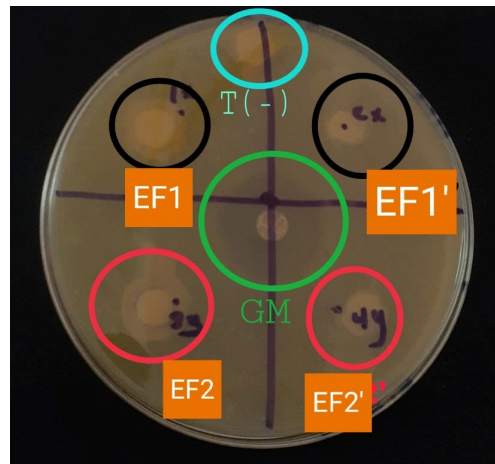


Figure 27. Inhibition, in vitro du développement d'une souche bactérienne par des souches fongiques

Les résultats ont montré que les isolats fongiques testés apparaissaient en quatre groupes selon le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imprégnés de filtrats des souches fongiques examinées (Cf. Tableau 18)

Les résultats ont révélé que les isolats fongiques testés se présentent en quatre groupes en fonction du diamètre d'inhibition (en mm) calculée:

Des extraits ont fort effet antimicrobien: le diamètre de la zone d'inhibition sur les bactéries et levures test est entre de 14 et à 20 mm.

Des extraits à effet moyen: le diamètre de la zone d'inhibition observé sur le milieu de culture est de 10 à 14 mm.

Des extraits à effet faible ou limitée: le diamètre de la zone de lyse des souches testées est de: 8 à 10 mm,

Des extraits à effet nul: le diamètre de la zone d'inhibition autour des disques imprégnés de filtrats des souches fongiques examinées est inférieur ou égal à 8 mm.

Ces quatre groupes sont présentés dans le tableau suivant (Cf. Tableau. 18)

Tableau 19: les quatre groupes des isolats fongiques en fonction du diamètre de la zone d'inhibition.

Groupe	Des extraits à fort effet microbien	Des extraits à effet moyen	Des extraits à effet faible ou limité	Des extraits à effet nul
Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	14-20	10-14	8-10	< ou = 8

Tableau 20: Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les souches testées après 24h d'incubation.

Isolats fongiques	<i>E.coli</i>	<i>P.aerugenosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.cerevisiae</i>
<i>Penicillium sp</i>	-	-	-	19±03	-	12± 0	15± 3	13,5± 0,5	-	-
	-	-	-		3				-	5
<i>Mucor sp</i>	-	5,5± 1,5	1,5± 0,5	04±0 1	6± 1	22,5± 0,5	23,5± 1,5	16,5± 1,5	28,5± 3,5	3,5± 0,5
	-									
<i>P. chrysogenum</i>	-	-	2,75± 2,25	6± 1	-	13± 1	15± 0	11,5± 0,5	27,5± 2,5	3,5± 0,5
	-	-			0,5					
<i>A. terreus 01</i>	-	0,5	-	9± 2	-		-	-	14± 1	4,5± 0,5
	-	-	-		1		-	-		
<i>A. terreus 02</i>	9	-	1,5± 0,5	12,5± 2,5	-	12,5± 2,5	19,5± 0,5	10,5± 0,5	3,5 ± 0,5	-
	-	-			-					-
Disque d'antibiotique	30	10	34	1	24	28	23	17	19	11

D'après les résultats répertoriés dans le tableau 18

- ***E. coli:***

L'extrait fongique *A.terreus 02* a un effet antibactérien faible ou limité d'une valeur de 09mm.

- ***P.aerugenosa:***

L'extrait fongique *Mucor sp* possède une faible zone de lyse de 5.5mm.

- ***B.subtilis:***

Les extraits fongiques *Mucor sp*, *P.chrysogenum* et *A.terreus 02* ont un effet antibactérien nul avec les valeurs: 1.5-2.75-1.5 mm respectivement.

- ***Enterococcus:***

L'extrait fongique *Penicillium sp* possède un fort effet antimicrobien de valeur 19 mm.

L'effet de cet extrait est plus important que celui du disque d'antibiotique.

L'extrait fongique *A.terreus 02* possède un effet antibactérien moyen d'une valeur de 12.5mm.

- ***Klebsiella:***

Aucun extrait n'a présenté un effet antibactérien.

- ***Vibrio:***

L'extrait *Mucor sp* possède la plus importante zone de lyse bactérienne 22.5 suivi de l'isolat *A.terreus 02* 15mm puis l'isolat *P.chrysogenum* et *penicillium sp* (14 et 12mm)

- ***K.pneumonia:***

L'isolat fongique *Mucor sp* a un fort effet antimicrobien d'une valeur de 23.5mm puis l'extrait *A.terreus 02* avec la valeur 19.5 mm.

L'isolat *penicillium sp* a un effet antibactérien moyen à fort avec une valeur de 15mm.

L'extrait *P.chrysogenum* possède un effet moyen contre la souche bactérienne *K.pneumonia* avec une valeur de 15mm. En revanche L'extrait *A.terreus 01* ne possède aucun effet antibactérien.

- ***Citrobacter:***

L'extrait fongique *Mucor sp* possède une forte activité antibactérienne d'une valeur de 16.5mm proche de l'activité de disque d'antibiotique (17mm).

L'extrait fongique *A.terreus 02* possède un effet antibactérien faible (10.5mm) contre *Citrobacter*.

L'extrait de la souche fongique *A.terreus 01* n'a aucun effet antibactérien.

En revanche, l'extrait fongique *Mucor sp* possède une activité de lyse bactérienne efficace (16.5mm).

- ***C.albicans:***

Les extraits fongiques *Mucor sp* et *P.chrysogenum* possèdent une activité antifongique forte contre la levure *C.albicans* avec des diamètres de diffusion 28.5mm et 27.5 mm respectivement suivi de L'extrait fongique *A.terreus 01* à une moyenne activité antifongique avec un diamètre de diffusion de 9 mm.

En revanche, *Penicillium sp* n'a aucune activité antifongique aucune apparition d'un diamètre de diffusion (aucune diffusion).

- ***S.cervisiae:***

Tous les extraits fongiques testés n'ont pas présenté une activité antifongique contre la souche levurienne *S.cervisiae*.

Après 48h, une deuxième lecture a été effectuée afin de vérifier si les molécules à effet antibactérien et antifongique vont agir d'avantage avec le prolongement de la durée. Les résultats sont répertoriés dans le tableau 20.

Tableau 21: Activité antibactérienne développée par l'ensemble des isolats fongiques sur les souches testées après 48h d'incubation.

Isolats fongiques	<i>E.coli</i>	<i>P.aerugenosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Vibrio</i>	<i>K.pneumonia</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C.albicans</i>	<i>S.cerevisiae</i>
Penicillium sp	- -	- -	- -	14,5 ± 0,5	- -	- -	14 ± 0	- -	26,5±1,5	13,5±1,5
Mucor sp	17± 2	5,5± 1,5	14 ± 2	4 ± 1	6,5 ± 0,5	21,5 ± 1,5	22,5 ± 2,5	16,5± 1,5	17,5±0,5	10,5±0,5
P. chrysogenum	- 1	- -	- -	14,5 ± 0,5	12 ± 2	11,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	10± 1	- -	11,5±1,5
A. terreus 01	- -	3,5 ± 1,5	13,5 ± 0,5	12,5 ± 1,5	4,5 ± 0,5	7,5 ± 0,5	- -	18± 0,5	32±0,5	15,5±0,5
A. terreus 02	15 -	- -	2,5 ± 0,5	11,5 ± 0,5	- 1	10,5 ± 1	18,5 ± 0,5	10±1	20±0	- -
Disque d'antibiotique	30	22	34	10	24	30	26	23	14	11

- ***E. coli:***

La souche *Mucor sp* a présenté un effet antibactérien fort de valeur de 17 mm.

La souche *A. terreus 02* a augmenté de 6mm vis à vis le temps, alors que les autres souches fongiques n'ont aucun effet antibactérien même après le prolongement de la durée.

- ***P.aerugenosa:***

Penicillium sp et *P. chrysogenum* et *A. Terreus 02* n' ont pas présenté un effet antibactérien, la souche *Mucor sp* est resté constante contrairement à la souche *A. terreus 01* qui a augmenté de 3.5 mm après 48h d'incubation.

- ***B.subtilis:***

L'isolat fongique issu de *Penicillium sp* n'a révélé aucune inhibition, alors que le diamètre de la zone d'inhibition de l'isolat *Mucor sp* a augmenté de 15mm ainsi la zone de lyse du filtrat *P. chrysogenum* a disparus. L'isolat *A. terreus 01* a présenté une forte activité antibactérienne de valeur de 13.5 mm.

L'isolat *A. Terreus 02* a faiblement changé du diamètre.

- ***Enterococcus:***

Le diamètre de la zone d'inhibition des souches fongiques *Penicillium sp* et *A. Terreus 02* a diminué de 3.5mm – 1mm respectivement, alors que celui de la souche *Mucor sp* est resté constant. Le diamètre de *P. chrysogenum* a augmenté de 8.5 mm.

- ***Klebsiella:***

La zone de lyse de souche fongique *Penicillium sp* a disparue.

La zone de lyse des souches fongiques *P. chrysogenum* et *A. terreus 01* a augmenté de 11.5 mm- 1mm respectivement.

- ***Vibrio:***

La zone de lyse des souches fongiques *Penicillium sp* a disparue.

Le diamètre d'inhibition de l'isolat fongique *Mucor sp* est constant.

Une diminution faible de valeur de 1.5 mm des souches *P. chrysogenum* et *A. Terreus 02*.

- ***K.pneumonia:***

Les zones de lyse des extraits fongiques de *Penicillium sp* et *Mucor sp* ont diminué de 1 mm.

- *Citrobacter*

Aucune activité antibactérienne de l'extrait fongique de *Penicillium sp*, alors que celle de l'extrait fongique de *A. terreus 01* a montré être d'une valeur de 14mm.

Les autres souches sont restées insensibles.

- *C.albicans*:

Une augmentation du diamètre de la zone de lyse a été remarquée chez les extraits fongiques de *A. terreus 01* et *A. Terreus 02*.

Une apparition d'une zone d'inhibition de l'extrait de *Penicillium sp*, en parallèle, on constate une disparition des halos formés avec l'extrait de *P. chrysogenum*.

- *S.cerevisiae*

Une augmentation du diamètre d'inhibition dans les boîtes de Pétri testées par tous les extraits fongiques à l'exception de celui de *A. Terreus 02*.

Cette augmentation peut être expliquée par la forte intensité de l'activité antibactérienne ainsi que la bonne diffusion des métabolites.

Presque tous les extraits fongiques se sont révélés actifs envers toutes les souches bactériennes et levuriennes testées mais avec des degrés différents.

Les filtrats des souches fongiques étudiées obtenus après fermentation: *Penicillium sp*, *A. Terreus 02*, *Mucor sp*, *P. chrysogenum*, ont manifesté un effet antibiotique important sur les souches bactériennes et levuriennes *Citrobacter*, *C.albicans*, *Enterococcus*, *Vibrio*, *K.pneumonia*.

Selon (BOTTON et al., 1990), les espèces de moisissures sont connues par leur production de substances à effet antibactérien, elles produisent, généralement, des métabolites secondaires biologiquement actifs, synthétisés en fin de croissance et possèdent des structures chimiques différentes de celles des protéines (ATTALAH et CHAUCHE, 1992).

Les tests antibactériens réalisés avec les filtrats fongiques (*Penicillium sp*, *Mucor sp*, *P. chrysogenum*, *A. terreus 01*, *A. terreus 02*) ayant une activité négative contre les souches bactériennes testées (*Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Klebsiella pneumonia*., *Citrobacter sp*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) ceci peut être expliqué par l'effet de la source de carbone et d'énergie comme le glucose. En effet, à cause de son assimilation rapide, le glucose exerce une répression catabolique (effet glucose) (BITSI, 2002 ; COMPAORE, 2011).

Les résultats de l'activité antibactérienne obtenus sur la souche test *K. pneumoniae* peuvent aussi être interprétés par la présence de la capsule de nature polysidique, composée de plusieurs sucres. Cette capsule intervient dans la défense de la bactérie contre les agents antibactériens. Elle est donc considérée comme résistante aux différentes attaques antibactériennes des autres moisissures testées. En plus de cette résistance, *Klebsiella* produit naturellement des β -lactamases, enzymes qui dégradent la β -lactamines (penicilline A) produite par le genre *Penicillium* (SMAOUI, 2010). Nos résultats sont conformes à ceux trouvés dans la littérature par LAREDJ en 2004 qui a noté une faible sensibilité de *K.pneumoniae* à l'huile essentielle de menthe.

Le pouvoir inhibiteur remarqué de quelques filtrats issus après fermentation montre que les souches fongiques étudiées constituent un potentiel biotechnologique important et prometteur.

La présente étude a révélé que parmi les souches fongiques étudiées ayant une vitesse de croissance rapide, une activité antimicrobienne et antifongique importante. Ainsi qu'ils sont potentiellement actifs, sont assignées dans le tableau ci-dessous (Tableau 21).

Tableau 22. Tableau récapitulatif des espèces fongiques étudiée potentiellement actives

Caractéristiques des espèces fongiques étudiées	Vitesse de croissance	Métabolite primaire	Activité antimicrobienne et antifongique
	<i>Aspergillus terreus</i> 03	<i>Aspergillus terreus</i> 01	<i>Mucor sp</i> ,
	<i>Penicillium sp</i>	<i>Aspergillus terreus</i> 03	<i>Aspergillus terreus</i> 02
		<i>Trichoderma sp</i>	<i>Aspergillus terreus</i> 01
		<i>Mucor sp</i>	<i>Penicillium sp</i>
			<i>P. chrysogenum</i>

Les codes de référence des espèces fongiques potentiellement actifs de la présente étude.

003I8/H3 = *Aspergillus terreus*03

010F2 /004F2MEAPDA= *Aspergillus terreus*01

Polystère2020= *Aspergillus terreus*02

004 F2 /E3 010 MEA= *Trichoderma sp*

009 F4/MUC MEA =*Mucor sp*

OP 0105512 03/022= *P. chrysogenum*

010 E2 /010F2/10MEA. = *Penicillium sp*

CONCLUSION

CONCLUSION

Dans le présent travail, notre intérêt s'est porté sur l'étude et l'identification des champignons filamenteux marins par la méthode OSMAC. Trente-quatre souches appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* ont été isolées à partir de différente matrice (sédiments de fond, de l'eau de mer, de débris et d'organismes marins (moules, oursins) au niveau du port d'Alger et conservées à la mycothèque. Leur pouvoir de production de métabolite a été testé par la méthode CCM ainsi que leurs activités antibactériennes et antifongiques en utilisant la méthode diffusion des disques.

Les résultats recensés de la méthode OSMAC nous ont permis d'identifier et de caractériser huit espèces, Parmi lesquelles cinq *Aspergillus* (*Aspergillus terreus01*, *Aspergillus terreus02*, *Aspergillus terreus03*, *Aspergillus sp* et *Aspergillus glaucus*) et trois espèces de *Penicillium* (*Penicillium sp01*, *Penicillium sp02* et *Penicillium chrysogenum*). Leur vitesse de croissance dans les différents milieux de culture utilisés PDA, MEA, CYA, GN25, CZ, CYAs a montré que les espèces *Aspergillus terreus03* et *Penicillium sp* présentent une croissance rapide sur le milieu CYA et CYAs, respectivement.

La révélation des extraits obtenus par fermentation des cinq souches fongiques par la méthode de chromatographie sur couche mince CCM a montré la présence de nombreux métabolites primaires, dont le système d'élution testé (chloroforme / méthanol) (90:10) a permis la migration de cinq molécules à savoir: phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolomine (Bris,1982), sulfate du cérébon, cholestérol et acide gras qui ont été détecté chez *Aspergillus terreus01*, *Mucor sp* et *Aspergillus terreus01*, *Aspergillus terreus 03* et *Mucor sp*, *Trichoderma sp*, respectivement.

Le test de l'activité antimicrobienne a été réaliser avec 8 souches bactérienne *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Klebsiella pneumonia.*, *Citrobacter sp*, *Candida albicans* , *Saccharomyces cerevisiae*

Les meilleures zones d'inhibition ont été observées en utilisant pour les extraits des souches fongiques *Mucor sp* et *A.terreus02* par rapport la souche bactérienne *Klebsiella pneumonia* , *P.chrysogenum* . *Penicillium sp* vis à vis la bactérie *Enterococcus sp*. *A.terreus01* vis à vis *Bacillus subtilis*. Tandis que, les extraits des souches ayant montré un effet antifongique vis à vis la levure *Candida albicans* sont *Mucor sp*, *P.chrysogenum* , *Penicillium sp* , *A.terreus01* et *A.terreus02*. En outre ceux qui ont révélé une activité fongique vis à vis la levure *Saccharomyces cerevisiae* sont *Penicillium sp*, *Mucor sp*, *P.chrysogenum* et *A.terreus01*.

Les résultats de la présente étude ont révélé que les champignons microscopiques filamenteux énumérés dans le port d'Alger sont une source prometteuse pour le domaine biotechnologique. Ces dernières peuvent avoir un intérêt nutritif grâce à leur richesse en lipides, acides gras en plus en tant que source de composés antibactériens et antifongiques.

En se basant sur ces résultats, il est d'intérêt primordial de fixer les points suivants comme perspectives:

- L'identification moléculaire des souches fongiques recensées.
- Caractériser les souches intéressantes pour l'étude de l'activité antibactérienne afin d'étudier les métabolites secondaires *in vivo*.
- L'ultra purification et identification des substances bioactives par des méthodes plus performantes et précise (CG-SM, HPLC, CPG, ...).
- Orienter les recherches scientifiques futures vers la réalisation des études approfondies et complémentaires qui seront nécessaires pour développer l'axe thérapeutique par les bienfaits des champignons marins.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABE, et al 2010. Extraction liquide-liquide: théorie, applications, difficultés. In *Annales de toxicologie analytique* (en ligne) .(vol22,No 2 ,pp.51-59) EDP sciences.

ATTALAH M & KACEM –CHAOUICHE N. 1992. Production of ochratoxin A in a semi synthetic: « in the second Regional Mycological Conf. RMC 2 ». Cairo. Egypt.

BADILLET G., DE BRIEVE C., GHEHO E. 1987. Champignons contaminants des cultures, *Atlas clinique et biologique*, vol II, Ed VARIA, Paris

BEHNAS D., BENAYACHE A. 2015. Extraction et identification de mycotoxines de *Penicillium chrysogenum* (en ligne). Mémoire de Master. Département: microbiologie université des freres mentouri constantine faculté des sciences de la nature et de la vie pour découvrir les lipides insaturés (eastern illinois université, 2008).

BELITZ, H.D., ET GROSCH, W.1987. vegetables and their products. (en ligne) *food chemistry* 549-577.

BITSI MJM. 2002. Isolement et caractérisation d'une souche de champignon productrice d'antibiotiques. Diplôme d'études Approfondies (DEA), Université de Ouagadougou, Ouagadougou, p. 58.

BLACKWELL M.,VILGALYS R., TAYLOR J.W. 1998. Fungi, Eumycota. In *The Tree of Life*, D.R. Maddison and W.P. Maddison editor, University of Arizona.

BOIRON PATRIC 1996, Organisation et biologie des champignons (en ligne Diversité fongique 9 rue Méchain, 75014. Paris: Nathan. P: 11-36.

BOTTON B et al. 1999. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielles en (en dition. Paris: Masson. Collection Biotechnologies P. 12-426

BOTTON B, BRETON A, FEVRE M, GAUTHIER S, GUY PH, LARPENT JP, REYMOND P, SANGLIER JJ, VAYSSIER Y ET VEAU P .1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2ièmeEd. Masson. 426p.

BOUCHET P. H., GUIGNARD J.L., VILLARD J.1999. Les champignons, Mycologie fondamentale et appliquée. Ed. Masson, Paris. 194p.

BOUDIH S. 2011. Identification des moisissures et de leurs métabolites secondaires colonisant des supports papiers: évaluation de la toxicité sur les cellules épithéliales respiratoires in vitro. Thèse de Doctorat en Sciences Agricoles. Université Paris-Est.

BOURGEOIS CLAUD MARCEL et al., 1989. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments (en ligne). tome 1. 2ème édition paris:lavoisier P2016-244 .

BRIS, B.1982 évolution des protéine et des lipides au cours de la réaction d'incompatibilité gamétophytique, espèce auto incompatible. (en ligne) Doctoral dissertation

BRISOU J. 1975. La microbiologie du milieu marin: Les levures et les champignons du milieu marin. Flammarion Médicales (collection de l'institut Pasteur), Paris, 159-162,271 p.

CARLILE M.J., WATKINSON S.C. THE FUNGI. 1994. (Academic Press eds).

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.

CHABASSE, D.2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, Bioforma.France. pp. 25-27. champignons opportunistes,

CHABASSE D., BOUCHARA J.P., DE GENTILE L., BRUN S., CIMON B., PENN P. 2002.Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n° 25, Bioforma. 159p.

CHABASSE, D ; PENN P ; CIMON B ; BOUCHARA J ; DE GENTILE L ;BRUN S.2002 Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale.

COMPAORE H. 2011. Caractérisation des moisissures productrices d'antibiotique et propriétés biochimiques des antibiotiques produits. Diplôme d'Etude Approfondies (DEA), Université de Ouagadougou, p. 102.

DAVET P. 1996. Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P. 52- 57.

DAVET R. 1997. La Communauté Fongique: Son organisation et rôle dans l'écosystème. Marcel Dekker, Inc., New York.

DAVET, P., AND ROUXEL, F. 1997. Detection et isolation des champignons du sol. INRA. Paris. 17-54.

DELARRAS C. 2007. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Edition Lavoisier, 654 pages

DEMAIN A AND FANG A. 2000. The natural functions of secondary metabolites .Adv.Biochem. Eng. Biotechnol. 69: 1-39.

FERTOUT-MOURI ,N.,2016 Composition chimique et activité antibactérienne de l'huile essentielle de *teucrium polium L du mont de tessala* (Algérie occidentale) (en ligne) *phytotherapie* 15, 346-353(2017).

GUIRAUD J-P. 2003. Microbiologie Alimentaire Ed. Duond: Paris.

HYDE K.D., GARETH-JONES E.B., LEANO E., POINTING S.B., POONYTH A.D. & VRIJMOED.L.L.P. 1998. Role of fungi in marine ecosystems. Biodivers. Conserv, 7, 1147-1161.

JAN KOHLMAYER ., 1995. Fungi on *Juncus roemerianus* 2. New Dictyosporous Ascomycetes , Botanica Marina Volume 38: Issue 1-6. Walter De Gruyter.

JEAN-MARIE PÉRÈS, « OCÉAN ET MERS (Eaux marines) - Propriétés », *Encyclopædia Universalis*

JIN L., QUAN C., HOU X. , and FAN S.2016. Potential pharmacological resources: Natural Bioactive Compounds from Marine-Derived Fungi.

KARAOUI SILIYA, 2017 Etude de l'activité antibactérienne des champignons endophytes foliaires de *Peganum harmala* de la région de Laghouat(Algérie).Université de Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou, p39.

KERZAON , I. 2009 *Métabolites bioactifs d'Ascomycètes marins: dérégulation, isolement, identification et étude de production* .(en ligne) kingdoms. Proc Natl Acad Sci USA, 74 (11),5088-90.

KITOUNI MAHMOUD, 2007. Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystème extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées (en ligne). Thèse de doctorat université Mentouri Constantine Algérie P73.

KOHLMEYER J,KOHLMEYER E. 1979.*Marine Mycology: The Higher Fungi*, Academic Press, New York.

KOHLMEYER J , KOHLMEYER E. 1995.Decomposition of mangrove wood by marine fungi and teredinids in Belize. Mar. Ecol, 16 (1), 27-39.

KOHLMEYER J. 1977. New genera and species of higher fungi from the deep sea (1615-5315 m). Rev. Mycol, 41, 189-206.

KOHLMEYER J. 1983. Geography of marine fungi.Aust. J. Bot. Suppl. Ser, 10, 67-76.la Loire, recherche de souches toxigènes. Th.: Pharmacie: Université de Nantes,

LAREDJ H. 2004. Les plantes médicinales: extraction des huiles essentielles et activités antibactérienne. Université Badji Mokhtar, Annaba. P 21.

LECELLIER A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle. Thèse de Doctorat en Sciences Technologie Santé. Biologie-Biophysique. Université de REIMS CHAMPAGNE-ADRENNE.

LOUISOT P. , 1983 Lipides et dérivés isoprénique. Biochimie générale et médicale. Paris, simep. pp.259-321

MAAMAR A., LUCCHESI M., DEBEATS S., NGUYEN VAN LONG N., QUEMENER M., COTON E., BOUDERBALA M., BURGAUD G, and MATALLAH-BOUTIBA A. 2020. Highlighting the Crude Oil Bioremediation Potential of Marine Fungi Isolated from the Port of Oran (Algeria).

MADELIN T.M. 1994. Fungal aerosols: a review. Journal of aerosol science. 25: 1405-1412.

MAMMAR A. 2015. Etude de la biodégradation du pétrole brut par le peuplement fongique -du port d'Oran. Mémoire de Magister. Université d'Oran.

MATALLAH-BOUTAIBA A., 2009. Inventaire des espèces fongiques des eaux marines du littoral occidental algérien (en ligne). Thèse.doct , univ oran,Algérie: 143P

Moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation n° 25, Bioforma. 159p.

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

MUELLER G.M., SCHMIT J.P. 2007. Fungal biodiversity: what do we know ? What can

NAJIH S. 2008. Onychomycoses à moisissures: étude rétrospective au laboratoire de la Parasitologie et de mycologie médical de l'hôpital de Rabat sur la période 1993-2007 thèse de pharmacie. Faculté de médecine et de pharmacie de Rabat. P 47-48.

NATARO, J. P., BOPP, C. A., FIELDS, P. I., KAPER, J. B., & STROCKBINE, N. A. 2007. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (9th ed., pp. 670-687). Washington, DC, USA: ASM press. E.COLI 03

PITT J.I. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species (2nd ed.). Commonw Scientif Ind Research Organisation, North Ride Australia, 197 p.

PITT J.I. 1979. The genus *penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, U.K. 324 p.

PITT JOHN I. 1988. Laboratory guide to common *Penicelium* species .LONDON. Academia Press editor, 79(3):491.

POLGLASE, J.L. et al 1986. Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals, In: the biology of marine fungi (en ligne). Londre: moss S.T., Cambridge University Press , pp. 155-164.

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

RUIZ ,N.2007 *micromycètes et métabolites fongiques en milieu marin: isolement des souches, mise en culture, production ,identification, et évaluation pharmacologique des lipides, acides gras et peptides.* (En ligne). (Doctoral dissertation Nantes).

SALLENAVE C. 1999. Etude de la flore fongique des zones conchylicoles de l'estuaire de la Loire. Recherche des souches toxigenes. Thèse de Doctorat. Université de NANTES.

SAMSON R.A., HOEKSTRA E.S., FRISVAD J.C. 2004. Introduction to food and airborne fungi. 7th edition. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmel cultures

SAMSON R.A., VISAGIE C.M., HHOUBRAKEN J., HONG S.B., HUBKA V., KLAASSEN C.H. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud Mycol, 78, pp. 141-173

SILBER J. et al . 2016. From discovery to production: biotechnology of marine fungi for the production of new antibiotics (en ligne) *Mar Drugs*.

SMAOUI SLIM 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de toulouse OATAO.

SRIDHAR , K.R et PRASANNARAI, K.2001. Biogeography and biodiversity of higher marine fungi in tropics- A review. Reserche Gate. Ecol.Env & 7 (3): 219-234

TABUC. 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines (en ligne Toulouse, pp, 35-120. des mycotoxines. Thèse doctorat. Ecole nationale vétérinaire. PP, 35-120.

TORTORA J., FUNK B.F. ET CASE CH.L. 2003. Introduction à la microbiologie, (edn) we predict? Biodiversity and Conservation. 16: 1-5.

Wilson, W. R., Sande, M. A., & Drew, W. L. 2001. Current diagnosis & treatment in infectious diseases. New York: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

WOESE C., FOX G.1977. Phylogenetic structure of prokaryotic domain: the primary

ZHAO H., CAI C., LIU X., JIAO B., CHEN B., CAI M., HE P. 2018. Secondary metabolites of Antarctic fungi antagonistic to aquatic pathogenic bacteria. Research Article. DE CRUYTER.

ANNEXES

ANNEXE 1: Les produits chimiques utilisés

- L'acide sulfurique concentré H_2SO_4
- L'hydroxyde de sodium $NaOH$
- Sulfate de cuivre $CuSO_4$
- L'acide nitrique HNO_3
- Chloroforme
- Méthanol
- Dichlorométhane
- L'acide phosphomolybde
- Tween 80.
- Vapeur d'iode.

ANNEXE 2: les milieux liquides utilisés

Milieu Czapek concentré (sels minéraux):

$NaNO_3$: 30g

KCl : 5g

$MgSO_4$: 5g

$FeSO_4, 7H_2O$: 0.1 g

$ZnSO_4, 7H_2O$: 0.1g

$CuSO_4, 5H_2O$: 0.05g

Eau distillée: 1000ml

pH 5, stérilisation par autoclave à $121^\circ C$ pendant 20min.

Bouillon nutritif:

Bouillon nutritif poudre: 2.3g

Eau distillée: 100ml.

Agiter sur un agitateur magnétique jusqu'à homogénéisation. Autoclavage à $121^\circ C$ pendant 20min.

Eléments traces

$CuSO_4, 5H_2O$: 0.5g.

$ZnSO_4, 7H_2O$: 0.1g.

Eau distillée stérile: 100ml.

ANNEXE 3: la révélation par l'acide phosphomolybdique.



Figure représentant la révélation par l'acide phosphomolybdique

ANNEXE 4: les milieux sélectifs des souches bactériennes.

Muller Hinton:

Dissoudre 21g de Muller Hinton et 17 g d'Agar dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète.

pH=7.4 ±0.2 puis autoclavé pendant 20min à 121°C.

Mac conkey

Mettre en suspension 50 g dans 1L d'eau distillée. Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.

Stérilisé à l'autoclave pendant 15min à 121°C.

SLANETEZ et BARTLEY

Dissoudre 42g dans 1L d'eau distillée. Chauffer sous agitation et laisser bouillir 1min pour dissoudre complètement la suspension. Ne pas autoclavé.

Gélose nutritive

Dissoudre 20g dans 1L d'eau distillée. . Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.

Stérilisé à l'autoclave pendant 15min à 121°C.

Cétrimide

Dissoudre 45.3g dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète. Stérilisé à l'autoclave pendant 15min à 121°C.

Résumé

Notre travail a été effectué sur 34 souches fongiques répertoriées au niveau du port d'Alger à partir d'eau de mer, de sédiment de fond et des organismes marins.

La méthode OSMAC nous a permis d'identifier et de caractériser ces huit taxons dont 5 *Aspergillus* (*A. terreus01*, *A. terreus02*, *A. terreus03*, *A. sp* et *A. glaucus*) et 3 *Penicillium* (*P. sp01*, *P. sp02* et *P. chrysogenum*). leur vitesse de croissance sur différents milieux de culture utilisés PDA, MEA, CYA, GN25, CZ, CYAs a montré que les espèces *Aspergillus terreus03* et *Penicillium sp* présentent une croissance rapide sur le milieu CYA et CYAs respectivement.

Huit souches ont été sélectionnées pour leur capacité à produire des métabolites (phosphatidylcholine et phosphatidyléthanolamine, sulfate du cérebson, cholestérol et acide gras) par une extraction liquide-liquide suivi par une méthode chromatographique CCM.

L'activité antibactérienne et antifongique a été évaluée sur six filtrats fongiques contre six bactéries et deux levures par la méthode de diffusion des disques.

Les 06 extraits ont révélés une activité antimicrobienne et antifongique variable vis-à-vis des souches testées: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Citorbacter sp*, *Candida sp*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Mots clés: micromycètes filamenteux marins, métabolite primaire, méthode OSMAC, Activité antibactérienne et antifongique.

Abstract

Our work was carried out on 34 strains for the identification of species of marine filamentous micromycetes potentially active from sea water, sediment, and marine organisms) listed at the level of the port of Algiers.

belonging to the two genera: *Aspergillus* and *Penicillium*. Based on their macro and microscopic characteristics. Eight strains were selected for their capacity to produce metabolites.

The OSMAC method allowed us to identify and characterize these eight species, among which five specific *Aspergillus* species (*Aspergillus terreus01*, *Aspergillus terreus02*, *Aspergillus terreus03*, *Aspergillus sp*, *Aspergillus glaucus*) and three species of *Penicillium sp01* and *Penicillium sp02* their different growth rate used in the culture media PDA, MEA, CYA, GN25, CZ and CYAs showed that *Aspergillus terreus03* and *Penicillium sp* species show rapid growth on CYA medium and CYAs respectively.

For further study, we tried to identify the primary metabolites present in eight strains including six strains of the mycothecae collection between 2018 and 2020 made at LBCM1 at ENSSMAL by liquid-liquid extraction followed by a CCM chromatographic method. The results were satisfactory with the presence of many organic molecules such as phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, cerebrosulphate, cholesterol and fatty acid which may be beneficial to human health.

The antibacterial and antifungal activities were evaluated of six filtrates from the fungal strains against six gram-positive bacteria and one gram-negative bacterium as well as the fungal activity against two yeasts.

This step was performed by the disc diffusion method. Based on the calculation of the diameter of the inhibition zone.

The 06 extracts showed variable antimicrobial and antifungal activity against the tested strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus sp*, *Klebsiella sp*, *Vibrio sp*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter sp* *Candida sp*, *Saccharomyces cerevisiae*

Key words: marine filamentous micromycetes - antibacterial and antifungal activity - primary metabolite - OSMAC method.

الملخص

أجريت هذه الدراسة على 34 سلالة لتحديد أنواع الفطريات البحرية الخيطية الدقيقة النشطة من مياه البحر والرواسب و بعض الكائنات من ميناء الجزائر العاصمة. تم اختيار ثماني سلالات لقدرتها على إنتاج المستخلصات العضوية . و *Aspergillus terreus*01 و *Aspergillus* ، بتحديد وتمييز ثمانية انواع ، من بينها خمسة: OSMAC سمحت لنا طريقة وثلاثة أنواع *Aspergillus glaucus* و *Aspergillus sp* و *Aspergillus terreus*03 و *Aspergillus terreus*02 و *Penicillium*: *Penicillium sp*01:*Penicillium sp*02 ; *P chrysogenum* .

وحساب معدل نموها في وسائط مختلفة PDA و MEA و CYA و GN25 و CZ و CYAs

أظهرت الدراسة أن أنواع *Aspergillus terreus*03 و *Penicillium sp* تبدي نموًا سريعًا على وسط CYA و CYAs على التوالي.

لمزيد من الدراسة ، حاولنا تحديد المستخلصات العضوية الموجودة في ثماني سلالات ، بما في ذلك ست سلالات من *mycothecium* عن طريقة استخراج سائل-سائل متبوعًا بطريقة كروماتوجرافية CCM. كانت النتائج مرضية مع وجود العديد من الجزيئات العضوية مثل *phosphatidylcholine* و *phosphatidyléthanolamin* و *sulfate du cérebón* و *cholestérol* و *acide gras* والتي قد تكون مفيدة لصحة الإنسان.

تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والفطريات لستة من السلالات الفطرية ضد 6 بكتيريا Gram + و واحدة Gram - وكذلك النشاط الفطري ضد خميرتين.

تم تنفيذ هذه الخطوة بطريقة نشر الأقراص و ذلك بحساب قطر منطقة التثبيط.

أظهرت المستخلصات 06 نشاطًا متنوعًا لمضادات الميكروبات والفطريات ضد السلالات المختبرة: *Escherichia coli* ،

Vibrio sp ، *Klebsiella sp* ، *Enterococcus sp* ، *Bacillus subtilis* ، *Pseudomonas aeruginosa*

Saccharomyces cerevisiae ، *Citorbacter sp* ، *Candida sp* ، *Klebsiella pneumonia*

الكلمات المفتاحية: الفطريات البحرية الخيطية - نشاط مضاد للجراثيم ومضاد للفطريات -المستخلصات العضوية - طريقة

. OSMAC