République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة عبد الحميد بن باديس مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Karouane farida – Yahiaoui hanane

Pour l'obtention du diplôme

Master 2

Hydrobiologie Marine ET Continentale

Spécialité: Bio Ressource Marine

THÈME

Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits métaboliques des champignons isolés en pisciculture

Soutenue publiquement le 12/09/2019

DEVANT LE JURY :

Président :	**Dr Ait Mohamed amer Lilia**	**MCB**	**U. Mostaganem**
Examinateur:	**Dr Bekada Djamel Eddine**	**MCB**	**U. Mostaganem**
Encadreur :	**Dr Benmessaoud Nadjet.**	**MAA**	**U. Mostaganem**
Co-Encadreur :	**Dr Nardjess Benamar**	**MCA**	**U. Mostaganem**

Thème réalisé au « Laboratoire de Microbiologie 01 » de la faculté SNV, Université de Mostaganem.

Remerciement

Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Qui nous soit permis d'exprimer notre dévouement et gratitude à Dieu qui nous a inspiré volonté et foi durant l'élaboration de ce travail de mémoire .

Tout d'abord, Nous remercions :

Particulièrement notre encadreur Madame ***Benmessaoud Nadjet,*** *maître assistant A au département des sciences de la mer et de l'aquaculture à l'Université de Mostaganem d'avoir accepté de nous encadrer. Merci pour sa rigueur scientifique, ses conseils ainsi que sa sympathie. Nous le remercions également de nous avoir responsabilisées tout au long de notre travail.*

Nos remerciements vont aussi au ***Dr Benamar Nardjess,*** *Maitre de conférence A à l'Université de Mostaganem, de nous avoir co encadrer ainsi que pour sa disponibilité, ses conseils et ses orientations.*

Nous tenons à exprimer nos sincères remerciements et notre profonde gratitude à ***Dr Ait Mohamed amer Lilia,*** *Maitre de conférence B à l'Université de Mostaganem, D'avoir accepter de présider ce jury.*

Un grand et respectueux remerciement à ***Dr Bekada Djamel Eddine*** *Maitre de conférence B à l'Université de Mostaganem, de nous avoir fait l'honneur d'examiner notre travail. Veillez accepter l'expression de notre profond respect.*

Nous tenons à remercier vivement Dr ***Belbachir Noreddine*** *chef de département des Sciences de la Mer et de l'Aquiculture à l'Université de Mostaganem.*

Nos remerciements les plus sincères et les plus chaleureux vont également à tous nos collègues des deux promotions « Master 2 RH
et BRM » de Université Abd lhamid Ibn Badis Mostaganem.

Dédicaces

Je profite de cette occasion pour adresser mes vifs et sincères remerciements à

Mon dieu grâce à lui je suis arrivée là.

Mon père : Yahiaoui cheref

***Ma mère** : merci pour votre prière et tendresse et le sacrifice qu'elle a consenti à mon égard pendant tout la durée de mes études.*

***Mon frère** : Mohamed*

***Mes sœurs** : Nabila, Djemaia, Nadia et chaimai*

*Et tout la famille **khelifa** Et yahiaoui*

À mes chers et inoubliables amis

***À mon binome** : Karouane Farida*

Ainsi qu'a tous les étudiants de ma promotion

Hanane

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

A ma mère et mon père pour leurs sacrifices.

A mon frère Djamel et mes sœurs Samira, Halima et Nassima.

A toute la famille KAROUANE.

A touts mes amis (es) sans exception

A touts les personnes qui de près ou de loin m'ont apportées leur aide.

Farida

Résumé

Les produits naturels ont toujours joué un rôle important en médecine et, en particulier, les métabolites marins sont devenus de plus en plus des acteurs majeurs de la découverte de médicaments. Une grande partie de la chimie des produits naturels concerne un groupe de composés appelés métabolites secondaires. L'objectif principal de notre travail est à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits bruts des champignons issus de poissons d'aquaculture la daurade royale (*Sparus aurata*) et le bar commum ou loup de mer (*Dicentrarchus labrax)* contre les bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa (*ATCC 27853) et *Escherichia coli (ATCC25922)* résistantes aux antibiotiques actuellement utilisés dans la pratique clinique. Cette activité a été aussi testée vis-à-vis de trois champignons : *Penicillium sp*1, *Aspergillus flavus* et *Alternaria sp.*

Les résultats obtenus montrent que le genre *Penicillium* apparait le producteur le plus important de molécules bioactives avec trois espèces sur quatre espèces testées, soit 75%, suivi par le genre *Aspergillus* (1 seule espèce productrice de molécules bioactives sur quatre, soit 25%).

Les extraits produits par l'espèce de *Penicillium* (*Pen* lr *sp8*) se sont révélés les plus actifs contre deux bactéries : (Gram +) et (Gram -), mais aussi sur les trois souches fongiques testées, donc elle a un effet antibactérien et antifongique en même temps.

Ces métabolites secondaires ayant des activités efficaces peuvent être encore purifiés et étudiés pour des études pharmacologiques.

Mots clés : Champignons, extraits bruts, métabolites secondaires, activité antimicrobienne, bactéries, poissons.

Abstract

Natural products have always played an important role in medicine and, in particular, marine metabolites have become increasingly important players in drug discovery. Much of the chemistry of natural products concerns a group of compounds called secondary metabolites. The main objective of our work is to highlight the antimicrobial activity of crude extracts of fungi from aquaculture fish the gilthead sea bream (Sparus aurata) and the sea bass or sea bass (Dicentrarchus labrax) against pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Escherichia coli* (ATCC25922) resistant to antibiotics currently used in clinical practice. This activity was also tested against three fungi: *Penicillium sp1, Aspergillus flavus* and *Alternaria sp.*

The results obtained show that the genus *Penicillium* appears as the most important producer of bioactive molecules with three species out of four species tested (75%), followed by the genus *Aspergillus* (only one species producing bioactive molecules out of four species tested, (25%).

The extracts produced by the *Penicillium* species (*Pen* lr *sp8*) proved to be the most active against two bacteria: (Gram +) and (Gram -), but also on the three fungal strains tested, so it has an antibacterial effect and antifungal at the same time.

These secondary metabolites with effective activities can be further purified and studied for pharmacological studies.

Key words: Moulds, crude extracts, secondary metabolites, antimicrobial activity, bacteria, fish.

.

الملخص

المنتجات الطبيعية لعبت دائمًا دورًا مهمًا في الطب ، وعلى وجه الخصوص ، أصبحت المستقلبات البحرية ذات أهمية متزايدة في اكتشاف الأدوية جزء كبير من كيمياء المنتجات الطبيعية تتعلق بمجموعة من المركبات تسمى المستقلبات الثانوية. الهدف الرئيسي من عملنا هو تسليط الضوء على النشاط المضاد للميكروبات للمستخلصات الخام الفطريات المعزولة من أسماك التربية المائية ضد البكتيريا المسببة للأمراض: المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25722, ,*Pseudomonas areogenosa* ATCC 27853

المقاومة للمضادات الحيوية المستخدمة حاليًا في الممارسة السريرية. تم اختبار هذا النشاط أيضًا ضد ثلاث فطريات *Alternaria sp* و *Aspergillus flavus* و *Penicillium sp1*

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن جنس البنسلوم يظهر كأهم منتج للجزيئات النشطة بيولوجيًا مع ثلاثة أنواع من أربعة أنواع تم اختبارها ، أي (75٪) ، يليها جنس الرشاشيات (نوع واحد فقط منتج الجزيئات النشطة حيوياً من أصل أربعة ، أي (25٪) أثبتت المستخلصات التي تنتجها نوع البينيسيليوم *Pen* lr *sp 8* انها الاكثر نشاطا ضد اثنين من البكتيريا *(Gram -)(Gram +)* ، ولكن أيضًا على السلالات الفطرية الثلاث التي تم اختبارها ، لذلك لها تأثير مضاد للجراثيم و مضاد للفطريات في نفس الوقت

.يمكن تنقية هذه المستقلبات الثانوية ذات الأنشطة الفعالة ودراستها من أجل الدراسات الدوائية

الكلمات المفتاحية: الفطريات ، المستخلصات الخام ، المستقلبات الثانوية ، النشاط المضاد للميكروبات ، البكتيريا ، الاسماك

% : Pourcentage.

Ac Et : Acétate d'Ethyle.

µg : Microgramme.

l: Litre.

mg : Milligramme.

ml: Millilitre.

mm : Millimètre.

DMSO : Dimethylsulfoxide.

EB : Extrait brut.

PDA : potato-dextrose-agar.

PH : Potentiel d'hydrogène.

LRSE : Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale.

V : volume.

⌀ : diamètre.

T° : Température.

C° : Degrés Celsius.

MH : Mueller-Hinton.

V/V : Volume par volume.

UFC : Unité formant colonie

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'arbre Phylogénétique du vivant basé sur les marqueurs moléculaires, indiquant la position des champignons. **4**

Figure 2 : Les grands groupes des eumycètes **5**

Figure 3 : Quelques champignons filamenteux. **10**

Figure 4: Structure de l'hyphe **10**

Figure 5 : Schématisation de la structure de la paroi fongique **11**

Figure 6 : Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées. **12**

Figure 7 : Cycle de vie des moisissures. **13**

Figure 8: Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure. **13**

Figure 9: Différents antibiotiques produits par les différents microorganismes. **24**

Figure 10 : Nombre de métabolites de champignons marins décrits chaque année. **25**

Figure 11 : Extraction des métabolites secondaires. **29**

Figure 12 : Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur **30**

Figure 13: Extraits bruts. **30**

Figure 14 : Préparation des extraits en vue des testes biologique. **31**

Figure 15 : *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique. **32**

Figure16: Escherichia *coli,* vue au microscope électronique à balayage. **33**

Figure17 *: Pseudomonas aeruginosa*, vue au microscope électronique. **34**

Figure 18 : Préparation des suspensions bactériennes. **35**

Figure 19 : Observations *de Penicillium sp*. **39**

Figure 20 : Observations *d'Alternaria sp*. **41**

Figure 21 : Observations *d'Aspergillus sp*. **42**

Figure 22 : Activité antibactérienne. **46**

Figure 23: Activité antifongique **49**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées. 21

Tableau 2 : Les principales mycotoxines et leurs effets avérés ou suspectés 23

Tableau 3: mycètes producteurs d'antibiotiques. 23

Tableau 4: Le poids des extraits obtenus pour chaque souche. 43

Tableau 5: Activité antibactérienne. 44

Tableau 5: Activité antibactérienne. 48

Remerciement.
Abréviations.
Listes des figures
Liste des tableaux
Résumé
Abstract
الملخص
Table des matières
Introduction générale **01**

Chapitre I : **Revue bibliographique**

I-Mycologie **02**
I.1- Présentation des champignons **03**
I.1-1- Définition **03**
I.2 - Phylogénie des champignons **04**
I.3 -Classification **05**
I.3.1 - Chytridimycètes **05**
I.3. 2- Zygomycètes **06**
I.3.3**-**Ascomycètes **06**
I.3.4- Basidiomycètes **06**
I.3.5**-** Deutéromycètes **06**
I.4 - Croissance **07**
I.5 - Reproduction **07**
I. 6 **-** Ecologie des champignons **08**
I.7- Rôle écologique des champignons **08**
I.7.1- Recyclage des nutriments **08**
I.7.2- Interactions biologiques **09**
I.7.3- Structure du sol **09**
I. 8- Champignons filamenteux **09**
I.8.1- Définition **09**
I.8.2- Caractéristiques morphologiques des champignons filamenteux **10**
I.8. 3- Mode de reproduction **11**
I.8. 4- Cycle de vie **12**
I. 9 - Facteurs de biosynthèses **13**
1- Facteurs physico-chimiques (facteurs extrinsèques) **13**
1.1- Temperature **13**
1.2- Humidité **14**
1.3- pH **14**
1.4- Activité de l'eau (Aw) **14**
1.5- Oxygène **15**
2- Facteurs (facteurs extrinsèques) **15**
2.1- Eléments nutritifs **15**
2.2- Source de carbone et d'énergie **15**
2.3- Source d'azote **15**
2.4- Eléments minéraux **16**
3- Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques) **16**
II-Mycologie Marine **16**
II.1-Introduction **16**
II.2-Champignons marins microscopiques **16**
II.2.1-Définition **16**

II.2.2-Répartition géographique et biotope **17**
II.2.3-Relations biologiques **18**
III- Métabolites secondaires des mycètes **19**
III.1- Mycotoxines **20**
III.1.1- Définition **20**
III.1.2- Principales mycotoxines **21**
Aflatoxines **21**
III.1.3- Nature des mycotoxines **22**
III.1.4-Effets des mycotoxines **22**
III.2- Les antibiotiques **23**
III.3- Métabolites secondaires bioactifs des champignons marins **24**

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

1-Préparation des souches fongiques **26**
1-1-Choix des souches **26**
1.2. Repiquage et revivification des souches **26**
1.3. Identification des micromycètes **26**
1.3.1. Identification morphologique **26**
1.3.1.1. Critères d'identification macroscopique **27**
1.3.1.2. Identification microscopique **27**
2. Production des métabolites secondaires **28**
2.1. Préparation du milieu de fermentation **28**
2.1.1. Ensemencement du milieu de fermentation **28**
2.2. Procédure d'extraction **29**
2.2.1. Fonctionnement Rotavapeur **30**
3. Activité antimicrobienne **32**
-*Staphylococcus aureus* **32**
-*Escherichia coli* **33**
-*Pseudomonas aeruginosa* **33**
3.1. Activité antibactérienne **34**
3.1.1. Milieux de culture **35**
Muller Hinton Agar **35**
Muller Hinton Broth **35**
3.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien **35**
3.1.3. Préparation des différentes concentrations **36**
3.1.4. Ensemencement et dépôt des disques **36**
3.2. Activité antifongique **36**
3.2.1. Souches choisies **36**
4.3. Inoculum fongique **37**
4.4. Mise en évidence de l'activité antifongique **37**
5. Lecture des résultats **37**

CHAPITRE III : Résultats et Discussion

1-Description et illustration des différents genres fongiques **38**
1.1. Penicillium sp **38**
1.2. *Alternaria sp* **39**
1.3. *Aspergillus sp* **40**

2. Etude de l'activité antimicrobienne **41**

2. 1.Le poids des extraits obtenus pour chaque souche **42**
2. 2.Evaluation de l'activité antibactérienne **42**
2.1.1. *Escherichia coli* (ATCC 25922) **44**
2.1.2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) **44**
2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853)* **45**
3. Evaluation de l'activité antifongique **46**
Discussion **48**
Conclusion et perspectives **51**
Référence bibliographique

Depuis l'antiquité, les produits naturels, notamment ceux d'origine végétale ont toujours été une source importante d'agents thérapeutiques. Actuellement, tous les médicaments disponibles pour le traitement des maladies sont dérivés des produits naturels (des plantes, des animaux, des bactéries et des champignons) ou sont des dérivés de produits naturels.

Les microorganismes sont également des agents de dégradation, et leurs propriétés métaboliques et cinétiques peuvent être exploitées pour permettre l'hydrolyse, l'oxydation, la nitrification, la dénitrification, l'élimination des sulfates et des phosphates ainsi que la méthanisation des effluents polluants. Les microorganismes sont une source prodigieuse de molécules antibiotiques d'une grande diversité qui peuvent être une source de microbes avec des activités biologiques intéressantes.

Ces micro-organismes microscopiques produisent une grande variété de métabolites secondaires, certains d'entre eux sont très utiles à l'homme et présentent un intérêt considérable dans les différents domaines (agricultures, biotechnologie, environnement, santé ; ect.).

Les moisissures sont des acteurs importants du monde microbien. Ils sont impliqués dans une multitude de processus biologiques de l'environnement. Ils présentent un intérêt économique, en raison à la fois de leurs utilités et de leurs activités néfastes multiples : altérations des produits alimentaires et détériorations dans nombreux autres domaines, production de mycotoxines, vie parasitaire aux dépends de l'homme, des animaux et des plants **(Abdelaziz, 2006).**

Les métabolites secondaires fongiques regorgent d'une importante réserve à caractère médicinal, occupant une place importante dans la pharmacopée algérienne. Véritable renouveau de la pharmacopée mondiale, la mycothérapie (soins par les champignons) apparaît comme une révolution non verte: ni végétaux, ni animaux, partout et totalement indispensable au processus de vie et de mort, les champignons comestibles, vrais alicaments possèdent également des propriétés médicinales étonnantes dans le traitement de certains cancers, de pathologies dégénératives mais aussi de pathologies moins lourdes (**Garcia, 2009).**

Les découvertes récentes dans les champignons du milieu marin de nombreuses nouvelles molécules bio-actives possédant parfois des squelettes carbonés originaux, semblent confirmer cette hypothèse **(Bhaclury et *al.,* 2006).**

Depuis les années 1990 un nombre croissant de métabolites issus de souches fongiques isolées de substrats marins divers (sédiments, éponges, algues, eau de mer, Mollusques……etc.) a été découvert. **(Bugni et Ireland, 2004).**

En Algérie l'étude des micromycètes provenant du milieu marin a été initiée au laboratoire **LRSE** (Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale) en 2006 en collaboration avec le laboratoire MMS (Université de Nantes, France).

Dans la présente étude, l'objectif principal est l'extraction des métabolites secondaires de quelques souches fongiques isolées à partir de deux espèces de poisson issues de la pisciculture à savoir : La daurade royale "*Sparus aurata*" et loup de mer "*Dicentrarchus labrax*", et de tester leurs pouvoirs antibactériens et antifongiques.

Notre travail de mémoire est réparti principalement en trois chapitres :

Le premier chapitre: représente une synthèse bibliographique, divisée en deux parties : la première aborde les connaissances sur le règne fongique et la deuxième concerne les métabolites secondaires.

Le deuxième chapitre : matériels et méthodes, qui présente d'une part les technique d'extraction de substances brutes libérées par des micromycètes évoluant dans l'environnement marin pour ensuite s'intéresser aux méthodes ayant permis de réaliser la mise en évidence du pouvoir antifongique et antibactérien des substances brutes produites par la microfonge sélectionnée.

Le troisième chapitre: est dédié à une synthèse des principaux résultats obtenus, qui seront discutés, suivi par une conclusion et les perspectives de ce travail**.**

I- Mycologie

La mycologie est une science relativement récente. Cependant, les champignons sont apparus depuis le début de la vie sur terre il y a environ 4,5 milliards d'années, et la plupart datent du Crétacé et du tertiaire, dont on peut voir les vestiges dans certains fossiles et surtout dans l'ambre. Les premiers fossiles ressemblant aux champignons actuels remontent au Silurien, soit environ 410 millions d'années. Certains ascomycètes ont été reconnus du Carbonifère. On dénombre actuellement plus de 400 genres issus des fossiles trouvés sur notre planète (**Kerfez et Brik, 2015**).

I.1- Présentation des champignons

I.1-1- Définition

Les mycètes sont des organismes eucaryotes uni –ou pluricellulaires d'aspect filamenteux **(Tabuc, 2007),** immobiles, les uns microscopique (micromycètes), d'autres sont visibles (macromycètes) lorsque leur développement soit assez important. Ils sont dépourvus de pigments assimilateurs de type chlorophylle et sont donc incapables de photosynthèse.

Il s'agit d'organismes hétérotrophes ubiquistes dont la nutrition carbonée est dépendante de la présence de matière organique préformée. C'est le thalle ou le filament mycélien qui assure la nutrition, celle-ci se fait par absorptions tout en libérant dans un premier temps des enzymes hydrolytiques dans le milieu extérieur **(Zahem et Mihoubi, 2017**).

Les champignons appartiennent à l'embranchement des thallophytes, leur appareil végétatif ou thalle ne comporte pas de système conducteur différencié l'appareil végétatif des champignons (thalle) est généralement constitué par un mycélium formé de filaments tubulaires cylindriques ramifiés, à croissance linéaire apicale, dont le diamètre varie selon les espèces de 1 à 2 µm jusqu' à plus de 50µm **(Semal et *al.,* 1993**).

Selon **Després (2012)**, les champignons font partie du règne des Eumycètes, qui se traduit par «vrais champignons», et ce sont des organismes essentiels au maintien des écosystèmes terrestres**.** En effet, les champignons transforment les éléments chimiques vitaux qui composent la matière organique en composants assimilables par d'autres organismes.

Presque tous les végétaux ont besoin de vivre en mutualisme avec les champignons, qui aident leurs racines à absorber l'eau et les minéraux **(Campbell, 1995).**

I.2 - Phylogénie des champignons

L'essor des techniques moléculaires depuis les années 90, notamment le développement de la technique de PCR (Polymerase Chain Reaction), a permis l'étude des champignons à l'échelle de la spore mais aussi sur de très petites quantités d'ADN, ce qui a permis d'identifier les espèces

réticentes à la culture **(Taylor, 2000).** Un gène ou marqueur moléculaire fongique est sélectivement amplifié à l'aide d'amorces spécifiques des champignons, puis le gène est séquencé. Le concept phylogénétique de l'espèce consiste à comparer les séquences d'ADN entre plusieurs individus afin de comparer les substitutions nucléotidiques. Ce concept va de plus fournir des informations sur l'évolution des espèces (information diachronique), le nombre de substitutions d'une séquence d'ADN étant proportionnelle au temps de divergence depuis l'ancêtre commun selon l'hypothèse de l'horloge moléculaire.

L'analyse de l'Arbre de la vie réalisé par **Baldauf (2004)** sur les bases de données moléculaires et structurales, montre que les champignons appartiennent au groupe des Opisthokontes, au sein de l'Empire Eucaryote (Fig.01). Historiquement, les champignons étaient classés dans le groupe des plantes et étaient considérés comme proches des végétaux ; leur première classification en tant que Règne date de 1969 **(Whittaker, 1969).** Une étude basée sur l'analyse du gène codant l'ARNr18S a permis de suggérer un ancêtre commun aux animaux et champignons **(Wainright et *al*., 1993)**, mais ce sont des études phylogénétiques sur l'analyse du facteur d'élongation EF1-alpha qui ont prouvé que, champignons et animaux étaient des groupes des Opisthokontes **(Baldauf et Palmer, 1993; Baldauf, 1999).**

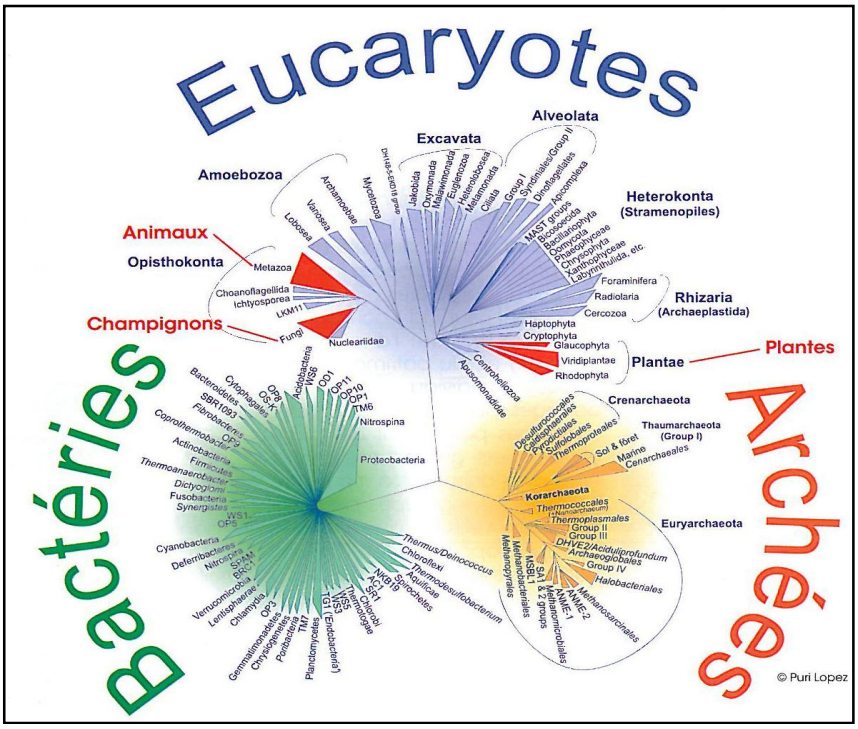


Figure 01 : Schéma de l'arbre Phylogénétique du vivant basé sur les marqueurs moléculaires, indiquant la position des champignons **(López-García et Moreira, 2008)**.

Le groupe des Opisthokontes intègre aussi les Choanoflagéllés qui constitueraient une branche ancienne d'un point de vue évolutif. La caractéristique principale des Opisthokontes est la présence des cellules sexuées mobiles à un flagelle polaire. Une autre caractéristique des Opisthokontes est l'utilisation du codon UGA pour la transcription du tryptophane. De plus, tous ces organismes possèdent du glycogène et de la chitine **(Baldauf, 1999).**

I.3 - Classification

La classification générale des champignons se fonde sur les caractéristiques du thalle (plasmode nu ou filament, cloisonné ou non; présence éventuelle de cellules nues flagellées), ainsi que sur les modalités de leur reproduction sexuée **(Semal et *al.,* 1993).** Cette classification fongique, décrit quarte phylums (embranchements) principaux: les oomycètes, les zygomycètes, les ascomycètes et les basidiomycètes, caractérisés par la nature de leurs spores. Un cinquième phylum, considéré comme artificiel, les Deuteromycétes **(Encarta, 2005).**

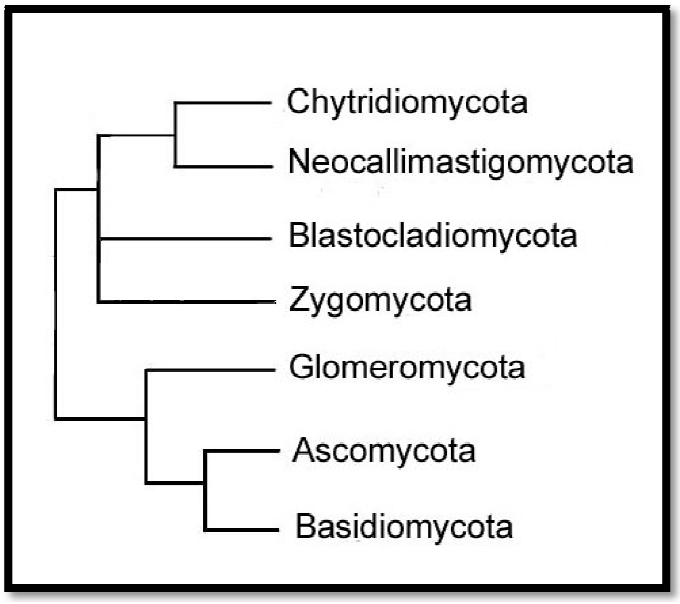


Figure 02: Les grands groupes des eumycètes (d'après **Durrieu, 2008**).

I.3.1 - Chytridiomycètes

Ce sont les champignons les plus anciens **(James et *al.,* 2000 , 2006)**. Ce sont les seuls champignons à posséder, des spores uniflagellées (zoospore) **(Jennings et Lysek, 1996)**. La présence de spores flagellées semble restreindre ces organismes aux milieux aquatiques et dans les sols humides **(James et *al.,* 2000)**. Les organismes de ce phylum sont souvent microscopiques mais peuvent aussi produire un mycélium. La plupart des Chytrides sont saprotrophes, aérobies ou anaérobies ; ils sont capables de dégrader un grand nombre de substrats **(Powell, 1993 ; Shearer et *al.*, 2007).**

I.3.2- Zygomycètes

Les zygomycètes constituent un groupe ancien des champignons ayant divergé après les Chytridiomycètes **(James et *al.,* 2006 ; Bar-Hen et *al.,* 2008).** Ils se reproduisent de manière asexuée, par des spores se formant à l'intérieur d'un sac appelé sporocyste, ou de manière sexuée, par union de filaments sexuels dont les extrémités dilatent, fusionnent pour former une zygospore plurinuclée. Cet ensemble comprend deux ordres principaux: saprophytes, se développent sous forme de moisissures au mycélium non cloisonné comme (*Rhizopus migricans*, ou moisissure noire du pain); d'autre part, les entomophtorales, dont les sporocystes, servant généralement eux mêmes de spores, se détachent et sont disséminés tels des conidies, ces champignons sont principalement des parasites d'insectes, tueurs de mouches **(Encarta, 2005).**

I.3.3- Ascomycètes

Les Ascomycètes comptent 45000 espèces décrites à ce jour **(Hawksworth, 1991 ; Hawksworth, 2001 ; Taylor et *al.,* 2004).** Appelées aussi mycètes à sac, comprennent des moisissures à hyphes septés et certaines levures. Ce groupe présente une structure caractéristique appelée asque formée au cours de la reproduction sexuée qui renferme un nombre défini d'ascospore. Elles se reproduisent aussi par multiplication asexuée, elles ont une grande importance économique car certaines espèces sont capables de dégrader des substrats cellulosiques **(Tabuc, 2007).**

C'est le groupe de champignon le plus important, et la majorité des espèces est microscopique **(Bouchet et *al.,* 1999).**

I.3.4- Basidiomycètes

Les Basidiomycètes, 22000 espèces décrites **(Taylor et *al*., 2004)**. Sont les champignons les plus perfectionnés **(Bouchet et *al.,* 1999)**. Elles sont caractérisées par des basidiospores issues de la reproduction sexuée, et qui sont au nombre de (04) contenue dans une baside **(Bachar, 2004).** Ces champignons ont un mycélium cloisonné, et leur reproduction est sexuée, se faisant par l'intermédiaire d'un organe appelé baside.

Ce groupe compte les agents responsables des rouilles, des charbons, des caries qui se développent sur un nombre très vaste de végétaux **(Fournier et *al.*, 1983).**

Les basidiomycètes produisent rarement des spores asexuées, et leurs spores sexuées maillent à partir de baside en forme de masse **(Nicklin et *al.,* 2000).**

I.3.5- Deutéromycètes

Ce groupe comprend tous les champignons qui ne produisent ni ascospores, ni basidiospores, et qui se multiplient au moyen de conidies **(Botton et *al*., 1990).**

Les Deutéromycètes sont caractérisés par un mycélium cloisonné et une reproduction végétative réalisée par des spores asexuées, ou par simple fragmentation du mycélium **(Boiron, 1996)**. Ces moisissures constituent la majeure partie des Hyphales ; Elles sont classées en fonction des caractéristiques des organes conidiens et du mode de groupement des hyphes. Le groupe des Deutéromycètes contient un grand nombre de contaminants de végétaux et de produits alimentaires : *Trichoderma, Cephalosporium, Fusarium, Geotrichum,* cette classe regroupe aussi les *Penicillium* et les *Aspergillus* **(Frazier, 1967 ; Punt et *al.,* 2002)**.

I.4 - Croissance

La croissance des champignons mycéliens est assurée par des hyphes qui sont constitués de cellules hétérocaryotiques (Ascomycota et Basidiomycota) ou coenocytiques (Zygomycota et Glomeromycota). Leur extension est restreinte à l'apex. Après division, l'article apical nouvellement formé peut se séparer du reste du mycélium par une cloison (mycélium septé) ou non (mycélium siphonné) **(Jennings et Lysek, 1996)**. Les hyphes vont se brancher en réseau, déterminant en partie la morphologie macroscopique du thalle **(Carlile et Watkinson, 1994)**. La croissance et la nutrition vont se faire de façon concomitante ; la croissance sera réalisée par une extension de la paroi à l'apex, par un apport continu de chitine. Dans le même temps, au niveau de l'apex également, des enzymes hydrolytiques seront déversées dans le milieu extérieur **(Carlile et Watkinson, 1994)**.

I.5 - Reproduction

La plupart des champignons possèdent deux modalités de reproduction : la reproduction asexuée (imparfaite ou végétative), et la reproduction sexuée (parfaite).

La reproduction végétative des champignons résultant d'une fragmentation du thalle ou d'une sporulation représente le plus souvent la principale source de dissémination du parasite lors de la fragmentation du thalle. Les ramifications se séparent les unes des autres à la suite de la dégénérescence de la partie basale d'hyphe dont elles dérivent. Il est rare que l'ensemble du cytoplasme du thalle se transforme en spores lors de la multiplication végétative (thalle holocarpique de certaines chytridiales). Généralement, le contenu d'un territoire du thalle est isolé du reste de celui-ci par une cloison qui engendrera des spores en constituants un sporocyste (thalle eucarpique) (**Ghezzoul, 2010**).

La reproduction sexuée des champignons comporte une plasmogamie (fusion des Cytoplasmes de deux gamètes) suivie d'une caryogamie (fusion des noyaux correspondants) et d'une méiose (division réductionnelle). Les types de spores sexuées sont au nombre de quatre : l'oospore, la zygospore, l'ascospore et la basidiospore (**Stanier et *al.*, 1966**).

Chez des nombreuses espèces les hyphes laissent apparaître des cloisons transversales qui rassemblent ainsi, les segments en une chaîne de cellules séparées les unes des autres, cet aspect n'est en fait que une apparence, car toutes les cellules communiquent par un pore central qui laisse le cytoplasme multinuclé circuler librement. Le mycélium bien que contenant un cytoplasme mobile, et lui même incapable de se déplacer à cause de la rigidité de ses parois.

On parle aussi communément des moisissures pour désigner les champignons chez lesquels les organes de fructification on une structure nettement filamenteuse. Elles s'opposent aux champignons comestibles dont les corps fructifiant sont charnus (**Leclerc et *al.*, 1983**).

I. 6 - Ecologie des champignons

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

- Les champignons microscopiques (ou mycètes) sont des organismes hétérotrophes : non photosynthétiques. Ils se répartissent en deux grands groupes : les levures et les moisissures **(Bousseboua, 2003)**.
- **Les leveurs :** sont des eucaryotes hétérotrophes faisant partie du groupe de champignons unicellulaires **(Meyer et *al.,* 2004)**, elles sont impliquées dans des phénomènes de compétition des nutriments, d'antagonisme ou de symbiose dans les sols, les eaux, les animaux et les végétaux. L'étude de ces microorganismes pour mettre en lumière leur rôle dans la formation des taches noires de la grotte de Lascaux sont des «Levures noires» qui sont désigné comme un groupe de champignons assez hétérogène, elles peuvent coloniser des environnements extrêmes caractérisés par des conditions oligotrophes, des températures élevées, des radiations UV, des stress osmotiques et des combinaisons de ces différentes conditions environnementales de la grotte **(Vanderwolf et *al* ., 2013)**.

I.7- Rôle écologique des champignons

I.7.1- Recyclage des nutriments

Les champignons jouent un rôle crucial dans les cycles des nutriments qui sont présents dans le sol. Ils sont classés parmi les décomposeurs primaires, car ils ont la capacité d'attaquer de nombreux matériaux organiques, et de dégrader des substrats variés tels que la cellulose et la lignine des plantes. Suite à cette dégradation, ils libèrent des éléments essentiels à la nutrition des plantes. La libération des acides organiques contribue à la mobilisation des molécules qui rendent le fer plus disponible pour les organismes vivants **(Jeffery et *al*., 2013)**.

I.7.2- Interactions biologiques

Ce sont les associations mutualistes entre les champignons et les racines de plantes appelées également les mycorhizes. Dans cette association, le champignon absorbe des nutriments tels que les sucres et les vitamines nécessaires à sa croissance **(Jeffery et *al*., 2013)**.

I.7.3- Structure du sol

Les champignons sont capables de modifier la structure du sol, car l'envahissement des hyphes à travers les pores du sol va créer une véritable toile, aussi, les diverses molécules produites par les hyphes, modifient le comportement de l'eau, soit en augmentant sa capacité de rétention, soit en la excluant de certaines zones du sol dans le cas des hyphes hydrophobes, se qui permet le maintien d'air dans le sol **(Jeffery et *al*., 2013)**.

I. 8- Champignons filamenteux

I.8.1- Définition

Les moisissures peuvent être définies comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles, dont la structure cellulaire est celle d'une cellule eucaryote classique **(Nicklin et *al.,* 2000)**. Certaines vivent en symbiose avec des végétaux, d'autres sont des parasites des végétaux ou des animaux, d'autres enfin sont des saprophytes se développant aux dépens de substrats inertes ou en voie de décomposition **(Bourgeois, 1989 ; Leveau et Bouix, 1993)**. Les moisissures possèdent un appareil végétatif constitué par un thalle filamenteux, le mycélium, dont les filaments s'appellent des hyphes. Le mycélium peut différencier des organes forts variés selon les groupes, spécialisés dans la multiplication et la dissémination, auxquels on accorde la dénomination globale de spores **(Bourgeois, 1989)**.

Les moisissures sont aérobies, en général, acidophiles (pH compris entre 3 et 7) **(Nicklin et *al.*, 2000)**, et mésophiles (température optimale 20-30°C) **(Botton et *al.,* 1990)**.

Les moisissures ne peuvent se développer que sur des substrats organiques. La structure filamenteuse du thalle les rend particulièrement aptes à coloniser des substrats solides. En raison de leurs aptitudes écologiques et physiologiques, les moisissures sont de loin, les microorganismes les plus redoutables pour les grains stockés **(Multon, 1982)**.

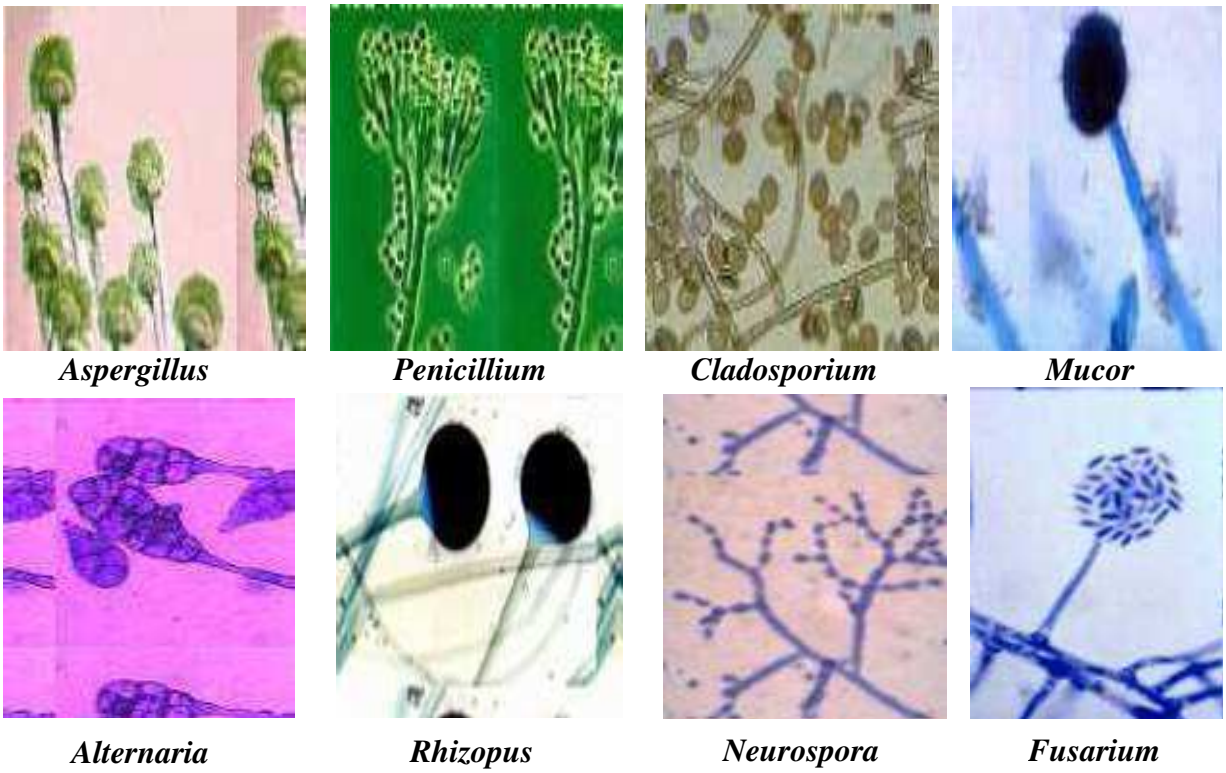


Figure 03 : Quelques champignons filamenteux **(Dendouga, 2006)**.

I.8.2- 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 constitue un réseau appelé mycélium. Les hyphes sont diffus, tubulaires et fins avec un diamètre compris entre 2 et 15 µm et sont plus ou moins ramifiés. Chez certaines moisissures, comme par exemple *Mucor*, les cellules ne sont pas séparées par une cloison transversale, le thalle est alors dit coenocytique ou « siphonné » alors que chez d'autres, comme par exemple *Aspergillus*, le thalle est cloisonné ou « septé » les cloisons (Fig.04) appelées septa possèdent des perforations assurant la communication entre les cellules.

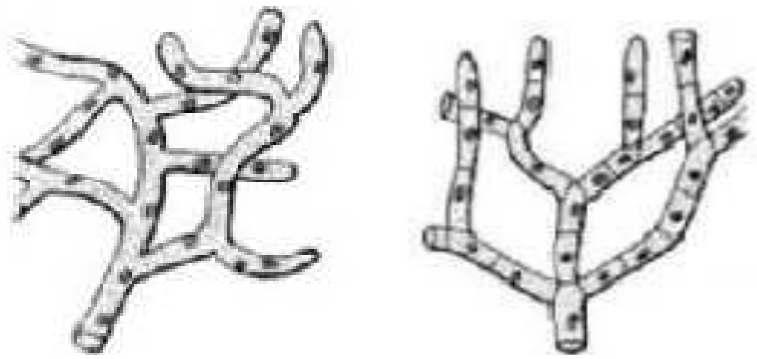


Figure 04 : Structure de l'hyphe. (A) hyphe coenocytique, (B) hyphe cloisonné **(in Lecellier, 2013).**

Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes sont liées à leur substrat nutritif. La colonisation du substrat est réalisée par extension et ramification des hyphes **(Lecellier, 2013).**

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de Polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Fig.05).

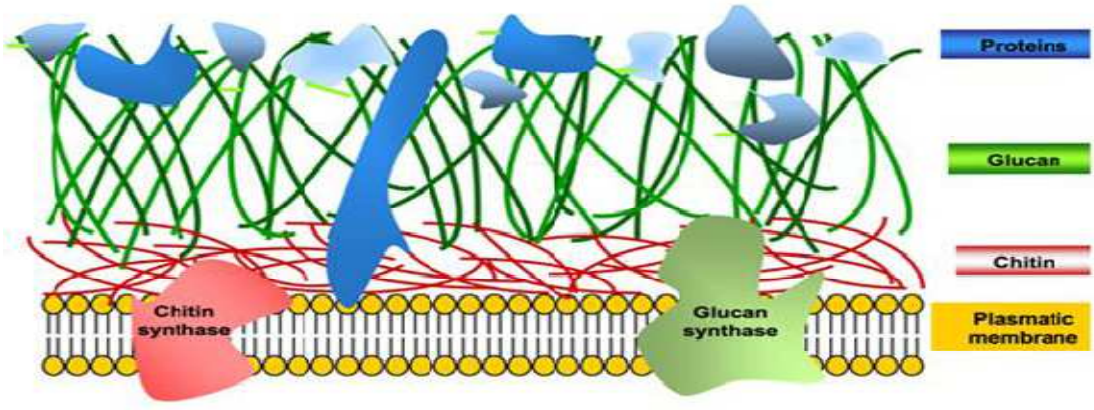
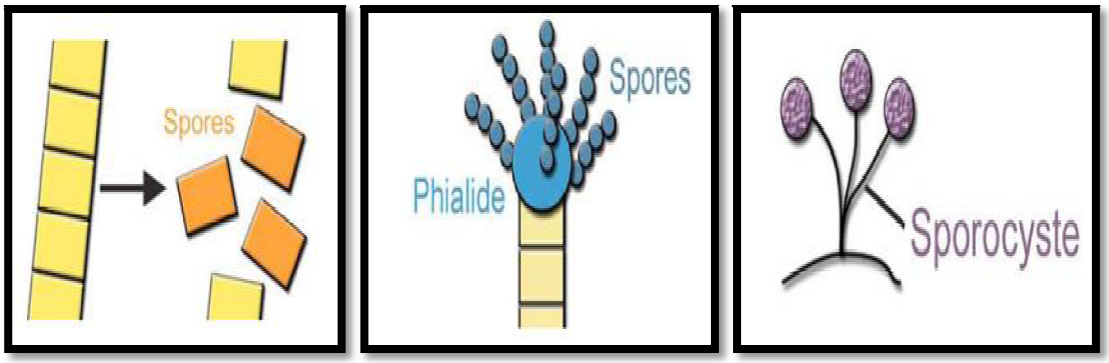


Figure 05 : Schématisation de la structure de la paroi fongique **(in Lecellier, 2013)**.

I.8.3- Mode de reproduction

Les moisissures produisent des organes de reproduction, que l'on appelle de façon générale « spores » et qui peuvent avoir une origine sexuelle ou végétative. Les spores d'origine sexuelle résultent d'une fécondation (zygospores et oospores) ou d'une méiose (ascospores ou basidiospores) alors que les spores d'origine végétative résultent d'une simple mitose que l'on appelle fréquemment conidies. Elles assurent la reproduction et la dissémination chez les espèces de formes imparfaites, mais on les trouve également chez les autres groupes où elles coexistent à côté des formes de reproduction sexuée, et leur type varie selon les moisissures :

- Les thallospores sont formées aux dépens du thalle par transformation d'éléments préexistants.
- Les sporangiospores sont des cellules flagellées ou non, ne provenant pas d'une fraction préexistante du thalle.
- Les conidiospores sont des cellules qui ne sont pas issues directement d'une portion préexistante du thalle. Ces spores toujours terminales naissent d'un filament appelé conidiophore (metulae, phialide, etc.) **(Guiraud, 1998)**.



Fragmentation
Arthrospores

Production endogène
Sporocystiospores

Production exogène
Conidiospores

Figure 06 : Les différents modes de sporulation et les différents types de spores associées **(in Lecellier, 2013).**

I.8.4- Cycle de vie

Le cycle de vie des moisissures est illustré par 4 principales étapes (Fig.07), germination, développement, reproduction et dormance/latence.

Le cycle de vie des moisissures en milieu intérieur débute lorsqu'une spore se dépose sur une surface lui offrant les conditions nécessaires à sa croissance. En fait, la germination se déclenchera 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 moisissure 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, en microscopie, 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 ***(*Acgih, 1999**).

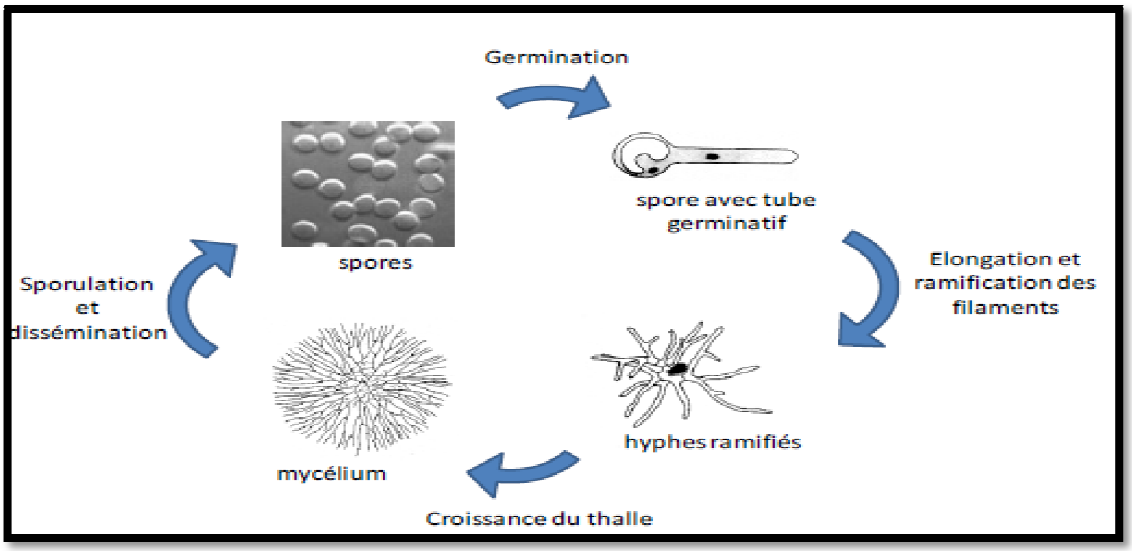


Figure 07 : Cycle de vie des moisissures (www.aspergillus.man.ac.uk).

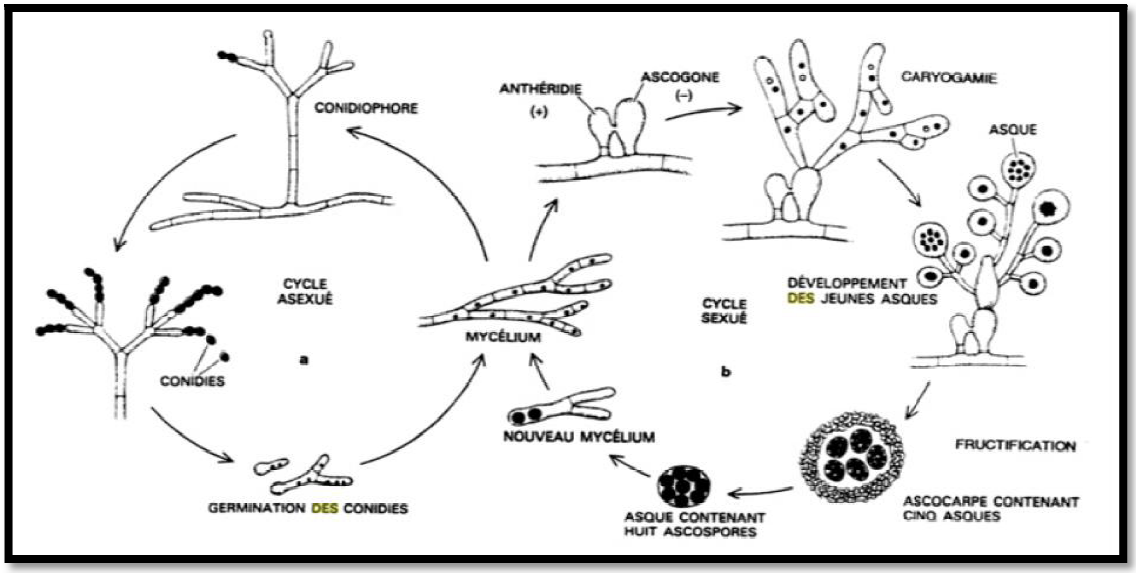


Figure 08 : Schématisation de la reproduction asexuée et sexuée d'une moisissure **(in Lecellier, 2013)**.

I.9- Facteurs de biosynthèses

I.9.1-Facteurs physiques (facteurs extrinsèques)

Les principaux facteurs physiques constituent l'ensemble des conditions environnementales telles que : la température, la disponibilité en eau, l'infestation par les insectes et l'attaque des rongeurs **(Mirete et *al.*, 2004)**.

- **Température**

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures et en outre sur la compétition entre les espèces. La plupart des champignons sont

mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 ºC à 35ºC. Pour d'autres, ils sont psychrophiles ou psychrotolérantes **(Botton et *al.*, 1990)**.

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance **(Pfohl-Leszkowicz, 1999).** Par ailleurs, les mycotoxines peuvent être élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance **(Samson et *al.*, 2004)**.

- **Humidité**

Les moisissures 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 moisissures non seulement sur la croissance mycélienne et la sporulation mais plus particulièrement sur la germination des spores **(Bourgeois, 1989)**.

Les moisissures 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 moisissures à mycélium cloisonné supportent en moyenne jusqu'a – 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)**.

- **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 acide. 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)**.

- **Activité de l'eau (Aw)**

L'Aw d'un aliment dépend de sa composition chimique, c'est-à-dire de la quantité d'eau retenue par les sels, sucres et protéines, ainsi que de ses caractéristiques physiques (porosité, polarité). Ce paramètre peut varier de 0 (pour les substrats dans lesquels toute l'eau est retenue) à 1 (pour l'eau pure).

Les moisissures sont, de façon schématique, plus xérotolérantes que les autres microorganismes (bactéries, levures). La plupart des moisissures se développent bien pour des activités en eau voisines de 0,85. Par conséquent, beaucoup de produits dont l'activité hydrique ne permet pas la croissance bactérienne peuvent être colonisés par les moisissures. Les moisissures appartenant aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont généralement capables de se développer à des Aw voisines

de 0,7 à 25°C ; elles peuvent donc se développer dans les aliments pauvres en eau comme les céréales au cours de stockage, les fruits secs, les produits dont l'activité hydrique a été réduite (produits de salaison sèche, confitures,…) **(Castegnaro, Pfohl-Leszkowicz, 2002)**.

- **Oxygène**

La quantité d'oxygène mise à la disposition des moisissures 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)**.

2- Facteurs chimiques (facteurs extrinsèques)

- **Eléments nutritifs**

Les moisissures sont des microorganismes hétérotrophes, elles exigent donc la présence des éléments nutritifs de base (carbone, azote et ions minéraux) dans le milieu qui assure leur croissance. Les moisissures possèdent une panoplie enzymatique extrêmement riche, qui leur permet d'utiliser plus efficacement encore que les bactéries, les substrats les plus complexes. Leur digestion doit commencer dans le milieu extérieur par des enzymes excrétées (extracellulaires) ou liées à la paroi, car seules les molécules de taille relativement petite peuvent franchir les parois et gagner le cytoplasme **(Davet, 1996)**.

- **Source de carbone et d'énergie**

Pratiquement tous les composés organiques peuvent être utilisés comme source de carbone et d'énergie par les moisissures. La plupart d'entre elles peuvent métaboliser le glucose et le saccharose avec quelques polysaccharides comme l'amidon et la cellulose **(Boiron, 1996 ; Nickline et *al.*, 2000)**. Certains d'entre elle produisent des lipases extracellulaires capables d'hydrolyser les lipides en glycérol et acide gras qui peuvent être assimilés par beaucoup d'espèces fongiques, alors que seulement certaines espèces utilisent les acides organiques et l'éthanol **(Boiron, 1996 ; Tabuc, 2007).**

- **Source d'azote**

La plupart des moisissures assimilent l'ammoniaque sous forme de sels (NH4+) dont la présence réprime l'utilisation d'autres sources azotées (nitrate, acides aminés, protéines). L'ammoniaque est transformé en acide glutamique, en glutamine ou en d'autres acides aminés par transamination **(Boiron, 1996)**, alors que seules certaines espèces utilisent le nitrate, d'autres ne peuvent croître qu'en présence d'azote organique et aucune moisissure ne peut fixer l'azote atmosphérique **(Devet, 1997; Belyagoubi, 2006)**.

- **Eléments minéraux**

La présence des ions minéraux et métaux dans le milieu de culture est nécessaire pour la croissance et la reproduction de plusieurs espèces fongiques, il s'agit essentiellement de sulfate, de magnésium, de potassium, de sodium et de phosphore avec des concentrations plus au moins différentes selon l'espèce *(***Uchicoba et *al.,* 2001**). Des traces d'éléments tels que le fer, le cuivre, le manganèse, le zinc et le molybdène, sont nécessaires à la plupart des moisissures pour la production des cytochromes, des pigments, des acides organiques, etc **(Boiron, 1996)**.

3- Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques)

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines. De plus, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine **(Le baras et *al.,* 1987)**.

II- Mycologie Marine

II.1- Introduction

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

- La description par Desmazières en 1849 de la première espèce de champignon isolée du milieu marin, *Phaeosphira typharum*,
- La découverte des botanistes français Durieu de Maisonneuve et Montagne en 1869 du premier champignon strictement marin, *Halottia posidoniae* (à l'origine *Sphaeria oceanica*),
- et l'isolement de levures à partir de la mer par Fischer puis Brebeck en 1894 **(Brisou, 1975)**.

Cependant, cette discipline n'a pris son véritable essor qu'en 1944, suite à la publication par Barghoorn et Linder d'un document de référence intitulé : « Marine fungi, their taxonomy and biology » qui traite de plusieurs espèces fongiques présentes sur le bois en milieu mari **(Kohlmeyer, 1983 ; Gareth-Jones, 1998 ; Vishwakiran et *al.,* 2001)**.

Depuis, ont été identifiées des centaines d'espèces de micromycètes d'origine marine strictes ou facultatives.

II.2- Champignons marins microscopiques

II.2.1- Définition

Comme tous les micromycètes, les champignons marins sont des organismes microscopiques eucaryotes pluricellulaires. La taxonomie les situe entre les végétaux et les animaux. Ils sont hétérotrophes pour la matière organique, qu'ils se procurent à partir d'autres organismes via d'importants dispositifs enzymatiques. Leur mode de reproduction est sexué et/ou asexué. La colonie fongique née à partir d'une spore, qui émet un bourgeon germinatif, se développe en hyphe (structure cellulaire tubulaire siphonnée ou cloisonnée). Cet hyphe se multiplie en un important réseau enchevêtré d'autres hyphes : le mycélium, d'apparence très variable et qui envahit le substrat par zones concentriques.

Les champignons de la mer sont définis selon leurs besoins environnementaux et physiologiques. La définition en vigueur est celle de Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979). Elle stipule que « **les champignons marins obligatoires** sont ceux qui ne peuvent croître et sporuler qu'exclusivement en milieu marin et estuarien. **Les champignons marins facultatifs** sont ceux provenant de milieux aquatiques et terrestres, capables de se développer, et probablement de sporuler, dans le milieu marin » **(Fenical et Jensen, 1997)**.

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.*

Le nombre d'espèces de champignons filamenteux marins est estimé par Kohlmeyer et Kohlmeyer (1979) à 500. Schaumann (1993) avance le nombre de 6000 espèces, alors que Gareth-Jones (1997) le limite à 1500.Toujours est-il que ces chiffres sont révisés par la découverte régulière de nouvelles espèces, et selon que les auteurs considèrent ou non les levures et Phycomycétes (champignons caractérisés par un thalle à hyphes non cloisonnés) **(Liberra et Lindequist, 1995)**.

D'après **Jones (2011)**, le nombre actuel d'espèces marines obligatoires de champignons supérieurs est de 549 dont seulement décrites après l'an 2000. La plus grande partie de ces espèces sont lignicoles (*i.e.* associées à un substrat en bois) dans les zones tempérées et dans les mangroves tropicales **(Jones, 2011)**.

II.2.2- Répartition géographique et biotope

La biogéographie de la microfonge marine dépend largement de **(Kohlmeyer, 1983 ; Cuomo et *al.*, 1995 ; Hyde et *al.*, 1998)** :

- La température ;
- La salinité ;

- La teneur en éléments nutritifs ;
- La pression hydrostatique ;
- La concentration d'oxygène.

Présents dans toutes les mers et océans, les micromycètes marins sont répartis sur le littoral, les plages sablonneuses, mangroves et les eaux profondes, même dans les profondeurs abyssales à plus de –5000 m **(Brisou, 1975 ; Kohlmeyer, 1977 ; Pang et *al.,* 2004**).

La microfonge marine des grandes profondeurs reste de ce fait très peu connue **(Liberra et Lindequist, 1995 ; Vishwakiran et *al.,* 2001)**.

Transportées par des supports inertes ou vivants sur lesquelles elles s'adsorbent, les spores fongiques sont véhiculées par les courants marins **(Brisou, 1975)** et atteignent les 5 zones mycogéographiques marines à travers le globe terrestre : arctique, tempérée, subtropicale, tropicale et antarctique **(Kohlmeyer, 1983)**.

Leur répartition et fréquence restent plus constantes au niveau des sédiments, sur le plancton côtier et de haute mer, dans les mollusques et intestins de poissons **(Brisou, 1975)**.

Beaucoup de micromycètes marins vivent sur des algues, bois, feuilles et autres corps organiques végétaux et animaux en décomposition, boues, sable et corail **(Hyde et *al.,* 1998)**.

Ils sont également présents sur des mollusques, coquillages, crabes et éponges ainsi que dans le tractus gastro-intestinal de poissons et certaines espèces sont d'importants pathogènes en milieu marin. D'autre, comme *Schizochytrium aggregatum*, sont de plus des réservoirs naturels de virus pathogènes qu'ils transmettent ainsi à leurs hôtes **(Solliec, 2004)**.

D'autres espèces forment des lichens avec des algues marines sur les rochers côtiers, alors que certaines sont libres et flottent dans le plancton.

Booth et Kenkel (1986) suggèrent que la température et le facteur le plus important dans la répartition géographique des mycètes marins.

II.2.3- Relations biologiques

Les champignons marins (organismes hétérotrophes) vivent aux dépens de substrats organiques, dont ils tirent l'énergie grâce à un arsenal d'enzymes tout comme leurs homologues terrestres **(Liberra et Lindequist, 1995)**.

On leur connaît des interactions avec les algues marines, les plantes vasculaires, les invertébrés, les poissons et les mammifères **(Stanley, 1992)**. Les relations biologiques des champignons marins avec le monde vivant sont de plusieurs types :

- ✓ **Saprotrophes** : Ils sont activement responsables de la dégradation des substrats ligneux marins riches en lignocelluloses (cellulose, hémicellulose et lignine) **(Kohlmeyer et Kohlmeyer,**

1995). Ils contribuent également à la dégradation des cadavres d'animaux marins **(Sridhar et Prasannarai, 2001)**.

- ✓ **Parasites :** Les mycoses ont un impact important dans l'environnement marin et agissent comme un facteur naturel limitant de plantes aquatiques, d'algues et d'animaux (intestins de poissons et Crustacés). Ils provoquent de sérieuses infections chez les invertébrés marins, et affectent le développement des oeufs et des larves de Crustacés. Les champignons mitosporiques sont les mycopathogènes marins les plus fréquents (*Fusarium sp*. chez les Crustacés, *Cladosporium sp*. chez le poulpe, *Phialospora sp.* infections internes chez les poissons, *Icthyphonus sp*. Inflammation par enkystement des muscles de poissons) **(Polglase et *al.*, 1986)**.
- ✓ **Symbiotes :** Forment un lichen (ex. *Chadefaudia corallinarum* s'associe avec l'algue *Dermatoliton sp*.) ou une mycophycobiose (relation d'intérêt mutuel entre un champignon et une macroalgue) démontrée par la relation obligatoire et protectrice pour l'algue entre *Turgidosculum complicatum* et la macroalgue *Praseola borealis* **(Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979 ; Stanley, 1992 ; Hyde et *al.,* 1998)**.

Les champignons marins représentent un maillon important dans les chaînes alimentaires de l'écosystème marin et sont eux-mêmes une source de nourriture pour d'autres organismes marins. Ils colonisent et forment des structures communautaires sur les substrats vivants et morts, submergés dans la mer **(Hughes, 1975 ; Cuomo et *al*., 1995 ; Liberra et Lindequist, 1995)**.

Par ailleurs, la survie de ces micromycètes dans le monde marin, face à la rude compétition avec d'autres organismes, dépend entièrement de la production de métabolites secondaires. La dominance de certains genres sur certains substrats marins s'explique par leur production de molécules fortement bioactives, comme c'est le cas de *Corollospora maritima* et *Halocyphina villosa* **(Cuomo et *al.*, 1995 ; Liberra et Lindequist, 1995)**. Cinquante sept pour cent des espèces isolées de la Mer du Japon se sont montrées bioactives (hémolytiques), notamment des souches de *Trichoderma sp*. et d'*Aspergillus sp.* **(Khudyakova et *al.,* 2000)**.

III. Métabolites secondaires des mycètes

Les champignons sont des organismes remarquables qui produisent un large éventail de produits naturels souvent appelés métabolites secondaires **(Calvo et *al.,* 2002)**. Les métabolites secondaires se caractérisent par le fait que, leur production n'est pas indispensable à la croissance du microorganisme lui-même et ils sont de structure et d'activité biologique très diverses **(Hawksworth et *al*., 1995 ; Boiron, 1996)**.

En général, les termes, métabolites secondaires, xénobiotiques, facteurs antinutritionnels, sont utilisés pour déterminés ce groupe, il existe plus de 200.000 composés connus qui ont des effets antinutritionnels et toxiques chez les mammifères. Comme ces composés ont des effets toxiques,

leur incorporation dans l'alimentation humaine peut être utile pour la prévention contre plusieurs maladies (cancer, maladies circulatoires, les infections virales…), car la différence entre toxicité et effet bénéfique est généralement soit dose ou structure dépendant **(Makkar et *al.,* 2007)**.

Les microorganismes ne produisent pas leur métabolites secondaires avant d'avoir terminé leur phase de croissance et d'avoir entamé la phase stationnaire, appelé idiophase.

En effet, le métabolite secondaire peut être un produit d'un métabolite primaire du même microbe **(Calvo et *al*., 2002 ; Tortora et *al*., 2003)**, qui se forme (le métabolite primaire) au moment ou les cellules se divisent durant la phase de croissance logarithmique appelée trophophase **(Tortora et *al.,* 2003)**.

Chez les mycètes, la production de métabolites secondaires est un processus couplé au développement morphologique en particulier à la phase de sporulation **(Hapwood, 1988 ; Mapleston et *al .,* 1992 ; Stone et Williams, 1992 ; Demain et Fang, 2000 ; Calvo et *al*., 2002)**.

Les métabolites secondaires peuvent avoir certaines activités :

- Métabolites qui activent la sporulation (Acide linoléique et ses dérivés produit par *Aspergillus nidulans) (***Champ et *al.,* 1987 ; Champ et El-Zayat, 1989 ; Mazur et *al*., 1991, Calvo et *al.,* 2001)**.
- Pigments nécessaires (mélanine) pour la formation des spores sexuelles et asexuelles **(Kawamura et *al*., 1999)**.
- Métabolites toxiques secrétés par des colonies à la période approximative de la sporulation (la biosynthèse des mycotoxines) (**Trail et *al.,* 1995 ; Hapwood, 1988 ; Alspaught et *al.,* 1997)**.

Ultérieurement, les métabolites secondaires peuvent :

- Retarder la germination des spores jusqu'à ce que les conditions environnementales soient favorables ;
- Protègent les spores en dormance contre des amibes ;
- Elimination des microorganismes concurrents pendant la germination dans l'environnement **(Demain et Fang, 2000)**.

Les métabolites secondaires fongiques présentent un intérêt intense pour leurs propriétés pharmaceutiques (antibiotiques) et / ou toxiques (mycotoxines) **(Jae - Hyuk et Keller, 2005)**.

III.1- Mycotoxines

III.1.1- Définition

Le terme mycotoxine dérive du grec « mycos », signifiant champignon et du latin toxicum signifiant «poison». Les mycotoxines sont des molécules capables, à de faibles concentrations,

d'induire un effet toxique **(Reboux et *al.,* 2006)**. Ce sont des métabolites secondaires produits après la phase de croissance du champignon. Ils se distinguent des métabolites primaires comme par exemple les produits de la glycolyse, qui sont primordiaux pour tout être vivant.

Le métabolisme secondaire est très diversifié, d'où la multitude de métabolites secondaires.

Tous les métabolites secondaires ne sont pas néfastes pour l'homme. Il en est ainsi pour les antibiotiques **(Sidhu, 2002)**. Il existe environ 300 à 400 mycotoxines **(Elidemir et *al.,* 1999)**.

D'après leur structure chimique, les mycotoxines sont considérées comme stables et en particulier thermostables **(Frémy et *al.,* 2005 ; Bullerman et *al.,* 2007)**.

Plusieurs genres de moisissures sont connus comme étant producteurs de mycotoxines. Parmi eux, *Aspergillus, Fusarium, Penicillium, Alternaria, Claviceps* (Tableau 01). Une même espèce fongique peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture et une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes.

Tableau 01 : Principaux genres de moisissures et leurs mycotoxines associées.

Espèce fongique productrice	Mycotoxines associées
Aspergillus sp.	Gliotoxine, fumagilline, acide helvolique,trypacidine, fumitrémorgines, fumiquinazolines, aflatoxines, ochratoxines, stérigmatocystine.
Alternaria sp.	Alternariol, acide ténuazonique.
Claviceps sp.	Alcaloïdes (ergotamine et dérivés)
Fusarium sp.	Trichothécènes (déoxynyvalénol, toxine T-2, diacétoxyscirpénol, nivalénol), zéaralénone, fumonisines, fusarine, moniliformine.
Penicillium sp.	Ochratoxine A, pénitrem A, acide cyclopiazonique, patuline, citrinine.

III.1.2- Principales mycotoxines

- **Aflatoxines**

Les aflatoxines (AFs) représentent un groupe de dérivés structurellement apparentés au difurano-coumarine **(Bhatnagar et *al.,* 2003).** Ces substances sont produites par des espèces d'*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius* **(Kurtzman et *al.,* 1987)**. Elles sont extrêmement toxiques et leurs effets secondaires incluent : la carcinogénicité, la mutagénicité, la tératogénicité et l'immunosuppression **(Eaton et Gallagher, 1994)**. Les aflatoxines les plus rencontrées dans la nature sont : AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1. Parmi les aflatoxines,

l'AFB1 est la plus fréquente et la plus toxique. Elle est considérée comme étant le plus puissant hépatocancérigène pour les mammifères et elle est classée en tant que cancérigène probable du groupe 1 par l'agence internationale de la recherche sur le cancer (IARC) **(Iarc, 1993)**.

III.1.3- Nature des mycotoxines

Les mycotoxines sont des molécules de structures chimiques très diverses issues du métabolisme secondaire de la plupart des champignons (même en culture in vitro), souvent excrétés dans le milieu environnant **(Frisvad, 1990 ; Demain et Fang, 2000 ; Miller, 2000)**.

Les mycotoxines n'ont pas de rôle évident dans l'économie de la cellule vivante qui les synthétise. Plus de 300 mycotoxines dont on a pu identifier la structure chimique ont été produites par culture, sous contrôle strict de température et d'humidité, à partir de quelques 350 types de moisissures **(LeBars et Le Bars ,1987)**.

Ces mycotoxines présentent des origines chimiques très diverses correspondant à la différence de leurs voies de biosynthèse : il s'agit de composés dérivés des acides aminés (alcaloïdes de l'ergot, acide aspergillique, acide cyclopiazonique, slaframine, gliotoxine, roquefortine, sporodesmine), d'autres des polycétoacides (aflatoxines ,ochratoxines patuline, citrinine, acide pénicillique ,stérigmatocystine, zéaralénone) et d'autres des dérivés terpéniques (diacétoxyscirpénol, fusarénone,désoxynivalénol, roridines,toxine T-2,verrucarine) **(Steyn, 1980 ; Turner, 1971, 1983)**.

III.1.4- Effets des mycotoxines

Les mycotoxines constituent un danger imminent qui tire le signal d'alarme, en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, sur la productivité animale et sur le commerce national et international.

La FAO estime que plus de 25 % des récoltes mondiales sont significativement contaminées par des mycotoxines **(Krska, 2009)**.

L'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës ou chroniques nommées mycotoxicoses. Cependant, les intoxications aiguës sont rares, spécifiquement chez l'homme, en raison des faibles quantités pouvant être ingérées avec des aliments contaminés. Mais, l'intoxication chronique est souvent à craindre et ce, à cause de l'effet cumulatif des doses fixées sur des organes cibles, tels que le foie ou le rein **(Leclerc et *al.*, 2005)**.

Les mycotoxines peuvent aussi avoir des effets cancérogènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (Tableau 02).

En outre, certaines mycotoxines peuvent altérer des réactions immunitaires et réduire ainsi, la résistance aux infections. Du coup, il est, maintenant, largement considéré comme leur effet le plus important, surtout dans les pays en développement **(Pamel et *al.*, 2010)**.

Tableau 02 : Les principales mycotoxines et leurs effets avérés ou suspectés.

Mycotoxines	**Effets avérés ou suspectés**
Aflatoxines	Hépatotoxique- Mutagène- Cancérogène- Immunotoxique.
Citrinine	Néphrotoxique.
Fumonisine B1	Neurotoxique-Hépatotoxique- Immunotoxique- Cancérogène.
Ochratoxines	Néphrotoxique- Cancérogène- Mutagène.
Patuline	Neurotoxique- Mutagène (*in vitro*).
Pénitrème A	Neurotoxique.
Stérigmatocystine	Cancérogène- Hépatotoxique.
Trichothécènes	Cancérogène- Hépatotoxique- Immunotoxique- Hématotoxique.
Zéaralénone	Ostrogénique- Effet sur la fertilité et la reproduction.

III.2- Antibiotiques

Sont des substances chimiques synthétisées par des microorganismes. Ces molécules en concentration faible inhibent la croissance ou tuent d'autres organismes **(Larpent et Gourgoud, 1997)**. De mode d'action spécifique **(Joffin et Leyral, 2006)**. Ces substances sont d'origine naturelle semi synthétiques ou synthétiques **(Delarras, 2007)**.

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire **(Coates et Hu, 2007)**. Parmi un total de quelques 10 700 antibiotiques décrits pour l'ensemble du monde vivant, environ 1600 proviennent de champignon. Les genres *Aspergillus* et *Penicillium* ainsi que les espèces de l'ordre des *Monilliales*, constituent les réservoirs les plus importants **(Botton et *al.*, 1990)**. Le tableau 03 représente les antibiotiques produits par certains champignons.

Tableau 03: mycètes producteurs d'antibiotiques **(Larpent et Larpent , 1996).**

Organismes producteurs	**Antibiotiques**
Aspergillus flavus	Acide aspergillique.
Aspergillus fumigatus	Fumagilline.
Cephalosporium acremoniumu	Céphalosporine.

Cephalisporium caerulens	Cérulinine.
Fusidium coccineum	Acide fusidique.
Helminthsporium siccans	Siccanine.
Paecilomyces variotti	Variotine.
Penicillium chrysogenum	Pénicilline.
Penicillium griseofulvum	Griséofluvine.

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes (50 à 75% des souches isolées sont productrices d'antibiotiques, dont la streptomycine, la chlorotétracycline, l'oxytétracycline, la cycloheximide) (Fig. 09) **(Dommergues et Mangenot, 1970)**.

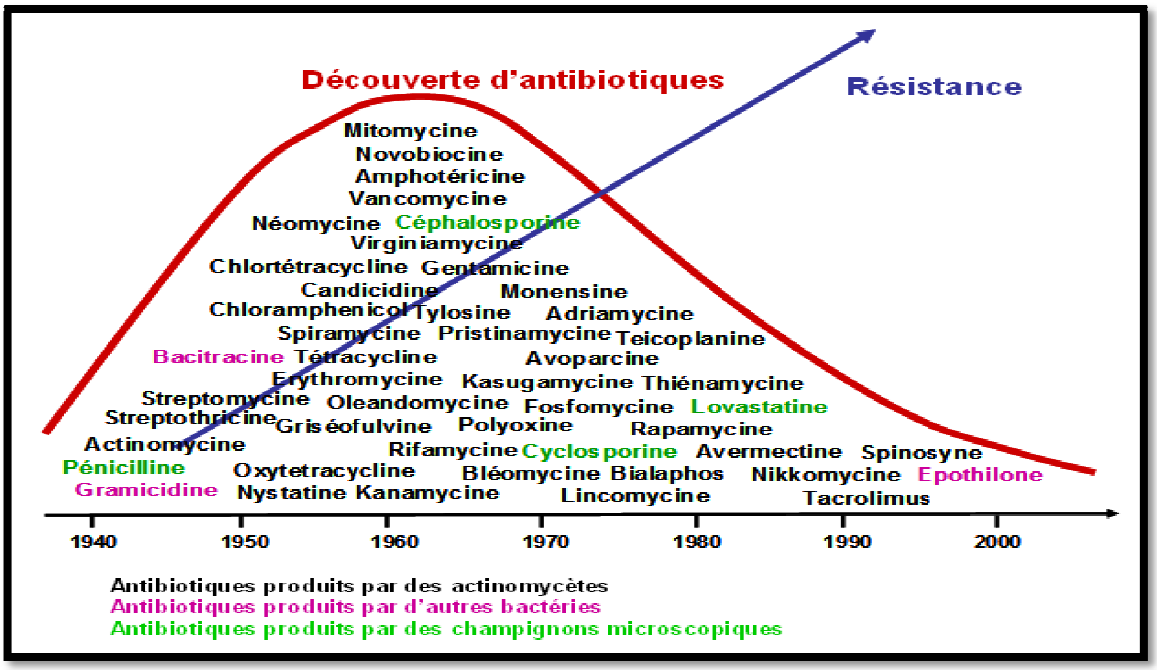


Figure 09 : Différents antibiotiques produits par les différents microorganismes.

III.3- Métabolites secondaires bioactifs des champignons marins

La première molécule fongique marine a été découverte en 1945, par Giuseppe Brotzu qui a isolé un champignon d'une bouche d'égout donnant sur la mer. Ce champignon, initialement identifié comme *Cephalosporium acremonium*, montrait des activités contre les bactéries à Gram négatif et Gram-positif **(Abraham, 1979)**. Les cultures de *C. acremonium* ont permis d'isoler et de caractériser d'une famille de molécules appelées céphalosporines, encore utilisées aujourd'hui en médecine **(Muñiz et *al.*, 2007)**.

La recherche des molécules actives issues de champignons marins est relativement récente. Il aura fallu attendre presque 50 ans, après Giuseppe Brotzu, pour voir s'intensifier les recherches sur les

métabolites fongiques marins. Avant 1992, seulement 15 composés de champignons marins étaient décrits **(Fenical et Jensen, 1993)**. Depuis, le nombre de molécules fongiques marines a augmenté de façon exponentielle (Fig. 10).

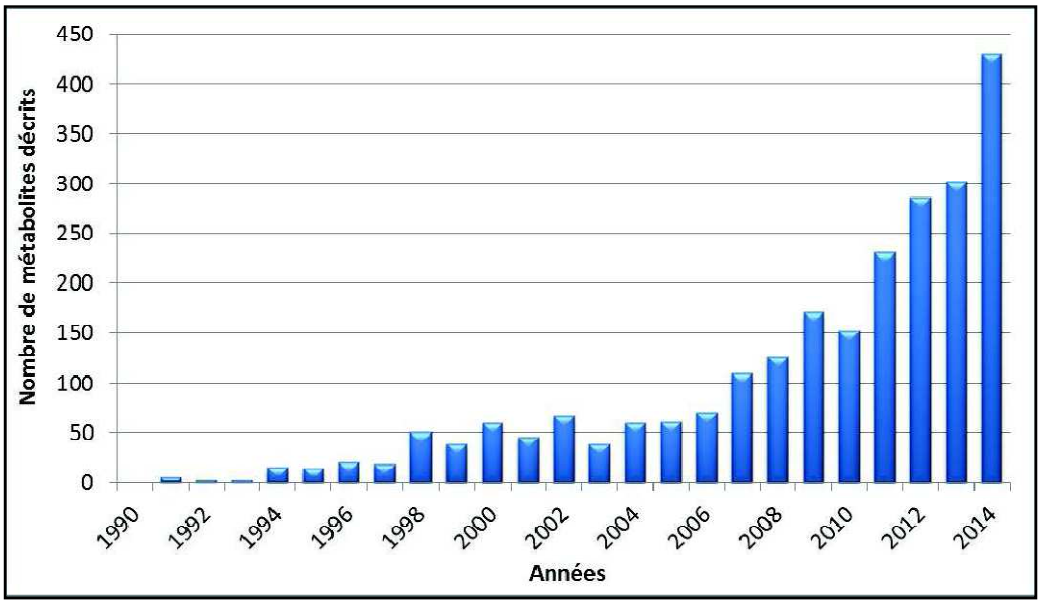


Figure 10 : Nombre de métabolites de champignons marins décrits chaque année **(Faulkner, 1992, 2002, Blunt et *al.*, 2003, 2016)**.

Les genres *Aspergillus* et *Penicillium*, fréquemment rencontrés en milieu marin, se révèlent être les producteurs majoritaires de molécules actives **(Blunt et *al.*, 2015a; Imhoff, 2016)**. Sachant que la biodiversité fongique cultivable n'est que la partie émergée de l'iceberg, la chimio-diversité des molécules fongiques marines et leurs potentielles activités biologiques restent encore largement inexplorées. Elles pourraient probablement, être source d'innovations dans le traitement des maladies. En effet, la plinabuline est un dérivé de l'halimide, produite par *Aspergillus* sp. CNC139, isolée de l'algue verte *Halimeda copiosa* **(Fenical et *al.*, 2000)**. La plinabuline est en troisième phase clinique **(Adis International Ltd, 2016; BeyondSpring Pharmaceuticals, 2016)**. Elle présente une nouvelle structure et un nouveau mode d'action dans la lutte contre le cancer du poumon **(Millward et *al.*, 2011)**.

Au stade pré-clinique, les trichoderines A, A1 et B, ont été isolés d'une souche de *Trichoderma* sp. 05FI48, isolée d'une éponge **(Pruksakorn et *al.*, 2010 ; Mayer et *al.*, 2013)**. Ces peptides linéaires originaux sont actifs contre *Mycobacterium tuberculosis* et ses spores dormantes contrairement aux molécules actuellement utilisées dans les cas de tuberculoses **(Pruksakorn et *al.*, 2011; Farah et *al.*, 2016)**.

1. Préparation des souches fongiques

1.1. Choix des souches :

Neuf souches de micromycètes appartenant aux genres « *Penicillium, Aspergillus* et *Alternaria »,* ont été fournies et identifiées par Madame N. Benmessaoud du laboratoire LRSE (Laboratoire Réseau de Surveillance Environnementale), Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella. Ces souches ont été isolées à partir de deux espèces de poissons d'aquaculture. Il s'agit de la daurade royale (*Sparus aurata*) et le bar commum ou loup de mer (*Dicentrarchus labrax).* Les souches fongiques ont été conservés à 4° C jusqu'à leur utilisation.

1.2. Repiquage et revivification des souches

Les micromycètes qui ont été isolés, purifiés puis conservés à 4°C, ont subi une revivification en les repiquant sur le milieu sabouraud**.** Ce milieu de culture a été choisi pour l'isolement fongique, à raison de 35 g de glucose, 15 g d'agar agar et 10 g de peptone par litre d'eau distillée. Le milieu de culture a été stérilisé à l'autoclave à 120°C pendant 20 min. On additionne au milieu de culture un antibiotique : le Chloramphénicol à une concentration de 50 mg /l afin d'éviter la prolifération bactérienne qui pourrait inhiber ou gêner celle des champignons. Le milieu de culture est coulé dans des boites de pétri de (9 cm de diamètre).

Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilisée. Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boite sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boite de prélèvement. Les boites de Pétri sont entourées du papier parafilm et sont mises à incuber à une température de 27°C, jusqu'à l'envahissement total de la surface de la gélose (5 à 7 jours). Chaque boite de Pétri contient un champignon donné. Le repiquage se fait aseptiquement près du bec Bunsen.

1.3. Identification des micromycètes

L'identification des champignons filamenteux repose sur des critères culturaux, température de croissance et vitesse de pousse, mais surtout sur des critères morphologiques associant l'aspect macroscopique et microscopique des cultures **(Gari et *al.,* 2001).**

1.3.1. Identification morphologique :

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères culturaux (température et vitesse de croissance, milieux favorables). Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopique (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores,…) **(Cahagnier et Richard-Molard, 1998).**

1.3.1.1. Critères d'identification macroscopique :

- **L'aspect des colonies :** est un bon critère d'orientation. 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 bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium ou diffuser dans le milieu de culture.

1.3.1.2. Identification microscopique :

L'identification des moisissures a été réalisée par observation microscopique des lames préparées. Un petit morceau de papier adhésif transparent est accroché sur la pointe d'une pince. Sa face adhésive est déposée sur la surface de la colonie fongique en culture en boîte de Pétri. Ce contact permet de prélever du mycélium et des spores. La face adhésive du papier est ensuite appliquée sur une lame. Pour augmenter le contraste, une goutte de colorant du rouge Congo a été déposée sur la lame juste avant d'y accoler le papier adhésif **(Sallenave, 1999).**

Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose **(Botton et *al.*, 1990).**

1.3.1.2.1. Critères d'identification microscopique

Généralement, un examen à l'objectif X 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants de diagnose (Cahagnier et Richard-Mollard, 1998).

- Le thalle: tous les champignons possèdent un appareil végétatif constitué de filaments (hyphes) qui, ensemble, forment le thalle filamenteux ou le mycélium ; le thalle peut être siphoné ou septé:

- **Le thalle siphoné :** constitué d'éléments tubulaires peu ou pas ramifié, de diamètre large et irrégulier (5-15 µm), non cloisonné est caractéristique des *Zygomycètes* ;

- **Le thalle septé ou cloisonné :** constitué de filaments de diamètre étroit (2-5 µm) et régulier, divisé par des cloisons en articles uni ou pluricellulaires est caractéristique des *Ascomycètes, Basidiomycètes* et *Deutéromycètes* **(Badillet et *al.*, 1987).**

- Les spores : Les spores qui sont le produit de la reproduction asexuée peuvent être endogènes ou exogènes :

- **Les spores endogènes** (endospores) sont produites à l'intérieur d'un sac fermé (sporange), porté par un filament spécialisé (sporangiophore). Ces spores, que l'on observe par exemple chez les *Mucorales*, sont libérées par le déchirement de la paroi de sporange à maturité.

- **Les spores exogènes** (conidies), retrouvées chez les *Ascomycètes, Basidiomycètes* et *Deutéromycètes*, sont formées par bourgeonnement à partir d'une cellule spécialisée (cellule conidiogène).

L'examen des spores et de leur organisation est une étape importante de l'identification fongique **(Campbell et *al.*, 1996).**

2. Production des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires par les souches étudiées a été mise en évidence par une extraction à partir d'une culture de fermentation.

2.1. Préparation du milieu de fermentation

Le milieu Czapeck dox liquide (CYA) a été choisi comme un milieu spécifique pour une production optimale des métabolites secondaires fongiques **(Rojas et *al.,* 2005, Pamel et *al.,* 2010).**

La fermentation a été réalisée dans des erlen meyer de 250 ml contenant 100 ml du milieu de culture (Czapeck dox liquide) et le pH a été ajusté à 5,5 **(Tuomi et *al.,* 2001).**

2.1.1. Ensemencement du milieu de fermentation

Les souches fongiques sélectionnées et repiquées déjà sur le milieu sabouraud-chloramphénicol, ont été ensemencées en surface dans des erlen meyer de 250 ml contenant 30 ml de PDA gélosé (la préparation est en annexe).

Après 10 jours d'incubation à 27°C, les souches étudiées sporulent et leur spores ont été récupérées par l'ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse à l'aide d'un barreau magnétique **(Rabie et *al.*, 1977).** Les suspensions sporales obtenues ont été diluées avec de l'eau distillée stérile. Ensuite, la concentration en spores/ml des solutions obtenues a été déterminée à l'aide d'une cellule de Thomas. Des dilutions décimales ont été effectuées pour obtenir une suspension sporale à 10^6 spore/ml (**Klich et *al.,* 2000; Seo et *al.,* 2003; Ehrlich et *al.,* 2005).**

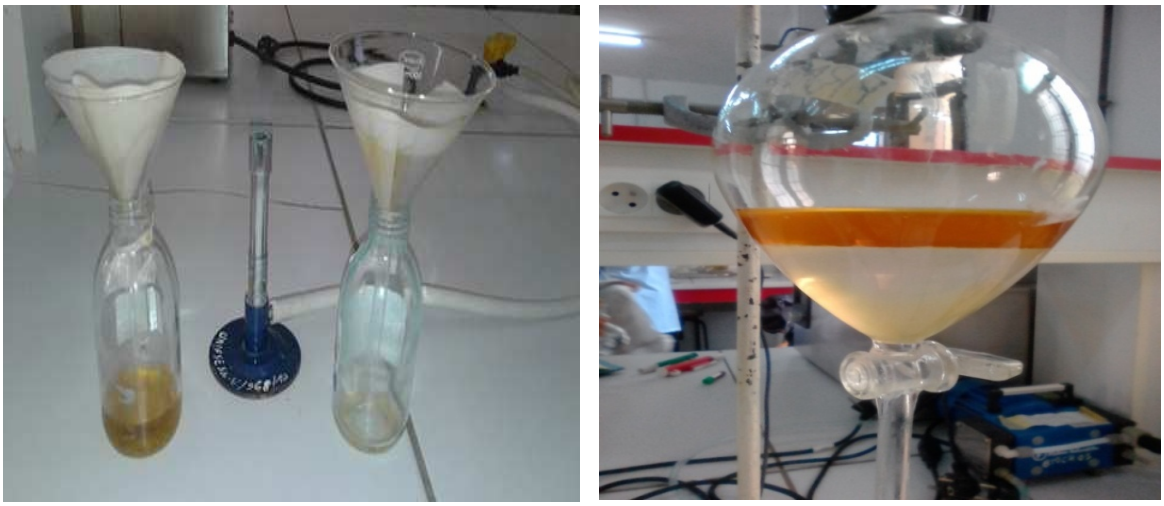
Chaque erlen meyer contenant le milieu de culture a été inoculé par 1 ml de la suspension

sporale (10^6 spore/ml). Les erlen meyer ont été incubés en statique à 27°C, pendant 21 jours et à l'obscurité **(Chung et *al.*, 1989; Barnes et *al*., 1994 ; Klich et *al.*, 2001).**

2.2. Procédure d'extraction

Après une période optimale de 3 semaines, la biomasse formée a été éliminée en filtrant le milieu CYA à travers du papier filtre type Wattman N° 01 (Fig. 11 A). La filtration a été réalisée pour séparer le mycélium et récupérer uniquement le filtrat, pour qu'il soit concentré sous pression par évaporation du solvant à l'aide d'un évaporateur rotatif (rotavapor du type BÜCHI) à 45°C **(Mohanta et *al.*, 2008; Oliveira Silva et *al.*, 2009).** Le filtrat obtenu est extrait par son même volume d'acétate d'Ethyl (V : V). Ce dernier est choisi comme meilleur solvant d'extraction des métabolites secondaires fongiques selon **Badji et *al*., 2005 ; Gogoi et *al*., 2008 ; Qin et *al*., 2009.**

Ensuite on le met en contant prolongé. Le mélange est agité à 120 tours/min pendant 30 minutes, laissé décanter dans une ampoule de décantation pour séparer la phase aqueuse de la phase organique (Fig. 11 B). Cette opération a été répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation, et agité pendant 15 min et 10 min successivement. Enfin, on mélange les trois phases organiques, qui ont pour obtenir les métabolites secondaires bruts, et placé dans un flacon en verre parafilmé **(Gengan et *al.*, 1999).** L'ensemble a été déshydraté avec du Na_2SO_4 anhydre puis évaporé à sec pour donner des extraits bruts, qui ont été pesés par la suite, et diluer dans le DMSO (Diméthyl Sulfoxyde). Les extraits ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisation. Le protocole d'extraction est résumé dans la figure 14.



(A) Filtration du milieu de fermentation (B) Décantation

Figure 11 : Extraction des métabolites secondaires.

2.2.1. Fonctionnement Rotavapeur

Un appareil couramment utilisé pour éliminer un solvant d'un mélange, est l'évaporateur rotatif (appelé souvent « rotavapor ») **(Fig.10).** Le mélange de solvant et de soluté est placé dans le ballon de droite. Celui-ci est plongé dans un bain- marie .Il est incliné et animé d'un mouvement de rotation de manière à créer un film de liquide et ainsi accroitre la surface d'évaporation du solvant. La pression à l'intérieur du montage est abaissée au moyen d'une trompe à eau ce qui augmente la vitesse d'évaporation. Après condensation dans le réfrigérant, le solvant est récupéré dans le ballon de gauche **(Badra, 2013).**

Figure 12: Evaporation sous vide a l'aide d'un rotavapeur.

Figure 13 : Extraits bruts

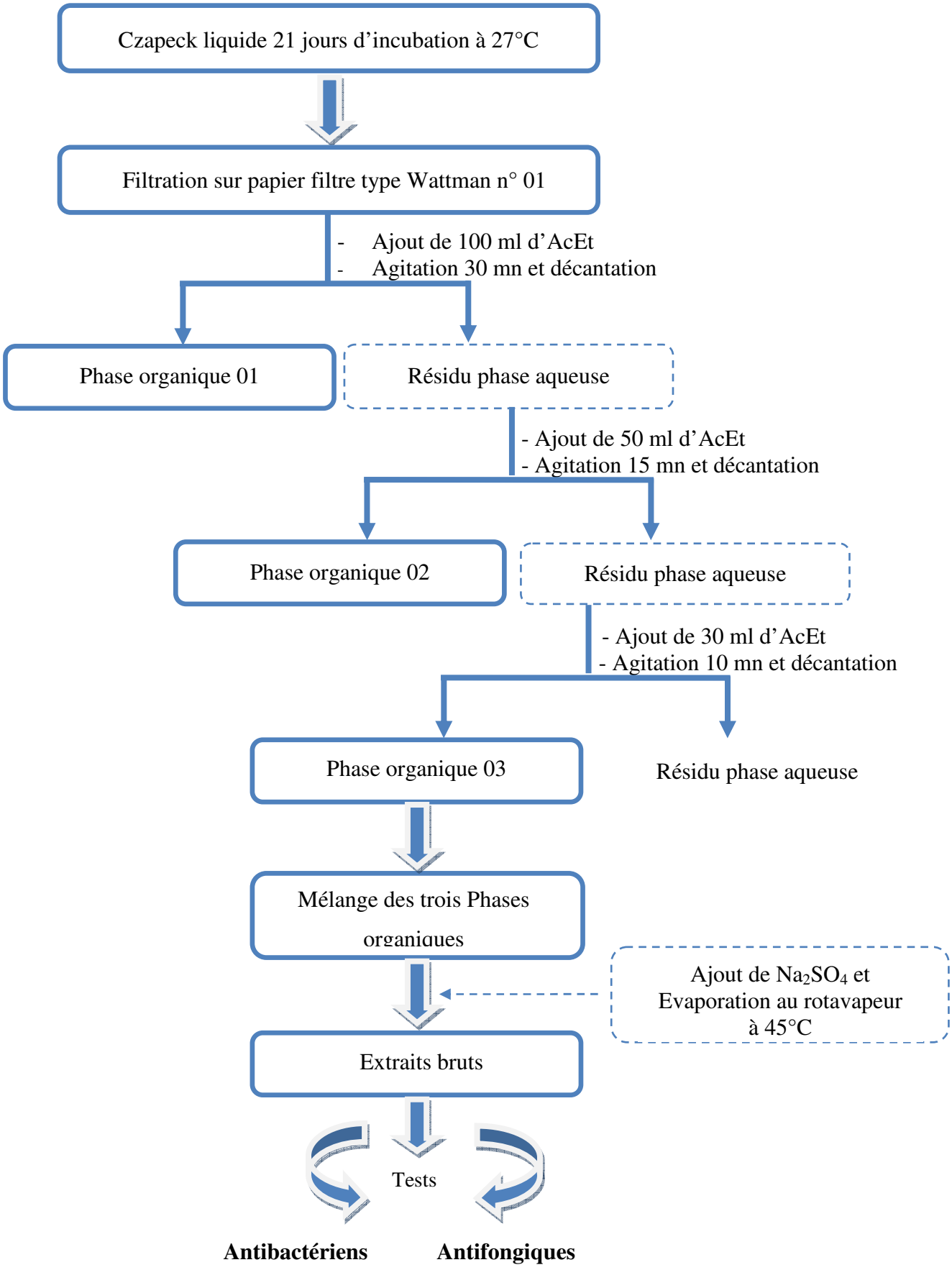


Figure 14 : Préparation des extraits en vue de tests biologiques.

3. Activité antimicrobienne

Les souches bactériennes qui ont été testées pour déceler l'activité antimicrobienne des métabolites secondaires extraites des différentes souches fongiques étudiées, sont des souches de référence, obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC): il s'agit d'une bactéries *à Gram + : Staphylococcus aureus* **ATCC 25923** et deux bactérie *à Gram - : Escherichia coli* **ATCC 25922** et *Pseudomonas aeruginosa* **ATCC 27853**, gracieusement fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital de Pédiatrie « Kanastel » Oran, puis conservées à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

♣ ***Staphylococcus aureus***

Les *staphylocoques* sont des coques à Gram positif, groupés en amas, aéro-anaérobies. Ils se développent volontiers dans les milieux légèrement sucrés ou salés. *Staphylococcus aureus* appelé aussi staphylocoque doré est l'espèce la plus redoutée, responsable d'infections cutanées suppurées et d'infections hospitalières graves. Les souches entérotoxiques de *staphylococcus aureus* sont à l'origine d'intoxications alimentaires **(Leyral et *al*., 1998).**

S.aureus est une bactérie commensale ubiquitaire qui colonise la peau, les muqueuses ainsi que les narines des humains et des animaux. *S. aureus* colonise les territoires cutanés en particulier, les zones humides (aisselles, périnée) et les mains. Elle est aussi retrouvée au niveau du tractus respiratoire, uro-génital et les mamelles des mammifères. Parfois, elle peut se trouver dans certains produits alimentaires tels que le lait non pasteurisé et la viande. Cette bactérie peut survivre longtemps dans l'environnement (**Werckenthin et *al.,* 2001**).

Figure 15 *:* *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et colorée artificiellement **(Delarras, 2007).**

♣ ***Escherichia coli***

Une bactérie du genre *Escherichia* est un bacille à coloration de Gram négative, aérobie-anaérobie facultatif (AAF), possédant une nitrate réductase et une catalase, dépourvue d'oxydase et non halophile. *E. coli* est une bactérie immobile ou mobile avec une structure flagellaire péritriche et non-sporulée. Sa température optimale de croissance est de 37°C. Bactérie non exigeante, elle est capable de croître sur des milieux ordinaires tels que le milieu TSA (trypticase-caséine-soja). **(King et *al.,* 2014).**

Escherichia coli est l'hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud ; c'est un coliforme fécal, germe indicateur de contamination fécale dans les eaux et les aliments .Les souches d'*Escherichia coli* responsables d'infection chez l'homme sont différents de celles qui constituent l'espèce dominante de la flore intestinale aérobie des adultes et des enfants **(Mihaila et *al* ., 2003).**

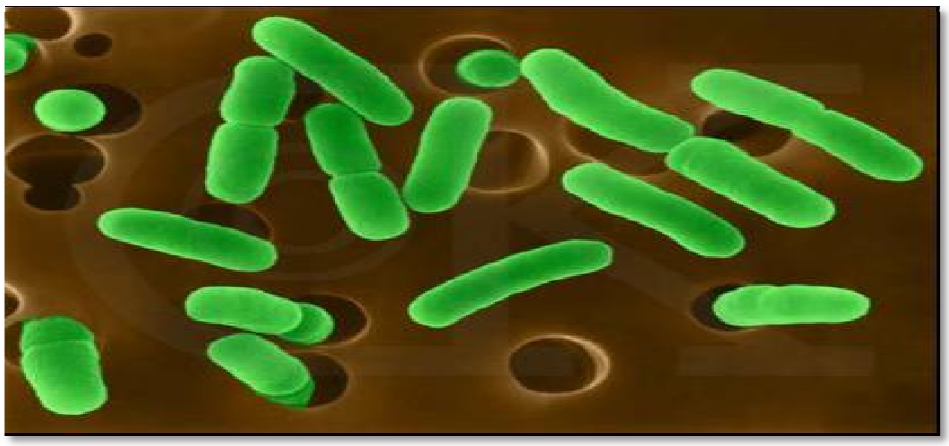


Figure16 *:* *Escherichia coli,* vue au microscope électronique à balayage et colorée artificiellement **(Delarras, 2007).**

♣ ***Pseudomonas aeruginosa***

Les *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, aérobies stricts généralement mobiles par un ou plusieurs flagelles polaires. La plupart sont saprophytes et présentes dans les eaux, le sol et sur les végétaux. *Pseudomonas aeruginosa* ou bacille pyocyanique est particulièrement redouté en milieu hospitalier dans les services de réanimation, de chirurgie, d'urologie ou de prématurés (**Leyral et *al* ., 1998).**

Il mesure de 1 à 5 µm de long et de 0,5 à 1 µm de large (**Figure 1**). Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, non fermentaire, aérobie stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobie. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive. Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de

sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. *P.aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. La morphologie de *P.aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique.

Figure 17 *: Pseudomonas aeruginosa*, vue au microscope électronique et colorée artificiellement **(Delarras, 2007).**

3.1. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne d'extraits ou de composés purs peut être évaluée en observant la réponse de la croissance des micro-organismes au contact des échantillons. Différentes méthodes pour détecter cette activité sont utilisables, mais toutes ne présentent pas une sensibilité équivalente ou ne sont pas basées sur le même principe, ainsi les résultats sont fortement influencés par la méthode.

Dans le présent travail, l'étude de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches de référence a été réalisée par la technique des disques de diffusion sur agar : disque en papier filtre contient une quantité définie des extraits à tester. L'agar est inoculé avec la souche bactérienne cible et le diamètre de la zone claire autour du disque, qui représente la zone d'inhibition de la croissance bactérienne, est mesurée à la fin de la période d'incubation. Cette méthode est couramment retrouvée dans la bibliographie, par exemple pour le criblage d'extraits de plantes ou d'algues **(Aureli et *al.*, 1992; Perumal Samy et *al.*, 1999; Das et *al.*, 2005)**. Elle semble surtout adaptée à des composés polaires et de petite taille, ou pour déterminer des antibiogrammes **(Ríos et Recio, 2005)**.

3.1.1. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont :

♣ **Muller Hinton Agar** pour l'étude de la sensibilité des souches bactériennes aux extraits fongiques, est préparé comme suit : Dissoudre 38g de la gélose Muller-Hinton dans 1L d'eau distillée. Faire bouillir avec agitation jusqu'à dissolution complète, avec un pH = 7.4 ± 0.2, puis autoclaver pendant 20 minutes à 121°C, et finalement, couler le milieu dans des boites de pétri à une épaisseur de 4 mm, on les laisse quelques minutes jusqu'à la solidification **(Harrar, 2012).**

♣ **Muller Hinton Broth** est préparé de la même manière comme le milieu précédent: Dissoudre 21g de Muller Hinton Broth dans 1L d'eau distillée.

3.1.2. Préparation de l'inoculum bactérien

Pour chaque souche, un inoculum est réalisé sur gélose Muller-Hinton à partir d'une suspension bactérienne pure et jeune (âgée de 18 heures) de 10^6 UFC/ml, standardisée à la longueur d'onde λ = 620 nm (selon le standard Mc Ferland, une densité optique de 0.08 à 0.1 correspond approximativement à une concentration de 10^8 UFC/ml) **(Goldman et Green, 2008)**. La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile, et en utilisant un Spectrophotomètre de type (JEN WAY, 7305 UV/Vis).

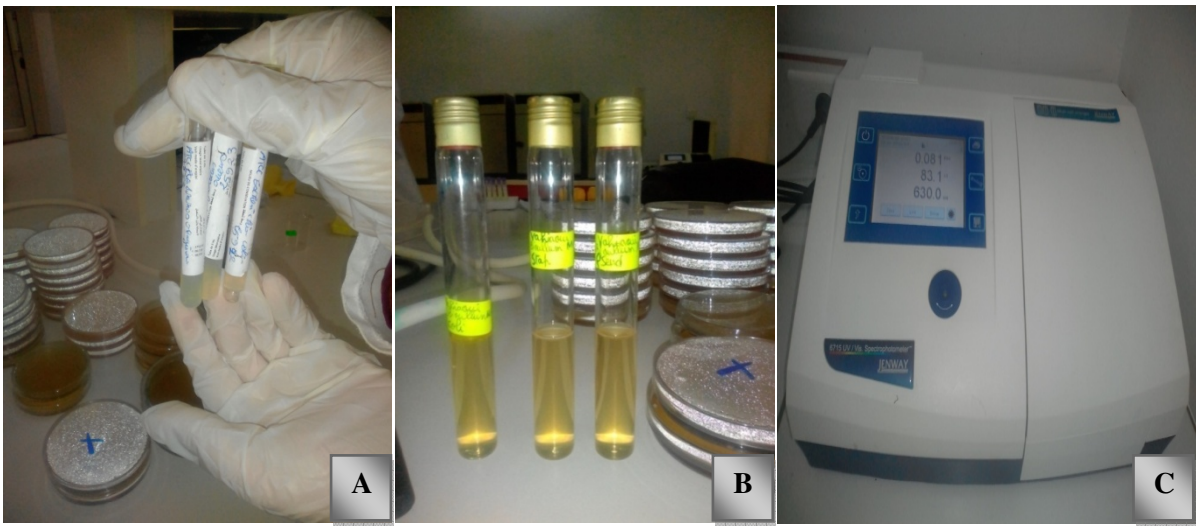


Figure 18 : Préparation des suspensions bactériennes.

A : Les souches de référence ; **B** : Suspensions bactériennes, **C** : Spectrophotomètre.

3.1.3. Préparation des différentes concentrations

Avant d'évaluer l'activité biologique des métabolites secondaires fongiques, la toxicité du solvant peut également être critique. A cet effet, nous avons testé (test control) l'innocuité du DMSO (Diméthyl Sulfoxyde) utilisé pour solubiliser les extraits secs des micromycètes testés. On dissous les résidus précédents dans le DMSO pour obtenir les dilutions **C1 :1/10, C2 :1/50, C3 :1/100.**

3.1.4. Ensemencement et dépôt des disques

L'ensemencement doit se faire en moins en quelques min après la préparation de l'inoculum **(Daouadji, 2010).**

Pour cette étude nous avons testé les métabolites secondaires bruts des champignons suivants : *Penicillium* (*lr sp1, lr sp4, lr sp8, lr sp11*), *Aspergillus flavus* (*lr sp2, lr sp4, lr sp6*), *Aspergillus niger (lr sp9) et Alternaria (lr sp2*).

- La culture se fait dans un milieu stérile en présence de bec bensen.
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne (éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse).
- L'essorer en le pressant fermement, en tournant sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum;
- Frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas;
- Répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de Pétrie de 60° à chaque fois, sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose;
- Des disques de papier Whatman de 6 mm stérile sont imprégnés ensuite dans 50µl de chaque dilution de chaque extrait à étudier puis déposés sur la surface de la gélose Mueller-Hinton préalablement inoculée avec les bactéries. le DMSO a aussi été utilisé en tant que contrôle négatif **(Hazalin et *al.*, 2009).**
- Les boites de pétri sont d'abord laissées pendant 1h à 4°C pour une pré-diffusion des substances, avant d'être incubées à 37°C à l'étuve pendant 24 h.

3.2. Activité antifongique

La production de métabolites antifongiques par les micromycètes étudiées est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar en utilisant le milieu Sabouraud.

3.2.1. Souches choisies

Pour l'étude de l'activité antifongique, nous avons testé les extraits des champignons suivants : *Penicillium* (*lr sp8*), *Aspergillus niger* (*lr sp9*), *Alternaria* (*lr sp2*) contre trois

souches fongiques référenciées qui nous ont été fournies par le laboratoire LRSE *: Penicillium* sp, *Aspergillus flavus* et *Alternaria sp* .

4.3. Inoculum fongique

Les champignons filamenteux de référence sont repiqués sur milieu sabouraud-chloramphénicol et incubés à 27°C pendant 5 jours. Des suspensions denses de spores sont obtenues par addition de l''eau physiologique. Les suspensions sont diluées de manière à obtenir une densité optique à 623 nm comprise entre 0.18-0.20 (environ10^6 spores /ml) **(Bastide et *al.,* 1986).** Les suspensions ainsi obtenues serviront à ensemencer les boites de pétri.

4.4. Mise en évidence de l'activité antifongique

La production de métabolites antifongiques par les micromycètes testés, est mise en évidence par la technique de diffusion sur Agar, en utilisant le milieu Sabouraud-chloramphénicol. L'incubation se fait à 27°C pendant 3 jours. Chaque extrait fongique est testé en utilisant les trois concentrations réalisées précédemment : **C1 :1/10, C2 :1/50, C3 :1/100.** Le DMSO a aussi été utilisé en tant que contrôle négatif **(Hazalin et *al.*, 2009).**

5. Lecture des résultats

La lecture est faite en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition avec une règle graduée. Des témoins de croissance sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais. Tous les essais sont réalisés à triple reprise. L'activité antimicrobienne est considérée comme positive à partir d'un diamètre supérieur à 6 mm **(Parck et *al*., 2006 ; Nath et *al*., 2008 ; Rahmoun, 2009).**

1-Description et illustration des différents genres fongiques

1.1. Penicillium sp. (fig 19)

- **Caractères culturaux**

Ces champignons poussent facilement sur les milieux utilisés en mycologie, mais sont inhibés par le cycloheximide.

Leur croissance est rapide, la colonie est habituellement duveteuse, poudreuse, de couleur variable, le plus souvent verte, mais parfois grise, jaune ou rose. Le revers est incolore ou foncé. Un pigment diffuse parfois dans la gélose.

- **Morphologie microscopique**

• Multiplication végétative

Les hyphes septés, hyalins, portent des conidiophores simples ou ramifiés, parfois regroupés en buisson ou corémie.

Les phialides sont disposées en verticilles à l'extrémité des conidiophores. Elles sont insérées directement (*Penicillium* monoverticillés) ou par l'intermédiaire d'une rangée de métules (*Penicillium* biverticillés) ou de deux rangées successives de métules (*Penicillium* triverticillés) sur les conidiophores. Les phialides sont serrées les unes contre les autres, l'ensemble donne une image de pinceau (ou pénicille).

Les phialides donnent naissance à des spores unicellulaires disposées en chaînes (chaînes basipètes, non ramifiées). Les conidies sont rondes à ovoïdes, hyalines ou pigmentées, lisses ou échinulées, mesurant de 2 à 4 µm de diamètre.

• Reproduction sexuée

Certaines espèces ont une reproduction sexuée (Ascomycètes, famille des *Trichocomaceae*).

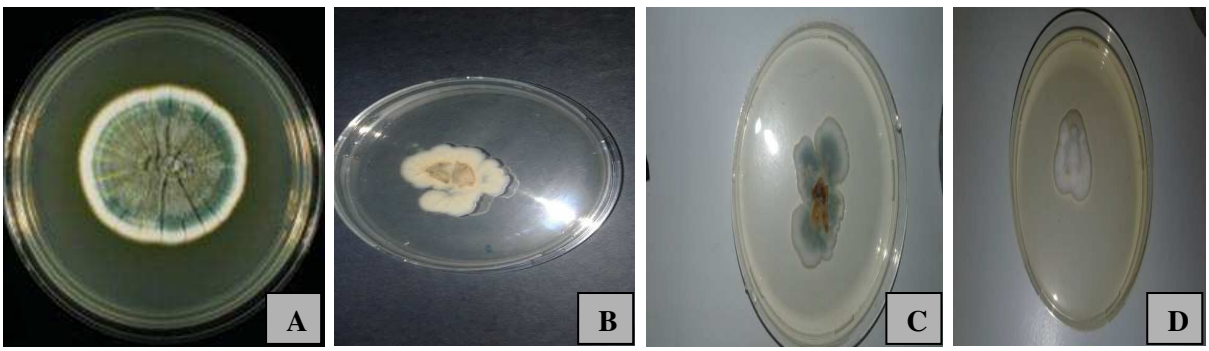


Figure 19 : Observation macroscopique (A, B, C, et D) et (E) microscopique de *penicillium spp.* **GR X400.**

1.2. *Alternaria sp.*

Ce sont des champignons à reproduction asexuée, ils appartiennent au Deutéromycètes. Les colonies sont de croissance rapide, de couleur, blanc-gris au début, deviennent rapidement foncées (vert foncé à noires). La texture est duveteuse à laineuse.

Les *Alternaria* sont des saprophytes ou des parasites de plantes très répandus **(Chabasse et *al.*, 2002).**

- **Caractères culturaux**

Les colonies sont de croissance rapide sur milieu de Sabouraud à 25-30 °C.

La croissance est habituellement inhibée à 37 °C, comme en présence de cycloheximide.

La colonie, blanc-gris au départ, devient rapidement foncée (vert foncé à noire) au recto comme au verso.

La texture est duveteuse à laineuse.

- **Morphologie microscopique**

• Multiplication végétative

Les hyphes, septés, sont ramifiés et tardivement certains filaments sont pigmentés en brun. Les conidiophores sont cloisonnés, bruns, septés, simples ou ramifiés, plus ou moins droits ou flexueux (géniculés).

Les conidies ou porospores sont brunes, pluricellulaires, d'aspect piriforme ou ovoïde, avec une partie basale arrondie et une extrémité apicale allongée en bec plus ou moins important. Ce sont des dictyospores. A maturité, elles présentent à la fois des cloisons transversales, obliques ou longitudinales. Ces spores à paroi lisse ou verruqueuse et de taille importante (50-100 µm x 3-16 µm), sont souvent disposées en chaînes.

En l'absence de bec marqué, c'est la disposition en chaînes des dictyospores qui caractérise le genre *Alternaria*.

• Reproduction sexuée

Les formes sexuées, rarement rencontrées, sont des Ascomycète

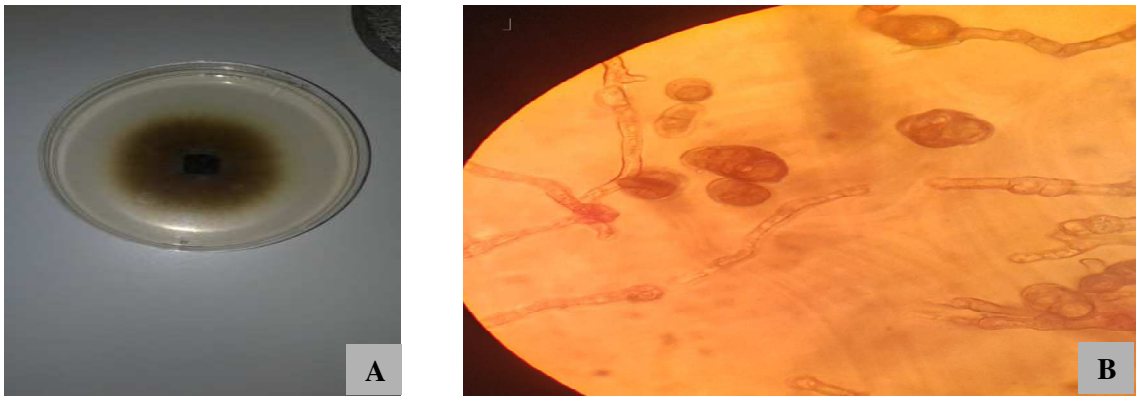


Figure 20 : Observation macroscopique (A) et microscopique (B) d'*Alternaria sp.**GR X400.***

1.3. *Aspergillus sp*

Sont des champignons filamenteux cosmopolites ubiquitaires et pathogènes opportunistes puisqu'ils profitent d'une défaillance naturelle ou iatrogène des systèmes de défense de l'hôte pour devenir pathogènes **(Anofel, 2007).**

Les Aspergillus sont ainsi à l'origine de diverses mycoses : des otomycoses, des kératites, des onyxis, des atteintes cutanées, ou encore des mycoses profondes résultant d'une inoculation traumatique

Caractères culturaux

Les *Aspergillus* présentent une croissance rapide sur les milieux de culture classiques.

Après 24 à48 heures d'incubation, on observe des colonies plates, formées de courts filament aériens, blancs, brune, jaune ou noire selon les espèces. La majorité des *Aspergillus* poussent à 22-25°C ; les espèces thermophiles se développent à 37-40°C est parfois jusqu'à 57°C **(Badillett*al.*, 1987 ; Morin, 1994)** les Aspergillus forment des colonies souvent poudreuses ou granuleuses.

Morphologie microscopique

Les *Aspergillus* sont caractérisés par un appareil végétatif (thalle) à mycélium cloisonné portant de nombreux conidiophores dressés, non ramifiés, terminés en vésicule de forme variable sur la quelle sont disposées les cellules conidiogénes ou phialides. Les phialides

formées directement sur la vésicule (têtes conidiennes unisériées) ouportées sur des métules ou stérigmates (têtes conidiennes colonnes).

Les conidies sèches, disposées en chaines divergentes ou associées en colonnes compactes, sont toujours unicellulaires, globuleuses ou elliptiques, lisses ou ornementées, hyalines ou pigmentées en jaune, vert ou noir **(Botton et *al.*, 1990).**

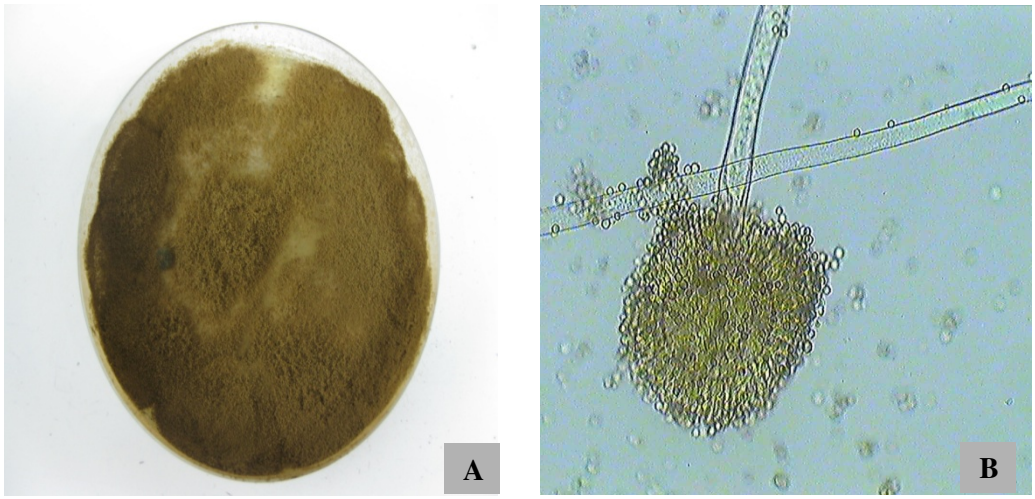


Figure 21 : Observation macroscopique (A) et microscopique (B) d'*Aspergillus flavus.* **GR X400**.

2. Etude de l'activité antimicrobienne

Cette étude vise à mettre en évidence le pouvoir antibactérien et antifongique des métabolites secondaires produits par les micromycètes isolés à partir de deux espèces de poissons de fermes aquacoles. Après la mise en culture, repiquage, identification et préparation des extraits bruts des souches fongiques d'origine marine, nous avons retenu : 9 souches : *Penicillium* (*Pen* lr sp1, *Pen* lr sp4, *Pen* lr sp8 et *Pen* lr sp11), *Aspergillus niger (Asp n* Ir sp9), *Aspergillus flavus* (*Asp f* Ir sp2, *Asp f* Ir sp4 et *Asp f* Ir sp6) et *Alternaria* (*Alt.lr.* sp2) isolés pour les biotests.

2. 1. Poids des extraits obtenus pour chaque souche

L'ensemble des souches provient du laboratoire **LRSE**. Après préparation des cultures fongiques, et extraction à l'Acétate d'Éthyle, nous avons obtenu les poids secs des différentes substances et qui sont regroupés sur le tableau.

Nous pouvons déterminer le rendement en extrait sec en utilisant la formule suivante :

P = [P1 - P2].

P1 : Poids du ballon après évaporation.

P2 : Poids du ballon avant évaporation (ballon vide).

P : Poids des extraits.

Tableau 4 : Le poids des extraits obtenus pour chaque souche.

Les souches fongiques	Poids secs (mg)
Penicillium sp1	4 mg
Penicillium sp 4	5 mg
Penicillium sp 8	18 mg
Penicillium sp11	3 mg
Aspergillus flavus	3 mg
*Aspergillus f s*p 4	9 mg
Aspergillus f sp 6	10 mg
Aspergillus n sp 9	50 mg
Alternaria sp2	23 mg

2. 2. Evaluation de l'activité antibactérienne

Nous avons étudié in vitro le pouvoir antibactérien des substances libérées par des micromycètes marins par la technique des disques de diffusion sur agar contre trois souches bactériennes pathogènes de référence qui nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de l'Hôpital de Pédiatrie « Kanastel » Oran, puis conservées à 4 °C jusqu'à l'utilisation.

- *Staphylococcus aureus* **(ATCC 25923).**
- *Pseudomonas aeruginosa* **(ATCC 27853).**
- *Escherichia coli* **(ATCC25922).**

Le choix de ces bactéries s'est porté sur leurs fréquences en pathologie humaine, appartenant à deux catégories différentes (Gram + et Gram -). Ces trois espèces bactériennes sont responsables souvent d'infections nosocomiales, qui constituent un problème majeur de santé

publique. L'émergence de la multi- résistance chez ces bactéries est une des principales causes d'échec thérapeutique.

Pour évaluer cette activité, nous avons opté pour la méthode de diffusion sur gélose. Les valeurs exprimant les diamètres des zones d'inhibition sont regroupées sur le tableau 5.

Tableau 5 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches (diamètres en mm).

Bactéries / **Substances Fongique**	***Escherichia coli* (ATCC 25922)**				***Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)**				***Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)**			
Concentrations	**C1**	**C2**	**C3**	**T**	**C1**	**C2**	**C3**	**T**	**C1**	**C2**	**C3**	**T**
Penicillium (***Pen*.lr. *sp* 1**)	**10**	**10**	**10**	**0**	**6**	**(- 6)**	**(- 6)**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Penicillium (***Pen*.lr. *sp* 4**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**(- 6)**	**0**	**0**	**(- 6)**	**0**	**(- 6)**	**0**
Penicillium (***Pen*.lr. *sp* 8**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**20**	**(- 6)**	**20**	**0**	**20**	**30**	**25**	**0**
Penicillium (***Pen*.lr. *sp* 11**)	**(-6)**	**15**	**6**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Alternaria (***Alt*.lr. *sp* 2**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Aspergillus flavus (***Asp.f*.lr *sp* 2**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**(-6)**	**0**	**0**	**0**
Aspergillus flavus (***Asp .f*.lr *sp* 4**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**(-6)**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Aspergillus flavus (***Asp .f*.lr *sp* 6**)	**0**	**0**	**0**	**0**	**(-6)**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**
Aspergillus niger (***Asp.n.lr. sp 9***)	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**25**	**0**	**0**	**0**

= 6mm : activité négative,> 6mm : activité positive

L'activité antibactérienne de nos produits est estimée en termes de diamètre de la zone d'inhibition autour des puits contenant les substances à tester vis-à-vis de trois germes pathogènes d'origine hospitalière (*Escherichia coli, Staphylococcus aureus,* et *Pseudomonas aeruginosa*) après 24°C d'incubation à une température adéquate de 37°C.

2.1.1. *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Les résultats des diamètres des zones d'inhibition révèlent qu'*Escherichia coli* apparait sensible vis-à-vis des substances testés de *Penicillium (**Pen**.**lr. sp11**)* à la concentration C 2 :(1/ 50).

Escherichia coli développe des zones d'inhibition moyennement importantes vis-à-vis des substances produites par *Penicillium (**Pen**.* **lr.** ***sp 1**)* à toutes les concentrations C1 :(1/ 10), C2 :(1/50) et C3 :(1/100) et *Penicillium (**Pen**.* **Lr.** ***sp 11***) à la concentration C3 :(1/100).

Les diamètres des zones d'inhibition varient entre (- 6 et 15) mm pour *Escherichia coli* (Fig. 23).

La résistance de cette bactérie est confirmée par l'absence totale de toute zone d'inhibition vis-à-vis des produits de *Penicillium (**Pen***.**lr.** ***sp* 4***), Penicillium* (***Pen***.**lr.** ***sp* 8***)* et *Alternaria* (**Alt.lr.** ***sp 2**),* et *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir.** ***sp 2*),** *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir.** ***sp 4*),** *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir.** ***sp 6*) et** *Aspergillus niger* ***(Asp.n.Ir. sp 9)*** aux différentes concentrations C1, C2 et C3.

2.1.2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* (Fig. 23) traduit l'action antibactérienne des substances de *Penicillium (**Pen***.**lr.** ***sp 8**)* aux différentes concentrations C1, C2 et C3 par une zone d'inhibition variant de (20 à 30) mm et *Aspergillus niger* ***(Asp.n.Ir. sp 9)*** à *la* concentration C1 (Tableau 5).

Cette bactérie n'a montré aucune zone d'inhibition vis-à-vis de *Penicillium (**Pen***.**lr.** ***sp* 1),** *Penicillium (**Pen***.**lr.sp11),** *Alternaria (**Alt***.**lr.** ***sp* 2***), Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir.** ***sp 4*),** *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir.** ***sp* 6)** aux différentes concentrations C1, C2 et C3, et *Aspergillus niger* ***(Asp.n.Ir. sp 9)*** à deux concentrations C2 et C3.

2.1.3. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

La sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* **(Fig. 22**) traduit l'action antibactérienne des substances de *penicillium (**Pen**.***lr. sp 8)*** aux différentes concentrations C1et C3 par une zone d'inhibition de (20) mm (Tableau 5).

Le tableau 5, montre que cette souche bactérienne pathogène s'est révélée résistante presque à toutes les substances testées aux différentes concentrations.

Le DMSO a été testé comme contrôle négatif, les résultats montrent que le solvant ne présente aucun effet sur la croissance des souches bactériennes.

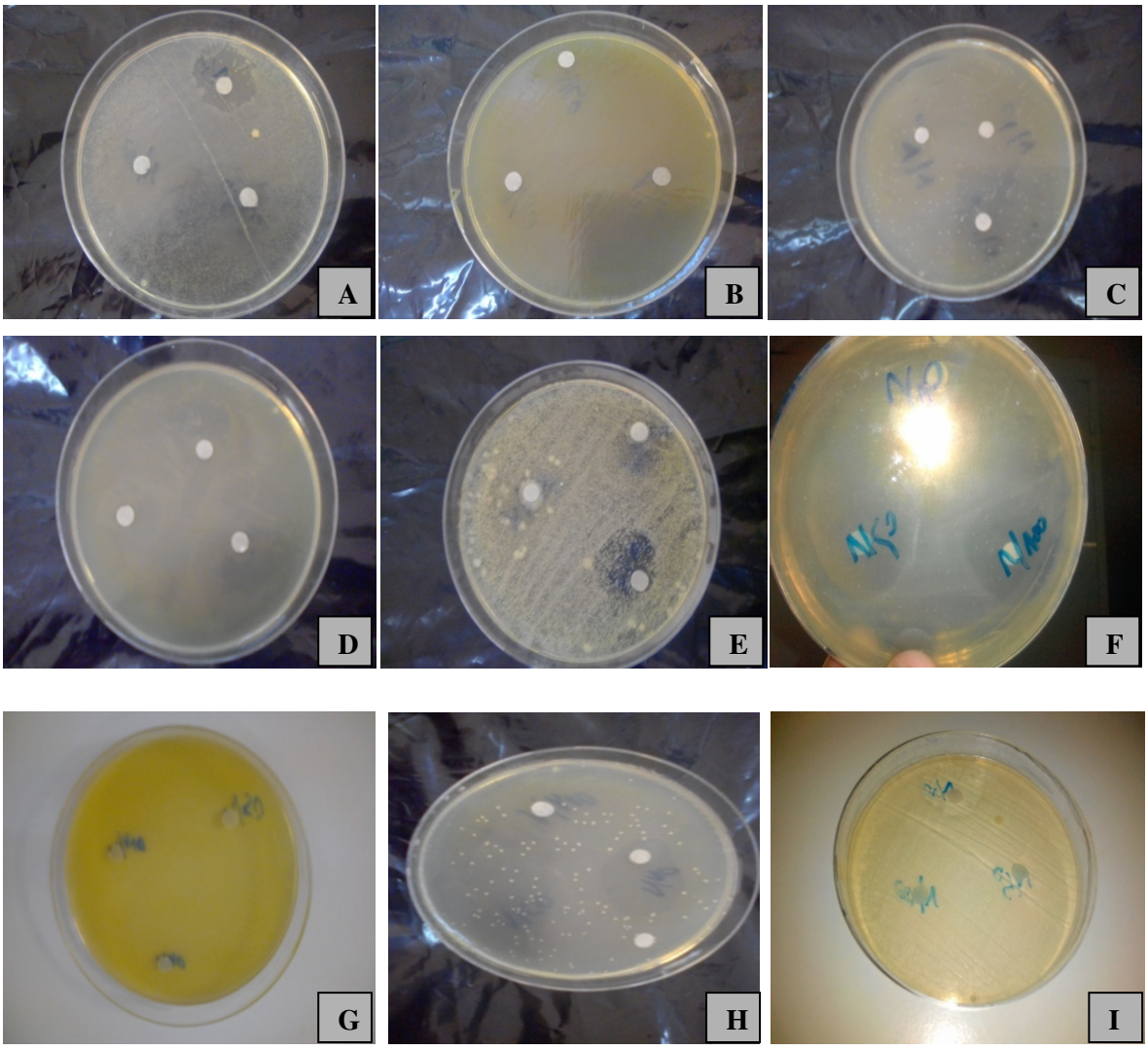


Figure 22: Activité antibactérienne.

(A*: (Pen.*lr. *sp 8)/ Pseudomonas aeruginosa* C1 :(1/ 10); B*:* (*Asp.f.*Ir *sp 2*) / Escherichia *coli* C1 :(1/ 10); C *:(Pen.lr. sp 4)/ Escherichia coli* C2 :(1/ 50); *D: (Pen. lr. sp8 / Staphylococcus aureus* C2 :(1/ 50) et C3 :(1/ 100); *E:* (*Pen.*Ir *sp 1*) / Escherichia *coli* C2 :(1/ 50); *F: (Pen* .lr.*sp 8)*/*Staphylococcus aureus* C1 :(1/10) et C3 :(1/ 100); *G:* (*Asp.f.*Ir *sp 4*) / *Pseudomonas aeruginosa* C3 :(1/ 100); *H: Alternaria (Alt.lr.sp2) / Escherichia coli* C2 :(1/ 50); *I: (Asp.n.Ir. sp 9)/ Pseudomonas aeruginosa* C1 :(1/ 10).

2.3. Evaluation de l'activité antifongique

Pour cette étude nous avons testé les métabolites secondaires des champignons suivant : *Penicillium* (***Pen*.lr. *sp 8***), *Alternaria* (***Alt*.lr. *sp 2***) et *Aspergillus niger* ***(Asp n.Ir.sp 9)*** isolés à partir des poissons de fermes aquacoles contre trois souches fongiques référenciées qui sont : *Penicillium* (***Pen*.lr.*sp* 1**), *Alternaria* (***Alt*.lr.*sp*)** et *Aspergillus flavus* ***(Asp f.Ir. sp 6)***. Les résultats des zones d'inhibition sont reportés sur le tableau 6.

Tableau 6 : Activité antifongique

Champignons testés / Substances Fongiques	*Penicillium* (***Pen*.lr. *sp 1***)				*Alternaria* (***Alt*.lr.*sp***)				*Aspergillus flavus* ***(Asp.f.Ir. sp 6)***			
Concentrations	C1	C2	C3	T	C1	C2	C3	T	C1	C2	C3	T
Penicillium (***Pen*.lr. *sp* 8**)	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
Alternaria (***Alt*.lr. *sp 2***)	0	(-6)	0	0	0	(-6)	0	0	0	0	0	0
Aspergillus niger ***(Asp.n.Ir.sp 9)***	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Penicillium ***(Pen*.lr. *sp 1*)** et *Alternaria* (***Alt*.lr. *sp*)** **(Fig. 24)** ont présenté une **sensibilité moyenne** aux substances libérées par le *Penicillium* ***(Pen*.lr. *sp 8*)*** à la concentration C1, avec une zone d'inhibition variant de 10 mm.

Aspergillus flavus ***(Asp.f .Ir. sp 6)*** c'est montré aussi moyennement sensible au *Penicillium* ***(Pen*.lr. *sp 8*)*** à la concentration C1.

Penicillium (***Pen*.lr. *sp 1*)**, *Alternaria* (***Alt*.lr.*sp*)** et *Aspergillus flavus* ***(Asp.f.Ir. sp 6)*** résistent aux substances libérées par *l'Aspergillus niger* ***(Asp.n.Ir. sp 9)*** aux différentes concentrations.

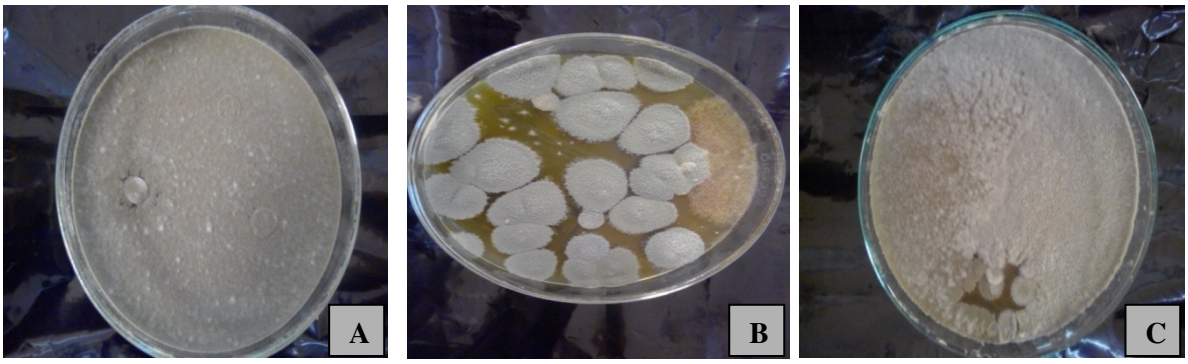


Figure 23: Activité antifongique.

A : *(Asp.f.Ir. sp 6) / (Alt.Ir. sp 2)/C3; (Pen.*lr. *sp* 1*)/ (Pen.*lr. *sp 8)C1 ; (Alt.*lr.*sp 2)/ (Asp.n.Ir.sp 9) C1.*

Discussion

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires, ils peuvent montrer des productions impressionnantes mais leurs produits peuvent aussi avoir une grande importance commerciale.

La recherche de nouveaux composés bioactifs à partir des organismes marins ont abouti à l'isolement d'environ 10000 métabolites, dont beaucoup ont des propriétés pharmacologiques.

Cette étude a visé principalement à la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits bruts des champignons issus de poissons d'aquaculture contre les bactéries pathogènes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa (*ATCC 27853) et *Escherichia coli (ATCC25922)* résistantes aux antibiotiques actuellement utilisés dans la pratique clinique. Cette activité a été aussi testée vis-à-vis de trois champignons : ***Penicilliums* sp 1. *Aspergillus flavus*** et *Alternaria* **sp .**

La comparaison des résultats obtenus démontre que la capacité antibactérienne est variable d'une souche à une autre et d'un extrait à un autre et à leurs concentrations. Une activité antibactérienne importante est enregistrée sur *S. aureus* (Gram+) que sur *Pseudomonas aeruginosa et E.coli* (Gram-) avec des zones d'inhibition allant de (20-30) mm, 20 mm et (10-15) mm respectivement.

S.aureus s'est montré fortement sensible à des extraits de deux champignons (***Pen*.lr. *sp* 8***)*** et ***(Asp.n.lr. sp 9)***, *E.coli* est moyennement sensible à deux extraits fongiques (***Pen*.lr. *sp* 1***)*** et (***Pen*.lr. *sp* 11**, alors que *Pseudomonas aeruginosa* est sensible uniquement à un seul extraits (***Pen*.lr. *sp* 8***)***.

Ceci peut s'expliquer que les bactéries à Gram(-) sont plus résistantes que les bactéries à Gram (+) et ce grâce à la structure de leur membrane externe. Les bactéries Gram (-) sont dotées d'une couche de peptidoglycane coincée entre la membrane plasmique et l'assise externe composée de lipo-polysaccharides et de protéines et constituerait ainsi une barrière imperméable aux substances. Pour les bactéries Gram (+), la couche peptidoglycane se situe à l'extérieur et leur permet, donc, d'être plus disponibles à entrer en contact avec les composés actifs **(Fertout-Mouri et *al*., 2016)**.

Selon Botton et *al*. (1990), ces 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 Kacem-chaouche, 1992).**

La sensibilité de *Staphylococcus aureus* en présence des métabolites secondaires fongiques a été confirmée aussi par **Swathi (**2013) en étudiant l'activité antibactérienne des extraits bruts de la souche *Microascus sp.*

Nos résultats s'accordent également avec ceux de Abdelaziz en 2006 qui a testé et trouvé un fort effet antibactérien des espèces du genre *Aspergillus* et *Penicillium* vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*.

Le *Staphylococcus aureus* est la cause d'un grand nombre d'infections sévères, telles que les septicémies, les endocardites, les pneumonies, les infections des tissus mous, des os et des articulations. Malgré un traitement approprié, la mortalité due à ces infections à Staphylocoques dorés reste élevées elles atteignent (20 à 30 %). Aujourd'hui, 90 % des souches de *Staphylococcus aureus* sont non seulement résistantes à la pénicilline G mais aussi aux pénicillines à large spectre **(Carbon et *al*., 1991).** En Algérie, le taux de résistance à la pénicilline G est d'environ 12,5 % (**Smati et *al.,*1994**). Les pourcentages de résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM) étaient les plus élevés dans les pays du Sud de l'Europe (la Grèce 44 %, l'Italie 38 %, le Portugal 38 %, la France 33 % et l'Espagne 23 %). Comparé à 2001, les pourcentages de SARM en 2002 étaient demeurés identiques pour la France mais avaient augmenté (de 19 à 22 %) pour l'ensemble de ces pays.

En effet, il est connu que les genres *Aspergillus* et *Penicillium* constituent le réservoir principal de ces substances **(Botton et *al*., 1990)**.

D'après nos résultats, le genre *Penicillium* apparait le producteur le plus important de molécules bioactives avec trois espèces sur quatre espèces testées, soit 75%, suivi par le genre *Aspergillus* (1 seule espèce productrice de molécules bioactives sur quatre, soit 25%).

Les extraits produits par l'espèce de *Penicillium* (*Pen* lr *sp8*) se sont révélés les plus actifs contre deux bactéries : (Gram +) et (Gram -), mais aussi sur les trois souches fongiques testées, donc elle a un effet antibactérien et antifongique en même temps.

Calamita et Doyle en 2002, explique le mécanisme d'action des β-lactamines (produites par le genre *Penicillium*) qui exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier, le blocage de la multiplication est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane sera donc dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne.

Certains champignons dérivés d'éponges peuvent être opportunistes et contribuer à des lésions ou des maladies **(Li et Wang, 2009).** Ces champignons produisent également souvent des composés bioactifs, qui peuvent être supposés contribuer à la défense de l'hôte (**Holler et *al*., 2000 ; Han et *al.,* 2009 ; Thirunavukkarasu et *al.,* 2011).**

En ce qui concerne le genre *Alternaria*, une étude réalisée par Lajdel (2012) a montré que ce genre a un effet moyen sur *E. coli* d'une part, et une activité bactérienne nulle sur *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* d'autre part.

L'usage intensif des antibiotiques, surtout en milieu hospitalier, a conduit aussi à une sélection fréquente de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, résistante à la majorité des antibiotiques (**Véron, 1990**). L'utilisation importante de la ciprofloxacine a été associée à une baisse de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

D'après les résultats obtenus dans notre étude, il est très probable que les champignons isolés à partir de deux espèces de poissons d'aquaculture, offrent de nouvelles molécules bioactives qui agissent sur les bactéries résistantes en question.

En Algérie et par tout dans le monde, les médicaments traditionnels sont utilisés pour traiter les maladies chroniques et aigues, dans les zones rurales et urbaines.

Si les principes actifs extraits de micromycètes utilisés en pharmacie sont peu nombreux, l'utilisation des micromycètes à des thérapeutiques est loin d'être un phénomène nouveau. Les travaux scientifiques en cours sont importants.

L'intérêt pour les thérapeutiques traditionnelles n'est pas nouveau, mais il s'est accru ces dernières années du fait des progrès introduits notamment grâce aux nouvelles stratégies incluant des disciplines nouvelles telles que : l'ethnopharmacologie, les criblages biologiques robotisés et l'accès aux bases de données bibliographiques, et du renouveau d'intérêt pour les ressources renouvelables et pour la médecine traditionnelle.

Les métabolites secondaires ayant une activité antibiotique contre les agents pathogènes résistants aux antibiotiques sont actuellement utilisés dans la pratique clinique**.**

La microbiologie est qualifiée aujourd'hui de participant majeur dans plusieurs industries.

Dans la présente étude, nous avons extrait et stocké les substances brutes de neuf souches fongiques issue de poissons d'aquaculture: *Penicillium (**Pen.*lr. *sp1), Penicillium (*Pen. lr. sp4*), Penicillium (**Pen.*lr. *sp8), Penicillium (**Pen.*lr. sp11*), Alternaria (**Alt.* lr. *sp2*), Aspergillus flavus* **(*Asp. f.*Ir *sp2*),** *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir *sp4*),** *Aspergillus flavus* **(*Asp .f.*Ir *sp6*)** et *Aspergillus niger* ***(Asp.n. Ir. sp9)*** et cela dans le but de la mis en évidence de leurs pouvoirs antibactérien et antifongique. Dans contexte, nous pouvons souligner l'importance des résultats obtenus cités ci-après :

-Escherichia coli apparait sensible vis-à-vis des substances testés de *Penicillium* (***Pen.*lr. *sp* 11***)*** à la concentration C2 :(1/50), moyennement importantes vis-à-vis des substances produites par *Penicillium (**Pen.*lr. *sp* 1***)*** à toutes les concentrations C1 :(1/10), C2 :(1/50) et C3 :(1/100) et *Penicillium (**Pen.*lr. *sp* 11***)*** à la concentration C3 :(1/100).

-La sensibilité de ***Staphylococcus aureus*** traduit l'action antibactérienne des substances de *Penicillium (**Pen.*lr. *sp* 8***)*** aux différentes concentrations C1, C2 et C3 et *Aspergillus niger **(Asp.n. Ir.sp 9)*** à *la* concentration C1.

- La sensibilité de ***Pseudomonas aeruginosa*** traduit l'action antibactérienne des substances de *Penicillium (**Pen.*lr. *sp* 8***)*** aux différentes concentrations C1et C3. Cette souche bactérienne pathogène s'est révélée résistante à la majorité des substances testées aux différentes concentrations.

En ce qui concerne l'activité antifongique nous notons que :

-*Penicillium* ***(Pen*.lr. *sp1*),** *Aspergillus flavus* ***(Asp.f .Ir. sp 6)*** et *Alternaria (**Alt.*lr. ***sp*** *)* ont présenté une **sensibilité moyenne** aux substances libérées par le *Penicillium* ***(Pen*.lr. *sp* 8)** à la concentration C1, par contre elles sont totalement résistantes aux extraits bruts de l'*Aspergillus niger* ***(Asp.n.Ir.sp 9)*** et à l'*Alternaria (**Alt.*lr. ***sp* 2)** à toutes les concentrations.

A travers ce travail, le genre *Penicillium* apparait le producteur le plus important de molécules bioactives avec trois espèces sur quatre espèces testées, soit 75%, suivi par le genre *Aspergillus* (1 seule espèce productrice de molécules bioactives sur quatre, soit 25%).

Les extraits produits par l'espèce de *Penicillium* (*Pen* lr *sp8*) se sont révélés les plus actifs contre deux bactéries : (Gram +) et (Gram -), mais aussi sur les trois souches fongiques testées, donc elle a un effet antibactérien et antifongique en même temps.

De ce la on peut dire que le *Penicillium* et l'*Aspergillus niger* peuvent être utilisés comme de bons modèles pour des futures investigations.

Au terme de ce travail, il sera intéressant de compléter et de développer le sujet par les études suivantes.

- Une étude plus approfondie de la biodiversité fongique des différents organismes marins et d'aquaculture.
- Une identification moléculaire des souches obtenues.
- La recherche d'autres espèces fongiques marines productrices des métabolites d'intérêt industriel et biotechnologique (Enzymes, antibiotiques….etc.)
- Traverser l'ère de d'étude des inventaires de la faune et de la flore marine vers l'ère des molécules thérapeutiques d'origine marine.
- Extraction et caractérisation des composés actifs par des méthodes plus spécifiques.

- **Agag B.I. 2004**. Mycotoxins in foods and feeds 3-Zearalenone.Ass. *Uni. Bull. Environ.Res.* (7):2.
- **Agrios G.N. 1994.** Plant pathology. 4ème édition. Academic Press. New York. PP 60-75.
- **Anofel (Association française des Enseignants de Parasitologie).2007**. Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales. Ed. Masson, paris .321p.
- **Aureli P., Costantini A. et Zolea S. 1992**. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect,* **55**, 344-348.
- **Bachar M.F. 2004.** Evaluations de la biomasse fongique du sol dans quelques stations de la région de Ouargla .Thèse magistère .agro .université d'Ouargla. 19P.
- **Baldauf S. L. 1999**. A search for the origins of animals and fungi: Comparing and combining molecular data. *American Naturalist*. 154: S178-S188.
- **Baldauf S. L., Palmer J. D. 1993**. Animals and fungi are each other's closest relatives: Congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 90: 11558-11562.
- **Bar-Hen A., Mariadassou M., Poursat M.A., Vandenkoornhuyse P. 2008**. Influence function for robust phylogenetic reconstructions. *Molecular Biology and Evolution*. 25:869–873.
- **Bastide A.,M.de Méo.,M Andriantsoa., M Laget et G Duménial.1986**. Isolement et sélection de souche d'actinomycètes productrice de substance antifongiques de structure non-polyénique.laboratoire de microbiologie .faculté de pharmacie .MIRCEN journal , 2, p 453-466.
- **Bdillet G ., De brieve C., Gueho E .1987.** Champignons contaminants des cultures, champignons opportunistes, Atlas clinique et biologique. Ed .VARIA, paris.
- **Belyagoubi L. 2006 .**Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Mémoires en vue de l'obtention du diplôme du magistère en biologies université A boubeki bel Kaid P : 12-15.
- **Bhatnagar D., Ehrlich K. C., & Cleveland T. E. 2003.** Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61, 83-93.
- **Boiron P. 1996.** Organisation et biologie des champignons. Edition Nathan. P : 13-19-69-79.

- **Botton B ., Beton A ., Fevre M., Gauthier S ., Guy P ., Larpent J.P ., Reymond P. Sanglier J.J., Vayssiery Y ., Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importance industrielle. 2 ème édition. Masson .Collection Biotechnologies .P : 34-428.
- **Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssie Y. & Veau P. 1999.** Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson. Paris. P : 12-426.
- **Boubekri C. 2014.** Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat en sciences Spécialité Chimie. Université Mohamed Khider – Biskra. P : 29_51.
- **Bouchet PH., Guignard J.L. et Villard J. 1999.** Les champignons. Mycologie fondamentale et appliquée. Edition Masson. 194p.
- **Bourgeois C.M., Mescle J.F., Zucca J. 1989**. Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P : 216-244.
- **Bousseboua H. 2003.** Cour de microbiologie générale. Protistes eucaryotes. Edition Université Mentouri Constantine. P : 9-13.
- **Bramki M et Nekia A. 2016.** Recherche des métabolites secondaires du champignon Algérien *Pleurotus eryngii* et évaluation de leur activité antibactérienne. Mémoire de Master. Edition Université des Frères Mentouri Constantine. p 17-79.
- **Brisabois A., Lafarge V., Brouillaud A., Buyser M L., Collette C., Garin-Bastuji B., Thorel MF**. **1997.** Les germes pathogènes dans le lait et les produits laitiers: situation en France et en Europe. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz,vol. 16(1) .pp 452-471.
- **Brisou J. 1975.** La microbiologie du milieu marin : Les levures et les champignons du milieu marin. Paris : Flammarion Médicales (collection de l'institut Pasteur), , pp 159-162, 271 p.
- **Brochard G et Le Bâcle C. 2009.** Les mycotoxines en milieu de travail. Documents pour le Médecin du travail N°119. INRS *Mycotox. Res*. p: 1-11.
- **Bullerman L. B., Bianchini A. 2007.** Stability of mycotoxins during food processing, International Journal Food Microbiology 119, 140-146.
- **Calamita H. G. and Doyle R. J., 2002**. Regulation of autolysins in teichuronic acid-containing Bacillus subtilis cells. Mol. Microbiol. 44, 601-606
- **Calvo A.M., Wilson R.A., BockJ.W and Keller N.P**. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development.*Microbiol.Mol.Bio.Rev.* **66** : 447-459.

- **Campbell A. 1995**. Biologie. Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Québec. 1254 p.
- **Carbon C., Pocidalo J.J.and Cremieux A.C.(1991).** Les inhibiteurs des β- lactamase. Journée de pharmacologie clinique U.E.R Xavier BICHAT, Paris, France. Edition Arnette., 103. 120- PORTO A. L. F., AMPOS-TAKAK
- **Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. 2002.** Les mycotoxines : contaminants omniprésents dans l'alimentation animale et humaine, dans *La* sécurité alimentaire du consommateur, Lavoisier, Tec&Doc.
- **Cuomo V., Palomba I., Perretti A., Guerriero A., D'Ambrosio M., & Pietra F. 1995.** Antimicrobial activities from marine fungi. J. Mar. Biotechnol., 2 : 199-204.
- **Das B.K., Pradhan J., Pattnaik P., Samantaray B.R. et Samal S.K. 2005**. Production of antibacterials from the freshwater alga *Euglena viridis* (Ehren). *World J. of Microbiol. Biot.*, **21**, 45-50.
- **Davet P. 1996.** Vie microbienne du sol et production végétale. INRA. Paris. P : 52-57.
- **Davet P., and Rouxel F. 1997**. Detection et isolation des champignons du sol. *INRA*. Paris P : 17-54.
- **Delgado-Jarana J., Rincon A. M. et Benitez T. 2002.** Aspartyl protease from Trichoderma harzianum CECT 2413. Cloning and characterization. Microbiology. 148: 1305-1315.
- **Després J. 2012**. L'univers des champignons. Les Presses de l'Université de Montréal. Canada. 375p.
- **Dommergues Y. Mangenot F. 1970.** écologie microbienne du sol .Masson et Cie, Paris.796. pp9- 72.
- **Elidemir O., Colasurdo G.N., Rossmann S.N., Fan L.L. 1999.** Isolation of *Stachybotrysen* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. Pediatrics 104, 964-966.
- **Encarta. 2005.** Microsoft corporation 1993-2004.
- **Esteban A., Abarca M.L., Bragulat M.R., Cabañes F.J. 2004.** Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black aspergilli. Research in Microbiology 155, 861-866.
- **Fenical W. & Jensen P. 1997**. Marine fungi: A developing focus in marine natural products chemistry. Euroconference on marine natural products (1 ; 1997 ; Athènes) Athènes : novembre, 2-6.

- **Florent J.1993.** Microbiologie industrielle, Les microorganisme d'intérêt industriels. Ed.Lavoisier Tec et Doc.612p.
- **Fournier ET Bonderf. 1983.** Les produits antiparasitaires à usage agricole (conditions d'utilisation). 316p.
- **Frazier W.C. 1967.** Food microbiology. Academic presse. London. P : 3-429.
- **Frémy J.M., Grosso F., Dragacci S. 2005.** Analyse et détection de mycotoxines. Techniques de l'ingénieur.
- **Garcia S. 2009.** Propriétés thérapeutiques des champignons comestibles. La phytothérapie européenne. **52** : 11-15.
- **Geacintov Nicholas E and Broyde S. 2011.** The chemical biology of DNA damage.Wiley-VCH;p: 471.
- **Giraud J. 1998.** Microbiologie alimentaire. Edition Donod, Paris. P : 8-101.P : 330.
- **Goldman E.L., Green H. 2008.** Practical Handbook of Microbiology, Second Edition. CRC Press, 864 p.
- **Guessoum D. 2015.** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes Chez *Urtica dioica L.* et évaluation de leur pouvoir antibactérien. Mémoire de master, université de Constantine 1.p :40.
- **Harrar A.E.N. 2012.** Activités antioxydante et antimicrobienne d"extraits de *Rhamnus alaternus* L. Thèse de Magister Biochimie et physiologie expérimentale, Université Ferhat Abbas, Sétif. Algérie.73 p.
- **Hazalin N., Ramasamy K., Lim S., Wahab I., Cole L. and Abdul Majeed A. 2009.** Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. BMC Complementary and Alternative Medicine.p: 46.
- **Hughes G., C. 1975.** Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. 1. Lignicolous, Caulicolous and Foliicolous species. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., , 13 : 69-180.
- **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.
- **Hyghly E., Enright E.J., Banks H.J. et Champ B.R.1994.** Stored product Protection. Proceeding of the international working conference on Stored Product Protection.Volume 2. CAB International. Canberra. pp969-1083.

- **James T.Y., Kauff F., Schoch C.L., Matheny P.B., Hofstetter V., Cox C.J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H.T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A.E., Amtoft A., Stajich J.E., Hosaka K., Sung G.H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J.M., Slot J.C., Wang Z., Wilson A.W., Schüßler A., Longcore J.E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P.M., Powell M.J., Taylor J.W., White M.M., Griffith G., Davies D.R., Humber R.A., Morton J.B., Sugiyama J., Rossman A.Y., Rogers J.D., Pfister D.H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R.A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R.A., Serdani M., Crous P.W., Hughes K.W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W.A., Lücking R., Büdel B., Geiser D.M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D.S., Lutzoni F., McLaughlin D.J., Spatafora J.W., Vilgalys R. 2006.** Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*. 443: 818-822.
- **James T.Y., Porter D., Leander C.A., Vilgalys R., Longcore J.E. 2000**. Molecular phylogenetics of the Chytridiomycota supports the utility of ultrastructural data in chytrid systematics. *Canadian Journal of Botany*. 78: 336-350.
- **Jeffery S ., Gardi C., and Jones A .2013.** Atlas Européen de la biodiversité des sols. Publications Office p : 90-95.
- **Jennings D.H, LysekG. 1996.** Fungal Biology: understanding the fungal lifestyle. Bios Scientific publishers eds.
- **Keller N.P.and Woobok J**. **2005.** Aglobal regulatory of secondary metabolite biosynthesisin fungi, (edn) Warfe.
- **Kerfez K., Brik O. 2015.** Culture et clonage d'un tissu de champignon de paris (*Agaricus bisporus*) .mémoire de master. Université constantine1.
- **Khudyakova Y.V., Pivkin M.V., Kuznetsova T.A., & Svetashev V.I. 2000.** Fungi in sediments of the sea of Japan and their biologically active metabolites. Microbiology, 69 (5) : 722-726.
- **King L. A., E. Loukiadis P., Mariani-Kurkdjian S., Haeghebaert F. X., Weill C., Baliere S., Ganet M., Gouali V., Vaillant N., Pihier H., Callon R., Novo O., Gaillot D., Thevenot-Sergentet E., Bingen P., Chaud and H. de Valk. 2014.** Foodborne transmission of sorbitol-fermenting Escherichia coli 150 O157: [H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. Clinical Microbiology and Infection. 20 (12):O1136-1144.

- **Kohlmeyer J. & kohlmeyer E. 1979**. Marine mycology: the higher fungi. New York: Academic press, 689 p.
- **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.
- **Krska R. 2009.** Mycotoxins. *Anal Bioanal Chem*. p: 1203–1204.
- **Kurtzman C.D., Horn B.W., Hesseltine C.W. 1987.** *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology* 53, 158-174.
- **Labbé Ronald G., García S. 2001.** Guide to food borne pathogens.Wiley; p : 400 .
- **Larpent-Gourgaud M. & Sanglier J. J. 1992.** Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin. Paris. P. 574-587.
- **Ladjel S. 2012.** Activité antimicrobiennes des métabolites secondaires des champignons endophytes isolés du pin d'Alep (Pinus halepensis Mill) de la région de M'sila. Mémoire de Magister. 101p.
- **Le Bars J., Le Bars P. 1987**. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section MidiPyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987.
- **Lecellier A. 2013.** Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle, docteur de l'universite de reims champagne-ardenne p, 17-196.
- **Leclerc F.C., Papon N., Noel T., Villard J. 2005.** Moisissures et risques alimentaires (Mycotoxicoses). Revue Francophone des Laboratoires. p : 61-66.
- **Leveau S. B. & Bouix M. 1993.** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Lavoisier. Paris. P : 216-244.
- **Leyral G ., Figarella J. , Terret M.. 1998.** Microbiologie TOME 2. Microbiologie appliquée . Editions Jacques Lanore – Henri Laurens .pp 24.
- **Liberra K. & Lindequist U. 1995.** Marine fungi – A profilic resource of biologically active natural products. Pharmazie, 50 : 583- 588.
- **Makkar S., Siddhuraju P Et Becker K. 2007.** Plant Secondary Metabolites, Methods in Molecular Biology; Ed: Humana Press. **393**: 67- 111.

- **Mirete S., Pation B., Vazquez C., Jimenez M., Hinojo M.J., Soldevilla C and Gonzalez- Jaen, M.T. 2004.** Fumonisin production by *Gibberella fujikuroi* strains from Pinus species. *Inter J F Microbiol*. p: 213–221.
- **Mohseni M., Norouzi H., Hamidi J., Rouhi A**. **2013.** Screening of antibacteriel producing actinomycetes from sediments of the caspian sea . IGMCM.spring.Vol 2, No 2.
- **Molina M., Giannuzzi L. 2002.** Modelling of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* in a solid medium at different temperatures, pH and propionic acid concentrations. Food Research International 35, 585-594.
- **Molto G.A., Gonzalez H.H., Resnik S.L., Pereyra Gonzalez A.** 1997.Production of trichothecenes and zearalenone by isolates of *Fusarium spp*. from Argentinian maize. Food Additives and Contaminants 14, 263-268.
- **Morin O. 1994.** *Aspergillus* et aspergilloses biologie.Ed.Techniques Encyl.Med.Chir (Elsevier,paris),Maladies infectieuses,8-600-A-10.
- **Multon J.L. 1982**. Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés : Céréales, oléagineux, aliments pour animaux. Lavoisier Technique et Documentation, Paris. Apria. p: 576.
- **Nath M., Sulaxna Song X., Eng G., Kumar A. 2008.** Synthesis and spectral studies of

- **Ndoye O., Awono A., Preece L., Toirambe B. 2007**. Marchés des produits forestiers non ligneux dans les provinces de l'Équateur et de Bandundu : présentation d'une enquête de terrain. *in :* Croizer C. & Trefon T., eds. Quel avenir pour les forêts de la République démocratique du Congo ? Bruxelles : Coopération Technique Belge (CTB), 68-70.
- **Nicklin J., Graeme-Cook K., Paget T., Killington R. 2000.** L'essentiel en microbiologie. Edition Berti. P : 210-216.
- **Nicklin J., Graene Couk K., Paget P et Killington R. 2000.** Microbiologie, 362 p.
- **OMS. 1980.** Mycotoxines. Critères d'hygiène de l'environnement 11. Publications. De l'OMS Genève. p: 142.
- **Pamel E.V., Vlaemynck G., Heyndrickx M., Herman L., Verbeken A and Daeseleire E. 2010.** Mycotoxin production by pure fungal isolates analysed by means of an hplc-ms/ms multimycotoxin method with possible pitfalls and solutions for patulin-producing isolates.

- **Pang K.-L., Gareth-Jones E.B. & Vrijmoed L.L.P. 2004.** Two new marine fungi from China and Singapore, with the description of a new genus, Sablecola (Halosphaeriales, Ascomycota). Can. J. Bot., 82 : 485-490.
- **Park B.S., Lee H.K., Lee S.E., Piao X.L., Takeoka G. R., Wong R. Y., Ahn Y.J.,Kim J.H. 2006.** Antibacterial activity of *Tabeuia impetiginosa Martius* ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *Journal of Ethnopharmacology, (*105) : 255-262p.
- **Perumal Samy R., Ignacimuthu S. et Raja D.P. 1999**. Preliminary screening of ethnomedicinal plants from India. *J. Ethnopharmacol.*, **66**, 235-240.
- **Pfohl-Leszkowicz A. 1999.** Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris. p: 478.
- **Placinta C.M., D'Mello J.P.F and Macdonald A.M.C. 1999.** A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. Animal feed
- **Polglase J.L., Alderman D.J., & Richards R.H. 1986.** Aspects of the progress of mycotic infections in marine animals, In: The biology of marine fungi. Londres : Moss, S.T., Cambridge University Press, pp. 155-164.
- **Powell M.J. 1993**. Looking at mycology with a Janus face: a glimpse at Chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia*. 85: 1-20.
- **Punt P. J., Van Biezen N., Conesa A., Albers A., Mangnus J. & Van den Hondel C. 2002**. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol.* 20 (5): 200-206.
- **Rahmoun M. N., 2009**. Essai de tests biologiques (antibactériens/ antifongiques) de produits dérivés de la lawsone. *Mémoire de magister*, Université Abou-bakr Belkaïd, Tlemcen. p 36- 40.
- **Reboux G. 2006.** Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique 46, 208-212.
- **Reymond P., Sanglier JJ., Vayssier Y., et Veau P. 1990.** Moisissures utiles et nuisibles importances industrielles .paris Milan Barcelone mexico .deuxième édition. pp18-26-34-207.
- **Ríos J.L. et Recio M.C. 2005**. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 100, 80-84.
- **Samson R.A., Houbraken J.Q.M.P., Kuijpers A.F.A., Frank J.M and Frisvad, J.C. 2004.** New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. Studies in Mycology. p: 45-61.

- **Semal., Fraselle J., Impens R., Kummert J., Le poivre P., Meulimans M., Seilleur P., Vendrevenen J et Viseur J. 1993.** Traite de pathologie végétale .Presse agronomique de Gembloux Belgique. pp178, 181,185, 186,194**.**
- **Shearer C.A., Descals E., Kohlmeyer B., Kohlmeyer J., Marvanova L., Padgett D., Porter D., Raja H.A., Schmit J.P., Thorton H.A., Voglymayr H. 2007**. Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation*. 16: 49-67.
- **Sidhu G.S. 2002.** Mycotoxin genetics and gene clusters. European Journal of Plant Pathology 108, 705-711.
- **Smati F., Laouar H., Khalifa F., Bentchouala C., Hacini A., Lezzar A. (1994).** Résistance à la penicillin G de Streptococcus pneumonia responsable d'infections graves communautaires en Algérie. Medecine des Maladies Infectieuses. 24: 1190-2.
- **Smith John E., Moss M.O .1985 .** Mycotoxins: Formation, Analysis and Significance. Wiley; p :148 P.
- **Solliec G. 2004.** Recherche par PCR d'OsHV-1 (Ostreid Herpesvirus type 1) dans des échantillons d'eau de claires ostréicoles. Mémoire de fin d'études. Ecole Pratique des Hautes Etudes, Sciences de la Vie et de la Terre. Montpellier, , 51 p.
- **Sommer N.F., Buchanan J.R., Fortlage R.J. 1974.** Production of Patulin by *Penicillium expansum*. Applied Microbiology 28, 589-593.
- **Sridhar K.R. & Prasannarai K. 2001.** Biogeography and biodiversity of higher marine fungi in tropics- A review. Ecol. Env. & Cons., 7 (3) : 219-234.
- **Stanley S.J. 1992.** Observation on the seasonal occurrence of marine endophytic and parasitic fungi. Can. J. Bot., 70 : 2089-2096.
- **Tabuc C. 2007.** Flore fongique de différents substrats et condition optimales de production des mycotoxines. Pathologie et Génétique. Université de Bucarest P : 16-57.
- **Tachenon A .1999.** La science des champignons .http://www.Tachenon.com.
- **Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., Fisher M.C. 2000.** Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 21-32.
- **Uchikoba T., Mase T., Arima K., Yonezawa, H. & Kaneda M. 2001.** Isolation and characterization of a trypsine-like protase from *Trichoderma viride*. Biol. Chem. P : 1509-1513.
- **Ueno Y. 1977.** Trichothecenes: overview address.In J. V. Rodricks, C. W. Hesseltine, and M. A. Mehlman (ed.), Mycotoxins in human and animal health. Chem-Orbital, Park. Forest South, Ill. p: 189-207.cience and Technology. p: 21-37.

- **Urbanek H., Yirdaw G. 1984.** Hydrolytic ability of acid protease of *Fusarium culmorum* and its possible role in phytopathogenesis. Acta Microbiol. Pol. **33** (2) P : 131.
- **Véron** M. (1990). Pseudomonaceae. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch. 22: 555-587.

- **Vishwakiran Y., Thakur N.L., Raghukumar S., Yennawar P.L., Anil A. C. 2001.** Spatial and temporal distribution of fungi and tropical wood-borers in the coastal tropicalwaters of Goa , India Bot,Mar ,44,47-56
- **Wainright P.O., Hinkle G., Sogin M.L., Stickel S.K. 1993.** Monophyletic origins of the Metazoa: an evolutionary link with fungi. *Sciences*. 260: 340-342.
- **Werckenthin Christiane, Marisa Cardoso, Jean-Louis Martel, and Stefan Schwarz. 2001.** "Antimicrobial Resistance in Staphylococci from Animals with Particular Reference to Bovine *Staphylococcus aureus*, Porcine Staphylococcus Hyicus, and Canine *Staphylococcus Intermedius*." *Veterinary Research*, vol 32, no 3–4. P 341–362.
- **Whittaker R. H. 1969.** New concepts of kingdoms of organisms. *Science.* 163: 150-160.
- **Xu Xiangming., Bailey J.A and Cooke B.M. 2003.** Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi. Springer; p: 129.

Composition des milieux de culture

Sabouraud-chloramphénicol

Glucose	35 g
Peptone	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
Chloramphénicol	0,5 %
pH	6

Potato Dextrose Agar (PDA)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7

Milieu Czapek Dox + Extrait de levure(CYA)

Sucrose	30 g
KH2PO4	1 g
KCL	0.5 g
MgSO4	0.5 g
FeSO4	0.01 g
NaNO3	3 g
Extrait de levure	2.5 g
Eau distillée	1000 ml
pH	6

Gélose Mueller-Hinton (Guiraud, 1998).

Composant	**Quantité**
Infusion de viande de bœuf	300 ml
Peptone de caséine	17.5g
Amidon de maïs	1.5g
Agar	17 g
Eau distillée	1000ml