

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 DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle Bessoltane Nour-Elhouda

Mlle Ourari Ahlem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN (EX. BIOLOGIE)

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE DES MICRO-ORGANISMES

THÈME

**Contribution à l'étude comparative des activités antibactériennes
des deux extraits bruts (antibiotique et l'huile) synthétisés par
Penicillium sp isolés des sols des zones Abd- El- Malek – Ramden et
de Hassi Mamèche (Mostaganem)**

Soutenue publiquement le 04/ Juillet/ 2017

DEVANT LE JURY

Président	Mr R. Djibaoui.	Professeur à l'Université de Mostaganem
Encadreur	Dr F. Tissouras	Maître de Conférences à l'université de Mostaganem
Examinatrice	Dr R.bennama	Professeur à l'université de Tissimsilt

2016-2017

La liste des abréviations

ATB : Antibiotique

ATCC : American Type Culture collection

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

Fig : Figure

IgE : L'immunoglobuline E

IgG : L'immunoglobuline G

IgM : Les immunoglobulines M

LCR : Ligue communiste révolutionnaire

MEA : gélose à l'extrait de malt

MO : la matière organique

PDA : Potato dextrose agar

PH : potentiel Hydrogène.

YESL : Yeast Extract Starch Liquid

La liste des tableaux

Tableau 1 : Les principaux constituants du sol	6
Tableau 2 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 1cm.....	7
Tableau 3 : Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutique	17
Tableau 4 : Représentation de quelques sources de microorganismes productrices des antibiotiques.....	20
Tableau 5 : Caractérisation macroscopique de quelques espèces de <i>Penicillium</i>	26
Tableau 6 : Les <i>Penicillium</i> producteurs des mycotoxines	28
Tableau 7 : Principaux domaines d'applications du genre <i>Penicillium</i>	29
Tableau 8 : Les caractères macroscopiques de la souche isolat <i>P. chrysogenum</i>	43
Tableau 9 : Les caractères macroscopiques de l' isolat <i>P.notatum</i> sur le milieu Czapek – dox.	44
Tableau 10 : Les caractères microscopiques des souches de <i>Penicillium sp</i> isolés.....	45

La liste des figures

Fig 1 : Relation entre organismes, matière organique et roche mère dans le développement du sol	2
Fig 2 : Proportion des principaux composants du sol en pourcentage	3
Fig 3 : Triangle des textures minérales	3
Fig 4 : Influence de la structure sur les principaux paramètres du sol	4
Fig 5 : Fixation des ions sur le complexe argilo- humique	5
Fig 6 : Le niveau de pH des différents sols	5
Fig. 7: Différentes voies de la transformation de la matière organique	11
Fig. 8 : Cycle de carbone	12
Fig. 9 : Cycle de l'azote	13
Fig. 10: Cycle de soufre	14
Fig 11: Mode d'action des antibiotiques	18
Fig 12 : Mode aux Résistances des antibiotiques	19
Fig 13: Structure chimique de l'acide 6- aminopénicillaniques	21
Fig 14 : Quelques classes de pénicillines	22
a) Pénicilles naturelles.	
b) Pénicilles semi-synthétiques.	
Fig 15 : Caractères morphologiques des <i>Penicillium</i> A : Présentations des ramifications B : Les thalles groupés en faisceaux ou agrégés.....	25
Fig 16 : Les colonies de <i>Penicillium</i>	26
Fig. 17 : Cycle de vie de <i>Penicillium spp.</i>	27
Fig. 18 : Carte géographique des stations de prélèvement des échantillons A : région de Mamèche ; B : Ouillis (Forêt de Benabdelmalek Ramdane)	30
Fig 19 : Les prélèvements des échantillons (Photos prise le 13/04/20 17). A : Le site de Mamèche ; B : Prélèvement à 20 cm	31
Fig 20 : Préparation des dilutions décimale du sol	32
Fig. 21 : Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez pour le comptage du nombre des spores	35

Fig 22: Protocole d'extraction des antibiotiques	37
Fig 23. Illustration de la technique des tests antibactériens	38
Fig. 24 : Nombre moyen des colonies par un gramme de <i>Penicillium sp</i> isolés des sols de Mostaganem.....	39
Fig. 25: Isolement des souches de « <i>Penicillium sp</i> » des deux stations de Mostaganem	40
Fig 26 : L'évolution des diamètres des colonies de <i>Penicillium sp</i>	41
Fig. 27: Purification des isolats de <i>Penicillium sp</i>	42
Fig. 28 : Caractérisques macroscopiques de <i>P. chrysogenum</i>	43
Fig. 29 : Les caractères macroscopiques de <i>P. notatum</i> de la station Ouillis (Mostaganem).....	44
Fig. 30 : Les caractères microscopiques de <i>Penicillium sp</i>	45
Fig. 31 : Diamètres et les taux d'inhibition de la souche fongique <i>P. chrysogenum</i> vis-à-vis <i>S. aureus</i>	46
Fig. 32 : Test d'antagonisme de <i>Penicillium spp</i> sur les souches <i>S. aureus</i> et <i>E. coli</i>	47
Fig. 33 : Les rendements moyens en poids de l'ATB et de l'huile brute de <i>P. chrysogenum</i>	48
Fig. 34 : Les extraits de l'ATB et de l'huile brute de <i>P. chrysogenum</i> . A : Résidu blanc ATB ; B : Huiles de couleur jaune	48
Fig. 35 : Les diamètres des zones d'inhibition des deux extraits de <i>P. chrysogenum</i> en présence des deux souches bactériennes.....	49
Fig. 36 : La variation des zones d'inhibition des extraits de <i>P. chrysogenum</i> vis-à-vis les souches pathogènes.....	50

Introduction

Le sol est un milieu biologique, le nombre et la variété des organismes vivants dans le sol constituent une réserve biologique considérable et très importante pour la biodiversité de l'écosystème terrestre. La richesse microbienne des sols reste encore mal connue et exploité. Cette biodiversité microbienne est principalement constituée par les bactéries et les champignons. Une multitude de cellules microbiennes actives existe dont plus de 10^6 /g de sol, en plus de ses constituants minéraux comme le sable, l'argile, le limon et les résidus organiques **(Moreaux, 1973 ; Raoul, 2013 ; Hoorman et Islam, 2010)**.

En effet, le genre *Penicillium* est un champignon (moisissure) qui se trouve dans le sol et fait partie des ascomycètes. Ce genre présente une grande importance dans les différents milieux industriels tels que le domaine agroalimentaire et pharmaceutique (production de plusieurs drogues). Certaines espèces de ce genre comme *P. chrysogenum* produisent la pénicilline, cette molécule est très utilisée comme un antibiotique pour tuer ou arrêter le développement bactérien chez les êtres humain, les animaux et même les plantes **(Kirk et al., 2008)**. Toutefois, ces espèces peuvent synthétisés à coté des métabolites secondaires, certains métabolites primaires tels que les glucides, les protéines et huiles.

En effet, l'objectif principal de cette étude est d'isolé ce genre du sol, de deux zones de cultures différentes (Mamèche et Ouilis) de Mostaganem. Les espèces isolées vont être purifiés afin de l'utiliser pour synthèse de deux substances différentes l'antibiotique pénicilline et de l'huile de *P. chrysogenum*. Le présent travail est subdivisé en deux parties :

1. La première présente une recherche bibliographique sur le sol, le genre *Penicillium*, et la classification des antibiotiques et leurs intérêts.
2. La seconde partie expérimentale est constituée du chapitre matériel et méthodes présentant plusieurs étapes telles que : L'isolement des souches fongiques *Penicillium* sp sur des milieux sélectifs ; La purification et l'identification macroscopique et microscopique des isolats; Tests antagonismes des différents isolats de *P. chrysogenum* vis-à-vis les souches *S. aureus* et *E. coli* afin de sélectionner les souches productrices d'antibiotiques ; L'utilisation des souches de *P. chrysogenum* dans une fermentation submergé pour la synthèse de l'antibiotique de Pénicilline ; Extraction de l'huile de la biomasse microbienne ; Tests d'antibiogramme (Méthode de diffusion en disques) des extraits ATB et de l'huile de *P. chrysogenum*.

Le dernier chapitre englobe les différents résultats avec une interprétation, suivi d'une conclusion générale et quelques perspectives.

1. Le sol

1. Définition

Selon Robert (1996), le sol est un milieu vivant présentant des échanges intenses et des transformations biologiques et physico-chimiques. Ces interactions biologiques et géochimiques jouent un rôle important dans le maintien et le fonctionnement des écosystèmes (fig. 1).

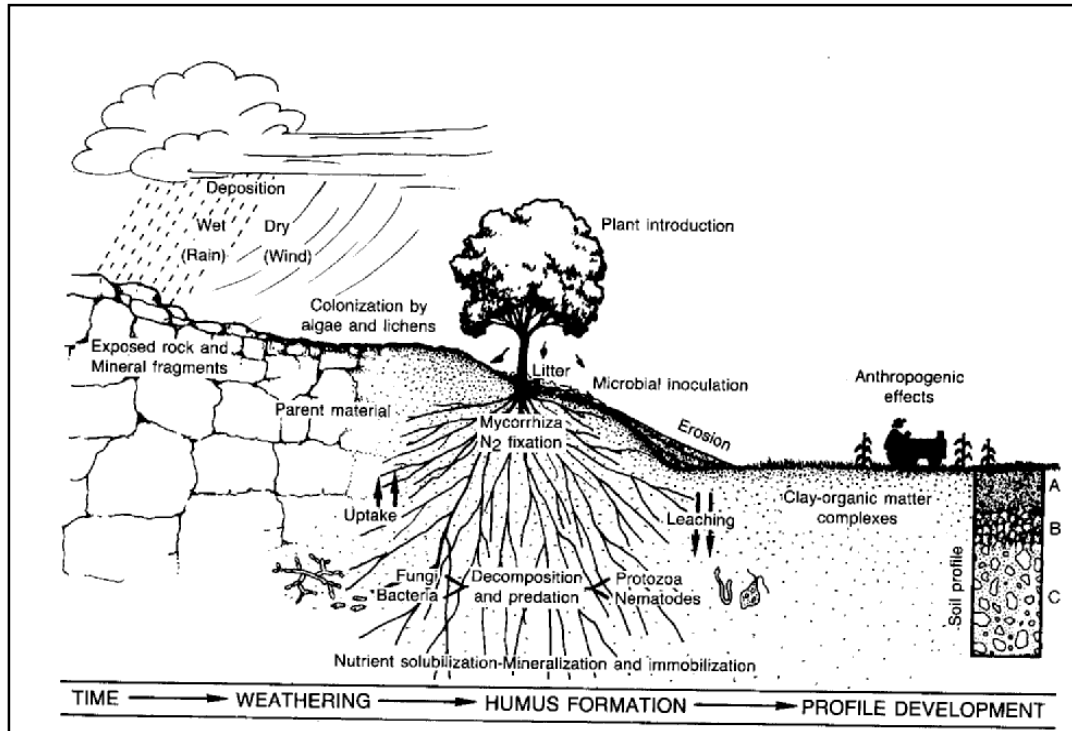


Fig 1 : Relation entre organismes, matière organique et roche mère dans le développement du sol (Paul et Clark, 1996).

Les sols proviennent de l'altération et de la transformation des roches sous l'action des agents climatiques et biologiques (Musy et Soutter, 1991). Il représente la couche supérieure de la croûte terrestre, composée de matière minérale, organique, d'eau, d'air et de divers organismes (plantes, flore et faune spécifiques) (Barles *et al.*, 1999). Cette formation naturelle est un milieu hétérogène selon sa fonction, sa topographie, sa pédologie et le système d'échange et des relations dynamiques intégrant les différents éléments de son environnement et toutes les actions directes et indirectes de l'homme (Henin, 1976).

2. Les caractéristiques du sol

Le sol est constitué de cinq composants majeurs : fraction minérale, matière organique, eau, air et organismes vivants (Alexander, 1977). Les matières organiques et minérales s'organisent de manière à créer des vides ou des pores qui sont occupés par l'air et l'eau. C'est le support

d'une grande partie de la biosphère en même temps il représente l'interface de la lithosphère, l'atmosphère et l'hydrosphère (fig. 2) (Alexander, 1977 ; Gobat, 2003)

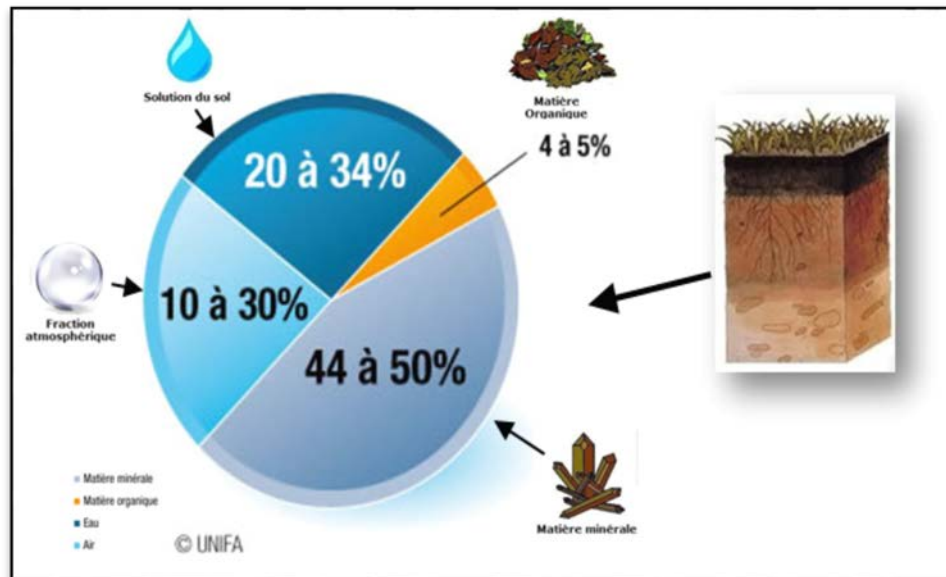


Fig 2 : Proportion des principaux composants du sol en pourcentage (White, 2006).

2.1. Fraction minérale

Les pourcentages des minéraux représentent environ 95 à 99% du sol dont la nature et la composition dépend de la nature de la roche-mère et peut être extrêmement diverse. Ces éléments minéraux peuvent avoir différentes tailles granulométriques (fig. 3) :

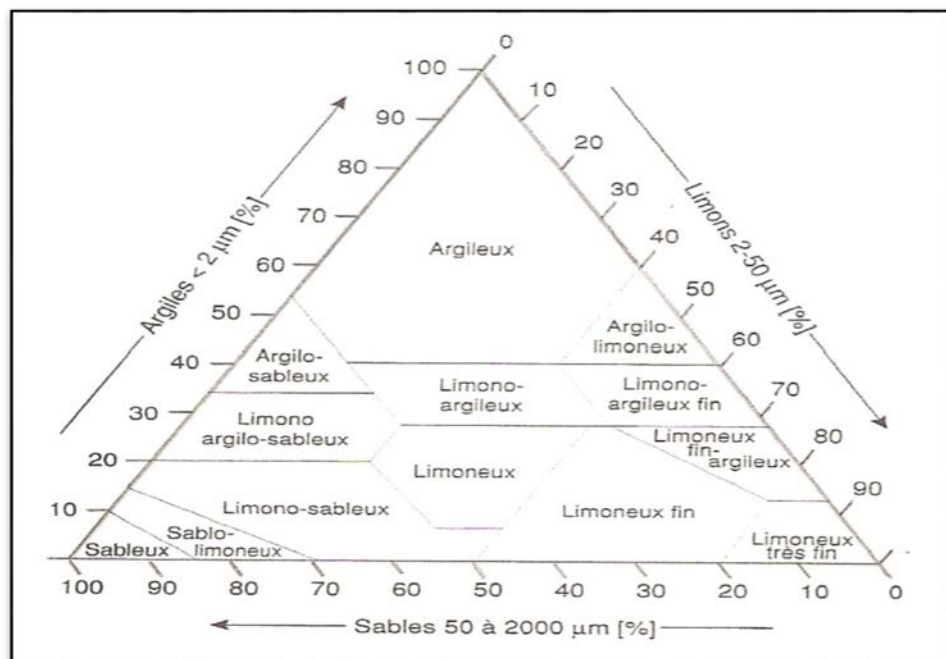


Fig 3 : Triangle des textures minérales (Girard et al., 2005).

- Sable ($\varnothing = 2000$ à $50\mu\text{m}$) ;
- Limon ($\varnothing = 50$ à $2\mu\text{m}$) ;
- Argile granulométrique ($\varnothing < 2\mu\text{m}$).

Selon les proportions de ces trois fractions granulométriques, la texture du sol peut être qualifiée de sableuse à argileuse. La fonction et la capacité des sols dépendent de cette texture et de la nature de la roche-mère (Quénéa, 2005).

2.2. Structure du sol

On peut la définir comme l'ensemble des caractères liés à la disposition spatiale des éléments qui constituent le sol ainsi qu'à la nature et à l'intensité des liaisons qui existent entre eux (Girard *et al.*, 1998). La structure d'un sol est l'assemblage des particules et des constituants solides qui sont maintenus par des forces physiques et chimiques en formant des agrégats (Pierzinsky *et al.*, 2005). La structure du sol varie avec le temps selon la texture, le taux d'humidité, l'état des colloïdes et la présence de matière organique (Gobat *et al.*, 1998). Son porosité subit de nombreuses modifications comme la fissuration par les racines, le labourage sous l'action des organismes fousseurs et des vers de terres, la fissuration suite à l'alternance de la pluie et le dessèchement, le gel (dégel) et enfin le labourage ou le compactage due aux outils mécaniques des travaux (fig. 5) (Guillaume, 2000 ; Girard *et al.*, 2005).

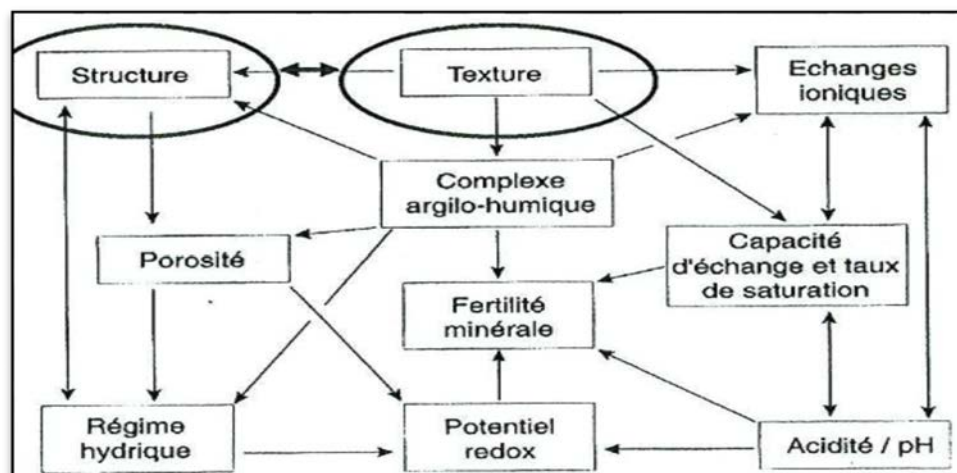


Fig 4 : Influence de la structure sur les principaux paramètres du sol (Guillaume, 2000).

2.3. Paramètres chimiques du sol

Les paramètres chimiques du sol sont liés à la disponibilité et aux teneurs des éléments minéraux nutritifs pour les plantes et aux caractéristiques physiques et chimiques du sol tels que la structure, la texture, matière organique déjà cité ci-dessus et la capacité d'échange cationique et anionique, le pH et en fin la teneur en éléments nutritifs.

2.3.1. Capacité d'échange cationique et anionique

Les sels minéraux en dissolution dans l'eau du sol peuvent se dissocier et scindés en deux ions : anions chargés négativement et les cations chargés positivement. La capacité de ses ions permet de mesurer la capacité d'un sol à retenir les cations (CEC) et les anions (CEA) et peut fournir des informations sur les éléments nutritifs du sol (fig. 5) (Iacoste et Salanon, 2001)

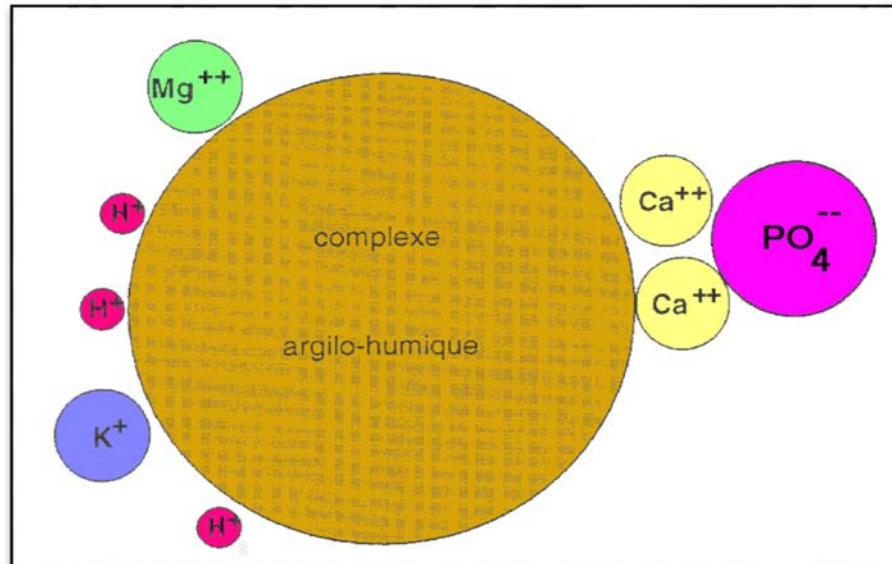


Fig 5 : Fixation des ions sur le complexe argilo- humique (Iacoste et Salanon, 2001)..

2.3.2. Le pH du sol

La mesure du pH est importante pour détermination la disponibilité et les problèmes de toxicité des éléments nutritifs pour les plantes, car il permet de mesurer l'acidité ou la concentration en ions d'hydrogène (H^+). Il varie de 0 à 14 se qui permet de classé le sol en trois types : sol neutre, acide et alcalin (fig. 6) (Iacoste et Salanon, 2001).

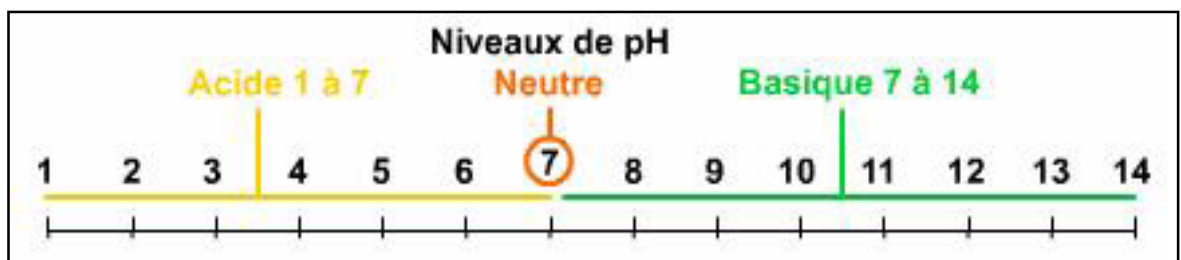


Fig 6 : Le niveau de pH des différents sols (Iacoste et Salanon, 2001).

2.3.3. Fraction organique

La fraction organique des sols est constituée de plus de 80 % de MO morte (tissus végétaux, résidus d'organismes etc.). La MO morte subit de nombreuses transformations dans le sol, elle

est fragmentée et altérée chimiquement et biologiquement. Au cours de la minéralisation, elle sert de source d'énergie pour les organismes vivants des sols. Certaines molécules non minéralisées subissent une humification en molécules plus ou moins complexes qui constituent les substances humiques. Toutefois, dans la matière organique, on peut trouver aussi des organismes vivants tels que les bactéries, les actinomycètes, les champignons mais aussi des racines ou encore de la faune (protozoaires, nématodes, certains insectes, vers de terre etc.). La minéralisation des MO est principalement assurée par les bactéries et les champignons qui participent aussi à l'humification notamment par l'excrétion des enzymes dans le sol et à la formation des complexes organo-minéraux (Quénéa, 2005).

2.3.4. Les principaux constituants du sol

Le sol est constitué de trois phases importantes, la première phase est solide et renferme deux types d'éléments distincts (les éléments minéraux et organiques) (tab. 1). La seconde phase est liquide représente la solution du sol constituée des substances solubles dans l'eau qui proviennent de l'altération des roches et de la décomposition des matières organiques du sol et des apports extérieurs (fertilisants, pesticides) (tab. 1). La dernière phase est gazeuse ou atmosphère du sol. Elle est composée presque des mêmes gaz que l'air (tab. 1) (Soltner, 1996).

Tableau 1 : Les principaux constituants du sol (Soltner, 1996).

	Constituants solides		Constituants liquides (solution du sol)	Constituants gazeux (atmosphère du sol)
	Minéraux	Organiques		
Origine	Désagrégation physique et altération biochimiques des roches	Décomposition des êtres vivants	Précipitation, nappes ruissellement	Air hors sol, matières en décompositions respiration.
Critères de classement	Taille (granulométrie) qualité (minéralogie)	Etats (vivant, morts) qualité chimiques (Originelle, transformé).	Origine (météoriques géochimiques) état physique (potentiel hydrique) Qualité chimique.	Origine (air, organismes), Qualité chimiques
Catégorie	Selon granulométrie : - Squelette (>2 mm) - Terre fine (< 2 mm) Selon minéralogie : - Quartz - Minéraux silicatés - Minéraux carbonatés	- Organismes vivants - Organismes morts - Matières organiques héritées cellulose, lignine résine. - Matières organiques humifiées : acides fulviques, humique, Humines	- Eau - Substances dissoutes : glucides, alcools, acides organiques et minéraux. - Cations et anions.	- Gaz de l'air, N ₂ , O ₂ , CO ₂ . - Gaz issus de la respiration et de la décomposition des organismes : CO ₂ , H ₂ , CH ₄ , NH ₄ ,...

3. Les fonctions du sol

3.1. Fonction « milieu biologique »

Le sol est un milieu biologique, il représente l'habitat de très nombreux organismes vivants (animaux, les végétaux, la faune et la flore). Leurs caractéristiques physico-chimiques peuvent influencer la croissance et le développement des différents organismes (**Raoul, 2013**).

3.2. Fonction environnementale

D'après **Raoul, (2013)**, le sol joue un rôle déterminant dans la qualité des eaux, de l'air et de la chaîne alimentaire. Le sol est un milieu de transit, de stockage et de transformations très nombreuses de substances inorganiques ou organiques, résultant de processus naturels ou d'activités humaines. En effet, le sol peut être aussi une source de substances polluantes, il peut les retenir et les dégrader.

3.3. Fonction « puits et source » dans les cycles biogéochimiques

Le rôle du sol est d'une très grande importance dans les cycles biogéochimiques des éléments, tant du point de vue agronomique que du point de vue environnemental. Les phénomènes naturels des différents cycles tels que du carbone, de l'azote, du soufre et du phosphore etc. se déroulent dans le sol et font de ce dernier une véritable plaque tournante (**Raoul, 2013**).

3.4. Fonction de réservoir biologique

Le nombre et la variété des organismes vivants présents dans le sol constituent une réserve biologique considérable et très importante pour la biodiversité de l'écosystème terrestre. La richesse microbienne des sols est particulièrement grande et elle reste encore mal connue et exploitée. Cette biodiversité microbienne va être évoquée dans le prochain titre ci-dessous (**Raoul, 2013**)

4. La microflore du sol

La microflore tellurique est principalement constituée par les bactéries (Actinomycètes) plus, les champignons, les algues et les protozoaires (**tab. 2**) (**Hoorman et Islam, 2010**).

Tableau 2 : Nombre des microorganismes du sol sur une profondeur de 0 à 15 cm.

Microorganismes	Nombre germe /g sol	Biomasse (g/m ²)
Bactéries	10 ⁸ - 10 ⁹	40-500
Actinomycètes	10 ⁷ - 10 ⁸	40-500
Champignons	10 ⁵ - 10 ⁶	100-1500
Algues	10 ⁴ - 10 ⁵	1-50
Protozoaires	10 ³ - 10 ⁴	Variée

4.1. Les champignons

Les champignons sont des eucaryotes hétérotrophes pouvant se présenter sous formes unicellulaire d'une allure filamenteuse. La distribution des champignons dans le sol est liée à la présence de substrats qui est constitué de débris des végétaux (**Dommergues et mangenot, 1970 ; Hawkszorth et al., 1970 ; Duchafour, 1979 ; Kwon Chung et Bennett, 1992 ; Hoog, 1995**). On distingue dans le règne des champignons quatre divisions selon le type de reproduction:

Les champignons constituent les agents principaux de la décomposition et la dégradation de la matière organique dont leur rôle essentiel est la transformation du carbone organique. Les champignons du sol peuvent être des champignons supérieurs (basidiomycètes et ascomycètes) ou des champignons inférieurs souvent regroupés sous forme de levure et de moisissure (*Penicillium, Aspergillus, Fusarium, etc.*) (**Maier et al., 2000**). Les populations fongiques exigent la richesse du sol en matière organique car la plupart de ce groupe est saprophyte à l'exception d'un certain nombre d'espèces qui sont des parasites redoutables. Certaines espèces vivent en symbiose avec les plantes supérieures (mycorhizes) d'une part ils leurs apportent des éléments nutritifs, essentiellement comme le phosphore, qui est utile à leurs croissance et d'autre part, elles renforcent leurs défenses naturelles vis-à-vis le stress biotique ou abiotique (**Alexander, 1977**).

4.2. Les algues

Les algues sont des photo-autotrophes se présentes sur la surface du sol ou en subsurface pour recevoir un minimum de lumière qui est nécessaire pour assurer la photosynthèse. Elles sont de l'ordre de 5000 à 10000 cellules/g de sol. Certaines sont hétérotrophes qui (Euglènes) peuvent vivre en profondeur. De nombreuses algues présentent une couche mucilagineuse qui peut abriter de nombreuses bactéries (**Maier et al., 2000**). Quatre groupes majeurs sont retrouvés dans le sol, il s'agit des algues vertes, vert-jaunes, rouges et des cyanobactéries. Elles participent aux processus de formation de sol et certaines espèces ont la capacité de fixer l'azote (**Wild, 1993**).

4.3. Les protozoaires

La plupart sont hétérotrophes, certains sont phototrophes; ils se nourrissent de bactéries, de levures, de champignons et d'algues, ils peuvent être impliqués dans la décomposition de la matière organique (**Maier et al., 2000 ; Wild, 1993**).

4.4. Les bactéries

Les bactéries sont des procaryotes unicellulaires de formes très diverses. La plupart des bactéries possèdent une paroi cellulaire glucidique peptidoglycane. Les dimensions des bactéries varient

de 0,2 à 2 μm . Leur classification est basée sur des caractères phénotypiques tels que la morphologie des cellules (bâtonnets, cocci s, bacilles etc.), la structure de la paroi cellulaire (Gram positif, Gram négatif), la présence d'endospores, la mobilité des cellules et la position des flagelles, et aussi sur des caractères nutritionnels (hétérotrophes et autotrophes) (**Berthelin et Toutain, 1979; Lavelle et Spain, 2001 ; Prescott *et al.*, 2010**).

Les bactéries interviennent dans un grand nombre de processus, et d'interactions mutualistes ou antagonistes avec les autres organismes du sol. Elles jouent un rôle fondamental dans les cycles de l'azote (ammonification, nitrification, dénitrification, fixation symbiotique de N_2) ; du carbone (décomposition et minéralisation) ; du phosphore ; du soufre ; et dans le recyclage des déchets et des polluants comme les pesticides (**Toop *et al.*, 1997; leung *et al.*, 1997**). Elles interviennent également dans le maintien de la structure du sol, par la formation d'agrégats.

4.5. Les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses hétérotrophes et la plupart sont des Gram-positifs. Ces bactéries possèdent un mycélium ramifié dont le diamètre varie entre 0,5-1 μm , il est plus fin que celui des champignons (**Dommergues et Mangenot, 1970**). Selon **Shrivastava *et al.*, (2008) et Hoorman et Islam (2010)**, elles constituent une proportion importante de la microflore tellurique 10^4 - 10^6 UFC/ml et 10^7 - 10^8 UFC/ml respectivement. Selon **Stanie *et al.* (1966)**, les Actinomycètes se répartissent en quatre familles, les Mycobactériacées : Leur morphologie est voisine de celle des bactéries, les Actinomycétacées, les Streptomycétacées et les Actinoplancées.

D'après **Dommergue et Mangenot (1970)**, les actinomycètes jouent dans le sol un rôle important qui résulte de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradable par les champignons et les bactéries (lignine, certains tanins). Elles peuvent produire des substances des vitamines et des antibiotiques ou même des toxiques (**Clement et Lozet, 2011**).

5. Les diverses interactions biologiques dans le sol

De diverses interactions biologiques peuvent existe dans le sol tels que les symbioses, les parasitismes, les compétitions et les prédatons. Ces interactions entre les facteurs abiotiques et les différents organismes tels que les plantes et les animaux etc. déterminent les interactions et les activités microbiennes dans le sol (**Trévors et Van Ejsas, 1997**).

5.1. Les interactions entre la microflore et le sol

L'hétérogénéité du sol et des microorganismes détermine son structure et ses caractéristiques. Cette structure joue un rôle important dans la circulation de l'air et de l'eau dans le sol. Elle facilite aux plantes et aux microorganismes d'extraire l'eau et la diffusion de certains composés

à travers la matrice du sol (Young *et al.*, 2001 ; Young et Crawford 2004). Les champignons mycorhiziens à arbuscules avec leur mycélium extra-racinaire, favorisent notamment l'agrégation des particules de sol et l'apport en eau et minéraux. En effet, la disponibilité des nutriments essentiels tels que le phosphate et l'azote joue un rôle important dans la croissance des plantes mais également des microorganismes présents dans le sol (Six *et al.*, 2004; Subramanian et Charest 1998). Les caractéristiques chimiques et physiques telles que l'humidité, la texture, le pH et la matière organique du sol ont un impact sur les caractéristiques morphologiques et la composition des communautés microbiennes ainsi que sur leurs activités biologiques (Lundquist *et al.*, 1999).

5.2. Les interactions entre les microorganismes du sol

Il existe dans le sol beaucoup de populations microbiennes à caractères différents, ces populations qui vivent dans le même habitat interagissent entre eux pour former une communauté microbienne. Des interactions peuvent avoir lieu à l'intérieur de la population entre les individus ou entre les différentes populations. Ces interactions entre populations peuvent être négatives (compétition, amensalisme), positives (commensalisme, synergique, mutualisme), ou positive pour l'un et négative pour l'autre population (parasitisme ou prédation) (Djigal, 2003). Le développement d'interactions positives permet aux communautés microbiennes impliquées d'utiliser les ressources disponibles plus efficacement. Ces interactions permettent d'occuper des niches où une seule population ne pourrait pas se développer. Certains types de microorganismes sont en mesure de produire des enzymes essentielles au métabolisme de substrats utilisés par d'autres. La détoxification des composés toxiques par une partie de la communauté microbienne peut aussi être effectuée également par d'autres espèces (Atlas et Bartha, 1997).

Toutefois, les interactions négatives sont également possibles et la compétition se produit fréquemment lorsque deux populations microbiennes utilisent la même ressource dans un espace où les nutriments sont limités (Atlas et Bartha, 1997 in Idir *et al.*, 2010).

5.3. Les interactions entre les microorganismes et les plantes

Dans un écosystème la nature et le nombre d'espèces végétales influent de façon importante sur la biodiversité microbienne à cause de leur implication directe ou indirecte comme apport en sources de carbone et d'énergie (Lucas *et al.*, 2007). Ces interactions ont lieu entre les racines des plantes et les microorganismes et sont particulièrement complexes. Les racines sécrètent certains composés organiques spécifiques qui enrichissent la rhizosphère ce qui favorise les microorganismes à s'adapter pour les utiliser. Les exsudats racinaires sont une source très importante de carbone pour les microorganismes, ils peuvent représenter 10 à 40% du

carbone fixé par les plantes lors de la photosynthèse . D'un autre côté, les microorganismes de la rhizosphère libèrent également des substances qui restent plus ou moins longtemps au niveau du sol et qui peuvent être absorbés par les plantes ou même accessibles pour d'autres organismes. Ces produits qui incluent des molécules telles que des régulateurs de croissance, des acides organiques, des antibiotiques, des hormones, et des enzymes, influencent à leur tour la croissance des végétaux (Bertin *et al.*, 2003; Bowen et Rovira, 1999) .

6. Intérêts de la microflore dans le sol

Dans le sol les microorganismes assurent plusieurs fonctions, ils jouent plusieurs rôles importants. Ils participent dans la synthèse et la décomposition la matière organique, comme, ils interviennent aussi dans les différentes étapes des cycles biogéochimiques.

6.1. Transformation de la matière organique

Quelque soit l'origine de la matière organique (végétale, animal ou microbienne etc.) dans le sol, la microflore peut la transformation grâce aux divers processus physicochimiques et biochimiques. Cette transformation est basée sur quatre principales étapes (fig. 7) (Duchafour, 1983).

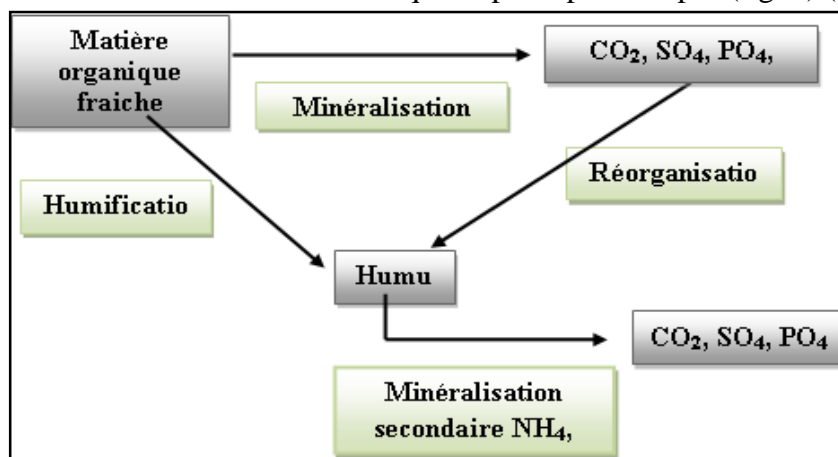


Fig. 7: Différentes voies de la transformation de la matière organique.

6.2. Cycles biogéochimique

Les processus de dégradation de la matière organique fraîche, ainsi que les divers processus de synthèses présente une multitude des réactions biologiques qui sont impliquées en général dans des chaînes partiellement fermées en cycles dits cycles biogéochimique.

6.2.1. Cycle de carbone

Le cycle du carbone est la transformation continue du carbone organique au carbone minéral au cours duquel ils existent des phénomènes de dégradation, de minéralisation et d'humification.

Ce cycle peut comporter 4 grandes étapes (fig. 8) (Dommergues et Mangenot, 1970)

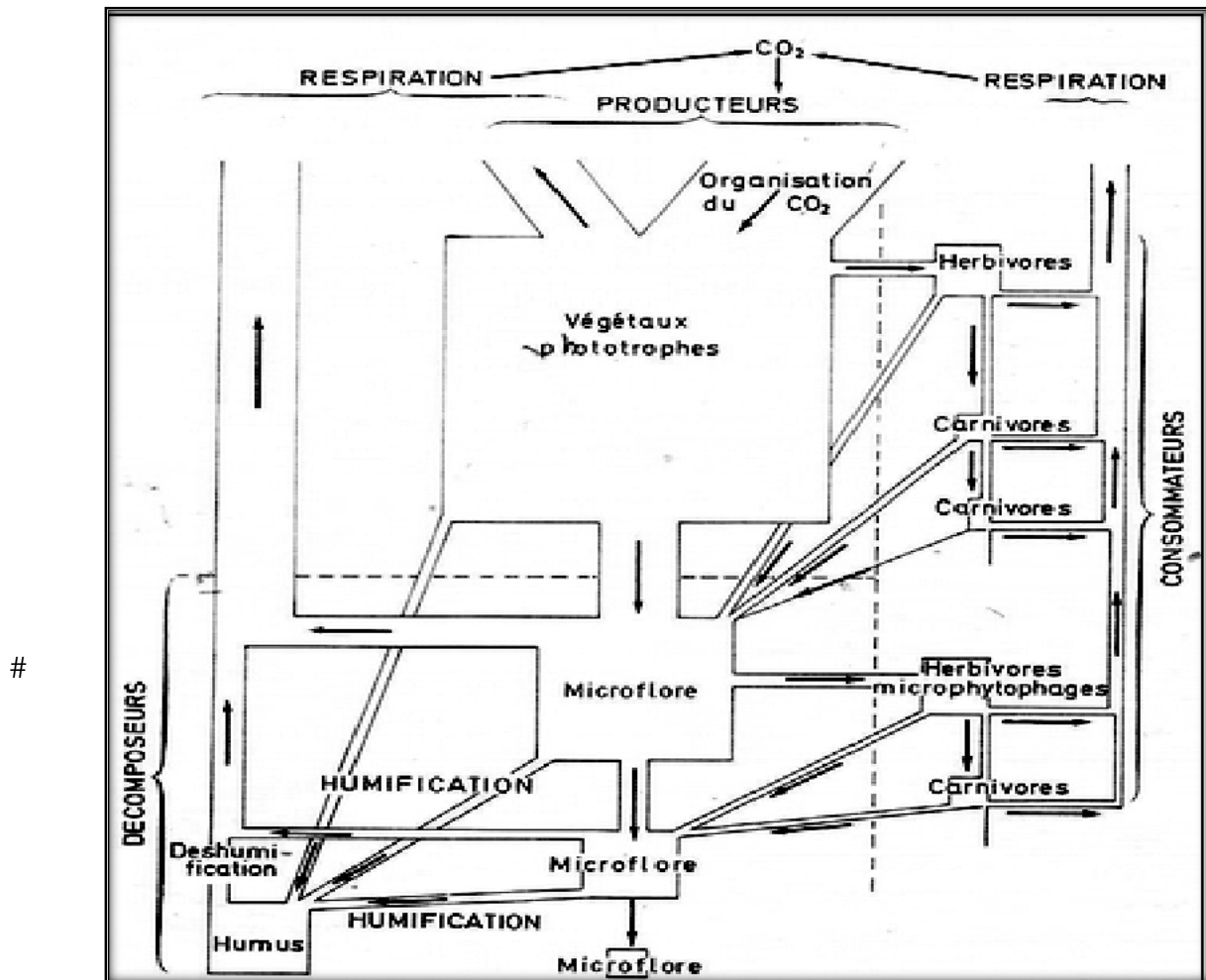


Fig. 8 : Cycle de carbone (Habib et Missoum, 2011).

1^{ère} étape est l'organisation du carbone : C'est la transformation du carbone minéral (CO₂ atmosphérique) en carbones organiques complexes pendant la photosynthèse des autotrophes.

2^{ème} étape est la consommation : La masse végétale est utilisée par les consommateurs primaires (les herbivores, des mammifères, les insectes, les gastéropodes), puis ces derniers sont eux même attaqués par des consommateurs secondaires, carnivores. C'est une étape qui consiste en une très faible minéralisation du carbone par la respiration.

3^{ème} étape est la décomposition : Une partie de la biomasse végétale fait directement retour au sol à l'état de débris aux quels viennent s'ajouter déjections et cadavres d'animaux. L'ensemble de ces matières organiques inertes sont progressivement minéralisés par l'intervention des microorganismes décomposeurs.

4^{ème} étape est les réserves : C'est l'accumulation des substances plus ou moins polymérisées issues de la transformation de certaines fractions de débris végétaux et certains produits de métabolismes microbiens.

6.2.2. Cycle de l'azote

Les composés azotes organiques (animaux ou végétaux) subissent une décomposition (ammonification) microbienne en formant l'ammoniac. Ce dernier est converti en nitrites et en nitrates grâce à l'action des micro-organismes «Nitrosomonas, Nitrobacter», cette phase est la nitrification (Leclerc et al., 1977). Le cycle de l'azote connaît en fin une autre phase importante qui est la dénitrification, c'est-à-dire la réduction des nitrates en azote grâce à l'action de nouveaux micro-organismes tels que *Thiobacillus dénitrificans* ou *Micrococcus dénitrifécaus* (Leclerc et al., 1977) (fig. 9).

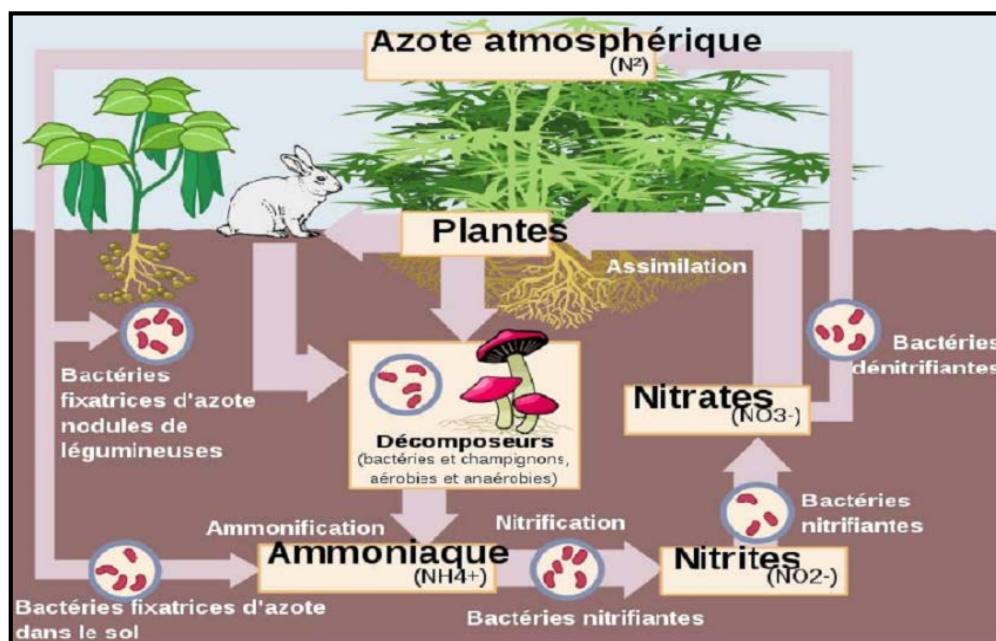


Fig. 9 : Cycle de l'azote (Habib et Missoum, 2011).

6.2.3. Cycle de soufre

Le soufre est un élément indispensable à la nutrition des plantes, il entre dans la composition de différents acides aminés tels que la méthionine et la cystine, et d'autres facteurs de croissance tels que la thiamine et la biotine. La majeure partie du soufre se trouve sous des formes organiques. Selon (Habib et Missoum, 2011) la transformation biologique du soufre passe par quatre étapes essentielles (fig. 10) :

- **La minéralisation du soufre organique :** Les produits ultimes de la minéralisation du soufre organique sont soit des sulfates, soit des sulfures ou des composés soufrés volatils
- **L'immobilisation :** L'immobilisation ou assimilation et incorporation de ces composés soufrés dans les cellules microbiennes ;

- **l'oxydation** : L'oxydation des composés minéraux du soufre peut être de nature chimique ou biologique, l'oxydation microbienne est plus efficace lorsque les conditions écologiques sont favorables
- **La réduction** : Processus de réduction des sulfates ou sulfato-réduction (**Habib et Missoum, 2011**).

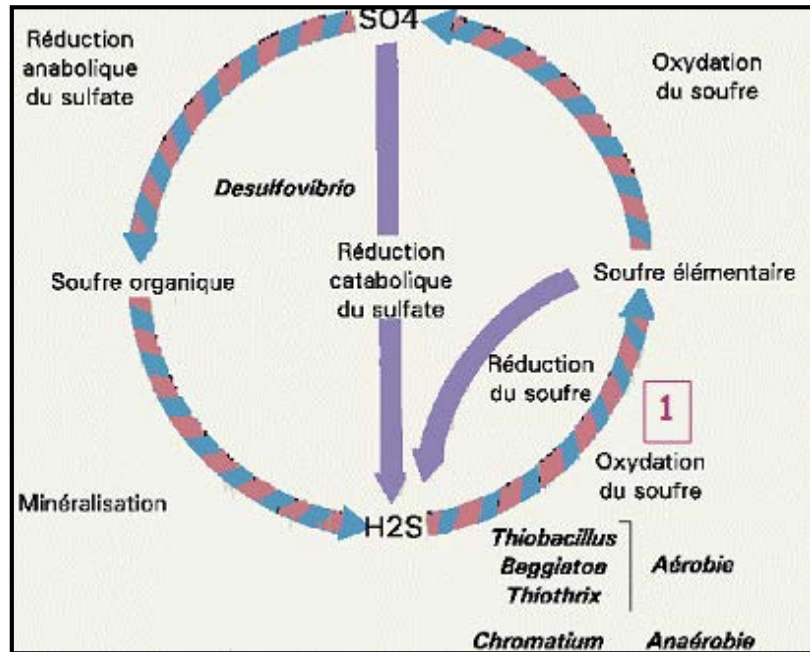


Fig. 10: Cycle de soufre (Habib et Missoum, 2011).

II. Les antibiotiques

1. Définitions des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, ils peuvent être semi-synthétiques ou synthétiques. Selon **Larpen et Sanglier (1989)**, le mot antibiotique dérive du thème antibiose créée en 1889 par Vuillemin pour désigner les phénomènes d'antagonisme entre les microorganismes vivant. En 1942 Waksman définit les antibiotiques comme des substances chimiques naturelles produites par des microorganismes qui ont le pouvoir d'inhiber la croissance ou même de détruire d'autres microorganismes. Ces antimicrobiens tuent ou inhibent la croissance des micro-organismes à des faibles concentrations (**WHO, 2011**). Les antibiotiques antibactériens sont actifs contre les bactéries, par contre les antifongiques sont actifs contre les champignons unicellulaires (**Larpen et Sanglier 1989**). Les modes de production des antibiotiques naturels sont les organismes vivants, on a les champignons, les bactéries et les végétaux supérieures (exemples : l'antibiotique pénicilline est produite par un champignon *Penicillium notatum* et l'érythromycine est produit par la bactérie *Streptemyses erythreus*. Toutefois, les antibiotiques peuvent être produits à partir des molécules naturelles par la synthèse chimique par exemple : le chloramphénicol est un antibiotique de synthèse chimique (**Yala et al., 2001**) . Les antibiotiques sont définis aussi selon certaines propriétés tels que leurs activités antibactériennes (spectre d'activité), leurs toxicités sélectives (mode d'action), leurs activités en milieu organique (pharmacocinétique) et leurs bonnes absorptions et diffusions dans les organismes (**Yala et al., 2001**).

2. Historique de l'antibiotique

La découverte revient au Dr Fleming en 1928 qui a observé que des cultures bactériennes de *staphylocoque*, dans des boîtes de Pétri, avaient été contaminées par des colonies de moisissures d'un champignon microscopique, appelé le *Penicillium notatum*. Autour des colonies de moisissure, aucun développement des bactéries (inhibé) n'a été observé. Il émit l'hypothèse qu'une substance sécrétée par le champignon était responsable de ce phénomène et lui donna le nom de **pénicilline**. Cependant, l'utilisation médicale ne fut découverte qu'en **1939** par le pharmacologiste Howard Florey et le biochimiste Ernst Chain. La pénicilline commença à être produite par l'industrie pharmaceutique américaine en 1942 et était disponible dans toutes les pharmacies à partir du 1945. Des résistances du *staphylocoque* à la pénicilline ont été apparues vers les années 1945 (**Vaux et al., 2012**).

3. Les usages multiples des antibiotiques

Les antibiotiques sont des substances à multiples usages, ils agissent sur les bactéries, les champignons et même sur quelques virus et certaines cellules cancéreuses (**Gherib, 1983**). Chaque antibiotique a des propriétés caractéristiques qui orientent son utilisation dans des circonstances précises. Toutefois, l'usage thérapeutique des ATB est globalement identique pour toutes les familles à l'exception de quelques produits les plus récents qui sont beaucoup développés et qui apportent plus d'amélioration. Concernant les propriétés principales sur lesquelles reposent les indications thérapeutiques on a :

- Les propriétés antibactériennes (bactériostase ou bactéricide) : ils comportent le spectre d'activité le mode d'action ;
- Les propriétés pharmacocinétiques : taux sériques, demi-vie d'élimination, taux de fixation aux protéines, diffusion tissulaire ;
- La toxicité : toxicité aiguë, toxicité chronique.

L'usage des ATB selon les circonstances peut se faire suivant les indications des antibiotiques où chaque famille d'antibiotiques a des indications propres à elles. Les bêta-lactamines sont utilisés dans les infections sévères à bactéries Gram positif ou négatif soit seules ou le plus souvent en association dans des circonstances particulières. Le choix peut aussi se faire en fonction du type de bactérie responsable de l'infection en premier lieu (exemple : Cocci Gram+, Cocci Gram-, Bacilles anaérobies strictes Gram positif et négatif, Bacilles Gram+ aérobies) et en seconde position, viennent les facteurs essentiels pharmacocinétiques et le facteur lié à la maladie (**Larpen et Sanglier 1989**).

4. La nature chimique

Les antibiotiques sont constitués de molécules cycliques dont leurs structures sont plus ou moins complexes selon leurs natures chimiques. On distingue quatre principaux groupes suivant le type de structure. On a les antibiotiques osidiques dans ce groupe on peut trouver les holosidiques (aminosides) et les hétérosidiques (macrolides). Les antibiotiques de nature protidiques mono acide aminé tels que le chloramphénicol, les sulfamides, le triméthoprime, la cyclosérine, les antibiotiques protidiques présentant la condensation de deux acides aminés (bêta – lactamine, les quinolones) et les polypeptides tels que les polymyxines, la bacitracine, la viomycine, la capréomycine. Les antibiotiques de nature lipidique présentent des résidus lipidiques comme l'acide fusidique. En fin, les antibiotiques comportant des cycles condensent généralement on a les tétracyclines (**Larpen et Sanglier, 1989**).

5. La classification et le mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature et la composition chimique, le mécanisme d'action (spectre d'action) et le caractère de résistance bactérien (tab. 3) (Larpent et Sanglier, 1989 ; Yala *et al.*, 2001).

Tableau 3 : Classification générale et mode d'action des antibiotiques thérapeutiques (Larpent et Sanglier, 1989).

		Familles	Mode d'action
Antibiotiques bactériens	Bêta- lactamines	Pénicillines	Paroi bactéricide
		Céphalosporines	Paroi bactéricide
		Céphamycines	Paroi bactéricide
	Aminosides		Ribosomes (30 S)
	Chloramphénicol		Ribosomes (50 S) Bactériostatiques
	Tétracyclines		Ribosomes (50 S) Bactériostatiques
	Macrolides, Lincosamines, streptogramines		Ribosomes (50 S), Bactériostatiques Bactéricide
	Polypeptides		Membrane cytoplasmique, Bactéricide
	Quinolones		ADN gyrase Bactéricide
	Sulfamides, Triméthoprime		Métabolisme des folates Bactériostatiques
	Vancomycine, novobiocine		Paroi
	Fosfomycine		Bactéricide
	Acide fusidique		Inhibition de la synthèse des protéines.
	Nitrofuranes		ADN Bactéricide
	Antifongiques	Polyenes	
Fluorocytosine		ADN et ARN, fongicide	
Imidazole et dérivés		Inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Fongicide	
Griséofulvine		Actif sur les dermatophytes	

Les réactions de synthèses sont inhibées par les antibiotiques, ces derniers se fixent sur des sites précis (les cibles moléculaire) de la cellule bactérienne ou fongique ce qui entraîne la perturbation des différents cycles métaboliques (fig. 11) (tab.3). Ainsi, chaque famille d'antibiotiques est spécifique pour chaque cible. Les cibles cellulaires ne sont pas toujours connues avec précision et correspondent à 6 niveau différentes de la cellule ; la paroi, la membrane cytoplasmique, le génome (réplication et transcription du l'ADN), la traduction du ARN messenger (synthèse des protéines), le métabolisme respiratoire et le métabolisme intermédiaire (**Larpen et Sanglier, 1989 ; Yala et al., 2001 ; Lortie et Trudel, 2003**).

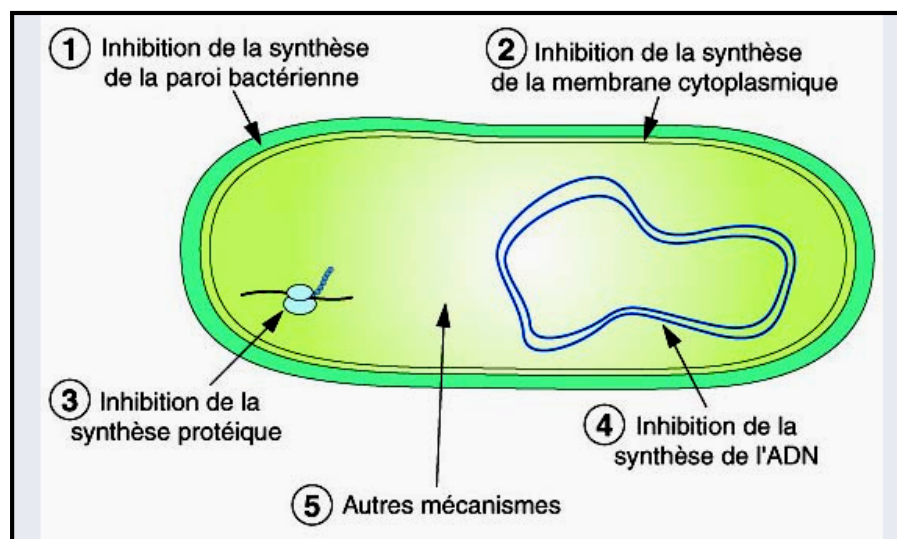


Fig 11: Mode d'action des antibiotiques (**Lortie et Trudel, 2003**).

6. Résistance aux antibiotiques

L'utilisation intensive des antibiotiques comme agent chimiothérapeutique telle que la pénicilline a provoquée l'évolution des souches bactériennes pathogènes résistantes aux antibiotiques. Toutes les souches de *Staphylococcus aureus* étaient théoriquement sensibles aux antibiotiques. Sauf que, après dix ans lorsque la pénicilline G fut introduite la plupart des infections acquises en milieu hospitalier due ses bactéries *Staphylococcus* étaient dues à des souches résistantes à la pénicilline (fig. 12) (**Perry et al., 2002**). Cependant, un micro-organisme si il est capable de se développer en présence d'un taux d'antibiotique significativement plus élevé que le taux habituel, on dit qu'il est résistant (**Meyer et al., 2004**).

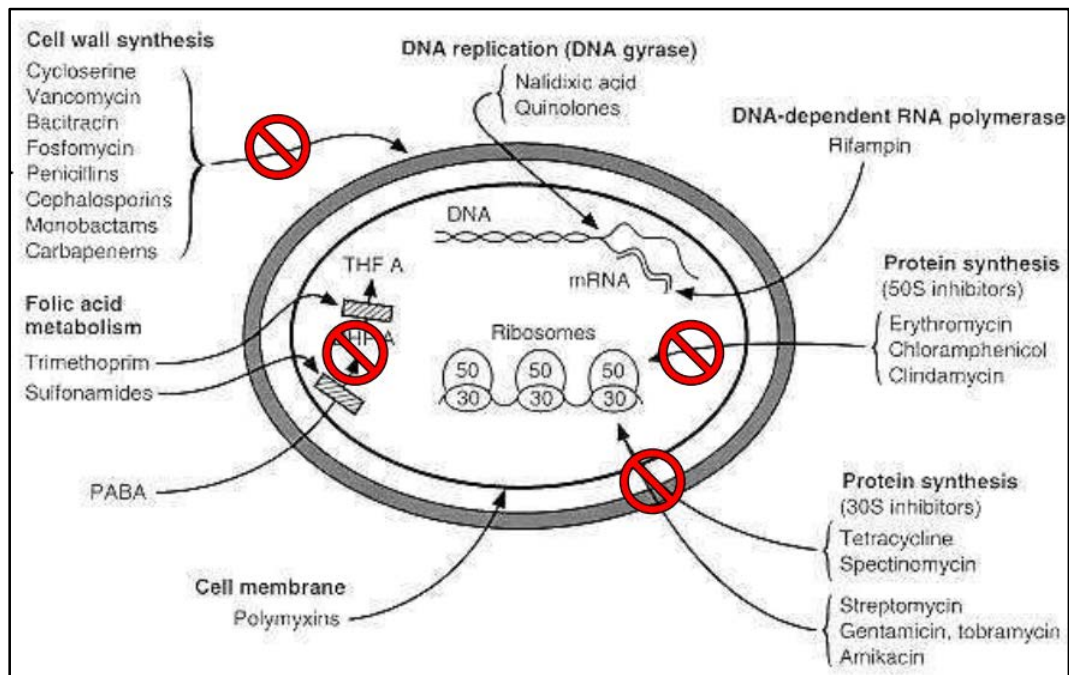


Fig 12 : Mode aux Résistances des antibiotiques (Lortie et Trudel, 2003).

Il existe deux types différents de résistances chez les microorganismes, la première est naturelle et la seconde est dite une résistance acquise. La résistance naturelle existe bien avant l'utilisation des antibiotiques, elle est d'origine génétique chromosomique et sur le plan biochimique deux mécanismes entre en jeu l'imperméabilité de la cellule et l'absence de cible moléculaire. La résistance acquise apparaît par la sélection de souches résistantes dans une population sensible lors de l'utilisation des antibiotiques. L'acquisition de la résistance peut aussi résulter d'une mutation chromosomique responsable de la modification ou de la perte d'un gène pouvant entraîner une modification de la perméabilité à un ou plusieurs antibiotiques ou une modification de la cible pariétale ou intracellulaire (Larpen et Sanglier, 1989 ; Vaubourdolle, 2007).

7. e d'administration d'antibiotiques

7.1. Voie d'administration

Le choix de la voie d'administration est directement dicté par les impératifs techniques et économiques (Dhaouadi et Louati, 2015).

7.2. La doses et durée du traitement

Quant à la durée de traitement. Elle est généralement six à huit jours ; il serait parfois intéressant pour éviter rechutes d'augmenter cette durée ou d'effectuer un deuxième de traitement de huit jours une semaine après mais est rarement fait pour des raisons économiques (Dhaouadi et Louati ; 2015)

8. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Après les travaux et les premières observations de ANDERSON en 1870 sur l'effet antagoniste d'un penicillium à vis-à-vis les bactéries et les recherches qui ont été effectués par de nombreux chercheurs comme les travaux de FLEMING en 1929, les découvertes des antibiotiques et d'organismes producteurs de ces molécules se sont multipliées (**Larpent et Sanglier, 1989**). Parmi les 125000 champignons qui a été décrits, seuls 2000 espèces sont connus comme productrices d'antibiotiques dont le nombre des substances fongiques est actuellement supérieur à 1200 antibiotiques (**Berdy, 1985 ; Lowe et Elander, 1983 ; Loeffler, 1984**). La plupart des espèces productrices sont des ascomycètes (de formes imparfaites), quelques espèces des basidiomycètes et des zygomycètes qui peuvent également en produits (tab. 4) (**Larpent et Sanglier, 1989**).

Tableau 4 : Représentation de quelques sources de microorganismes productrices des antibiotiques (**Lortie & Trudel, 2003**).

Microorganismes	Espece	Antibiotiques
Gram- positive	Bacillus subtilis	Bacitracine
	Bacillus polymyxa	Polymyxine
Actinomycetes	Streptomyces nodosus	Amphaterich B
	Streptomyces venezuelas	Chloramphenicole
	Streptomyces aureofaciens	Chlartetracycline et tetrocycline
	Streptomyces erythaeus	Erythromycine
	Streptomyces fradiae	Neomycine
	Streptomyces griseus	Streptomycine
	Micromonospora purpureae	Gentamicine
Fungi	Cephalosporium spp	Cephalothine
	Penicillium griseofulvum	Griseofulvin
	Penicillium notatum	Penicillium

9. Des généralités sur les pénicillines

La plupart des pénicillines sont des dérivés de l'acide 6- aminopénicillaniques (fig. 13) et ne diffèrent les uns des autres que par la chaîne latéral fixé en groupe aminé. Les pénicillines sont les moins toxiques des antibiotiques, elles stimulent des protéines bactériennes particulières, appelées holines, pour créer des trous ou des lésions dans les membranes

cytoplasmiques. Ce qui entrainerait des fuites membranaires et la mort des cellules. Les hydrolases pourraient également passer par ses trous et perturbent la membrane peptidoglycane et lyser les cellules. La structure de pénicilline ressemble à celle de la D-alanyl-D-alanine terminale présente à l'extrémité de la chaîne peptidique de la sous-unité du peptidoglycane (fig. 13) (Prescott *et al.*, 2010).

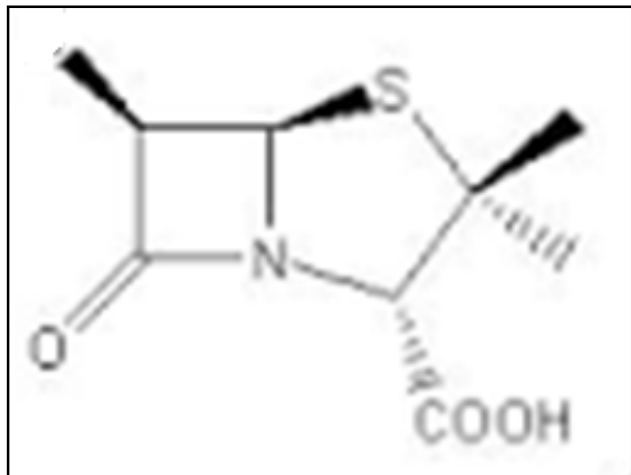


Fig 13 : Structure chimique de l'acide 6- aminopénicillanique (Prescott *et al.*, 2010).

9.1. Structures chimique

La structure chimique des pénicillines est basée sur la présence d'un noyau d'acide 6-aminopénicillanique (fig. 13). Ce noyau peut être substitué par acylation sur sa fonction aminée pour donner naissance à des dérivés qui se distinguent par leurs stabilités, pharmacocinétiques (le spectre) et leurs résistances aux β -lactamases. Par ailleurs, leurs fonctions carboxyliques peuvent être transformées en carboxylates (plus solubles) qui permettront l'obtention des esters (prodrugs). Sur la base de la nature des substituants et ses conséquences sur l'activité biologique, on peut distinguer plusieurs classes des produits de pénicillines (fig. 14) (Françoise, 2008).

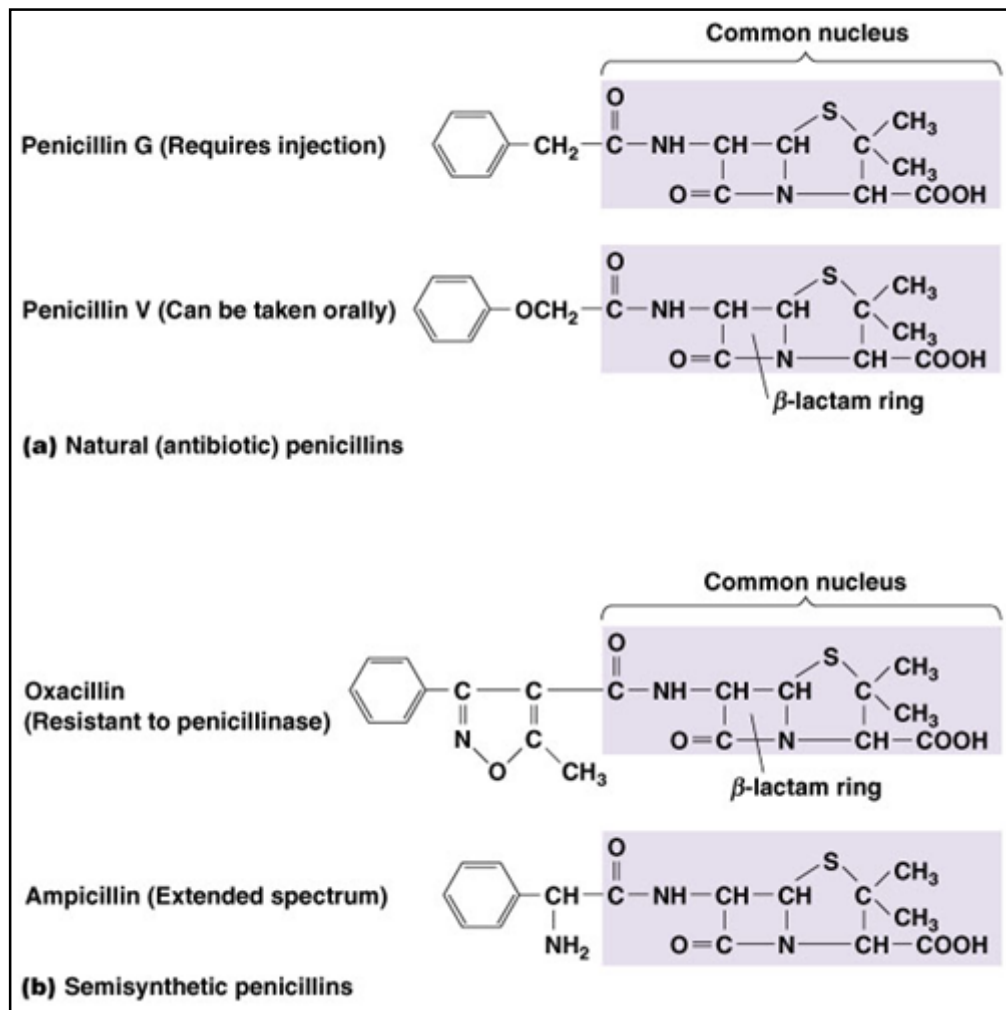


Fig 14 : Quelques classes de pénicillines (Lortie et Trudel, 2003).

a) Pénicilles naturelles.

b) Pénicilles semi-synthétiques.

9.2. Effets secondaires

Les pénicillines ne sont pas tolérées à des fortes doses, car elles peuvent causés des réactions d'allergies graves et même mortelles. L'origine de ces réactions réside dans l'instabilité chimique relative des pénicillines où leurs produits de dégradation (pénicilloyl-) se lient de façon covalentes aux protéines plasmatiques et constituent des haptènes. On peut distinguer différents types de réactions :

- Les réactions précoces (après quelques minutes qui suivent l'administration). Elles sont de type anaphylactique et sont liées à la production d'IgE. Elles incluent des manifestations telles que l'érythème, l'urticaire, la rhinite, le bronchospasme, l'hypotension, le choc.
- Les réactions retardées (après quelques heures qui suivent l'administration). Elles résultent de la circulation de complexes immuns mettant en jeu les IgE et l'activation du complément.

Elles produisent des effets du même type ???, mais ne conduisent pas au choc. En revanche, elles peuvent se manifester par un œdème laryngé.

- Les réactions tardives (plus de 72 heures après l'administration). Elles sont imputées aux IgM et IgG. Elles donnent le plus souvent lieu à une éruption cutanée morbilliforme et rarement à une néphrite interstitielle.
- Les réactions allergiques croisées avec les autres β -lactames s'observent le plus souvent avec les céphalosporines de 3^e génération et les carbapénèmes. Par contre les allergies croisées avec les autres céphalosporines et les monobactames sont moins fréquentes. Les pénicillines peuvent aussi causer des réactions toxiques directes. Celles-ci se manifestent par des convulsions dues à une encéphalopathie, favorisée par la pénétration du médicament dans le système nerveux central lorsque les méninges sont enflammées (**Françoise, 2008**).

9.3. Pharmacocinétique

Les principales caractéristiques pharmacocinétiques des pénicillines sont selon **Françoise (2008)** :

- **Absorption** : Les pénicillines à large spectre y compris pénicilline G (carboxy- et uréidopénicillines) s'administrent obligatoirement par voie parentérale car la pénicilline G est détruite par l'acidité gastrique et les autres dérivés ne sont pas réabsorbés. La pénicilline V telles que les clométacillines, les isoaxazolylpénicillines, les aminopénicillines et surtout l'amoxicilline peuvent être administrées par voie orale. L'ampicilline emieux est mieux résorbée sous forme d'une prodrogue estérifiée (pivampicilline, bacampicilline, talampicilline).
- **Distribution** : Les pénicillines **diffusent** facilement dans les espaces extracellulaires mais ne se concentrent pas dans les tissus. Elles pénètrent en faible quantité dans la moëlle osseuse, le placenta et le LCR. Elles passent toutefois mieux la barrière hématoencéphalique en cas d'inflammation des méninges. Exception faite pour les aminopénicillines, ces antibiotiques ont un taux de liaison aux protéines plasmatiques élevé (50% ou davantag).
- **Élimination** : L'élimination des pénicillines s'opère au niveau rénal par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire. En outre certaines molécules comme les isooxazolylpénicillines, les carboxypénicillines et les acyluréidopénicillines subissent une métabolisation hépatique (**Françoise, 2008**).

III. Des généralités sur le *Penicillium*

1. Définition de *Penicillium*

Le genre *Penicillium* est un champignon (ou moisissure) qui fait partie des ascomycètes asc. Ce genre présente une grande importance dans le milieu naturel ainsi que dans la production de plusieurs drogues. Certaines espèces de ce genre produisent la pénicilline, cette molécule est plus utilisée comme antibiotique, qui tue ou arrête le développement bactérien (Harjunpaa, 1996).

2. La taxonomie de *penicillium*

Le genre a été d'abord décrit dans la littérature scientifique par Johann Heinrich Friedrich Link dans son ouvrage observations dans les plantarum ordines naturales en **1809**. Le genre *Penicillium* contient environ 300 espèces (Samson et Pitt, 1985), qui sont classées dans le taxon suivant :

Règne : Mycetea (Fungi)

Division : *Amastigomycota*

Sous-division : *Ascomycotina*

Classe : *Ascomycetes*

Sous-classe : *Plectomycetidae*

Ordre : *Eurotiales*

Famille : *Eurotiaceae (Trichocomaceae)*

Genre : *Penicillium*

Cependant, d'autre auteurs situent ce genre dans la classe des Deuteromycetes ou champignons imparfaits (Botton *et al.*, 1985).

3. Les caractères de *penicillium*

3.1. Les caractères écologiques

Les espèces de *Penicillium* sont des champignons omniprésents du sol riche en matière organique, elles préfèrent un climat frais et modéré. Les espèces de *Penicillium Spp* sont généralement saprophytes, *contrairement aux espèces non saprophytes*. Les espèces du genre *Penicillium* sont des champignons filamenteux largement répandus dans le sol, ainsi, on peut les trouver sur la végétation, les denrées alimentaires, les matières organiques en décomposition et même dans l'air.

3.2. Morphologie microscopique

Le genre *Penicillium* est caractérisé par un mycélium septé et ramifié. La base non ramifiée des conidiophores correspond au stipe. Les conidiophores septé ou non, peuvent être ramifiés (ou verticillés) jusqu'à trois fois de manière symétrique ou non. Leurs extrémités sont

porteuses de plusieurs phialides. Généralement en forme de quille. Les phialides sont les cellules reproductrices, porteuses de conidies arrangées en chaînettes (**fig. 15 A et B**) (Pitt, 1979 in Tabuc, 2007).

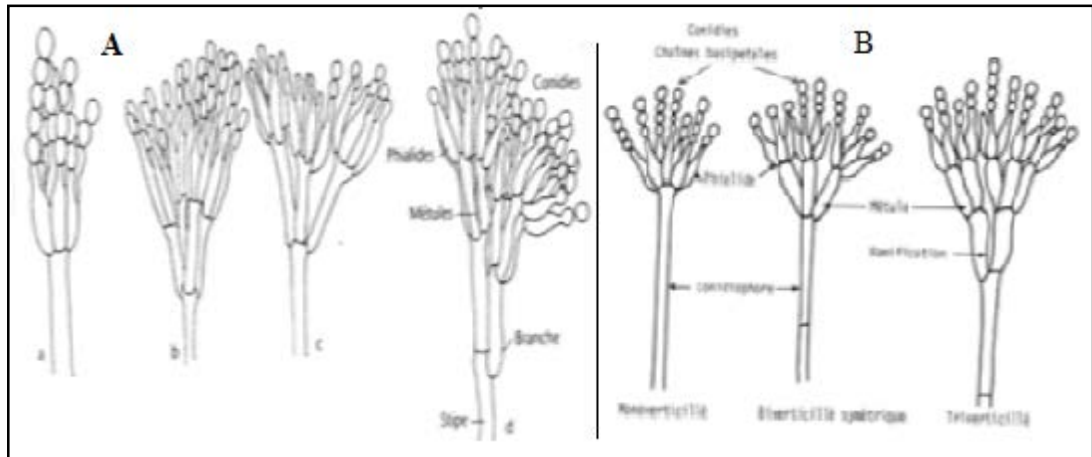


Fig 15: Caractères morphologiques des *Penicillium* (Raper et Thom, 1968 et Pitt 1979 ; Botton *et al.*, 1990)

A : Présentations des ramifications

B : Les thalles groupés en faisceaux ou agrégés.

3.3. Caractères Macroscopiques et cultureux

Les *Penicillium* se développent rapidement et facilement sur des milieux de culture simples comme les milieux gélosés au malt ou Sabouraud. Ils se développent à des températures modérées de l'ordre de 20 à 27°C. Après 2 jours d'incubation, on observe des petites colonies plates, formées de courts filaments aériens, habituellement blancs (fig. 16).

Après 3 à 4 jours d'incubation, la sporulation va conférer aux colonies leur teinte, le plus souvent dans les tons vert, vert bleu, vert-gris, vert-jaune, gris-bleu mais aussi, pour certaines espèces, jaune, orange ou rouge.

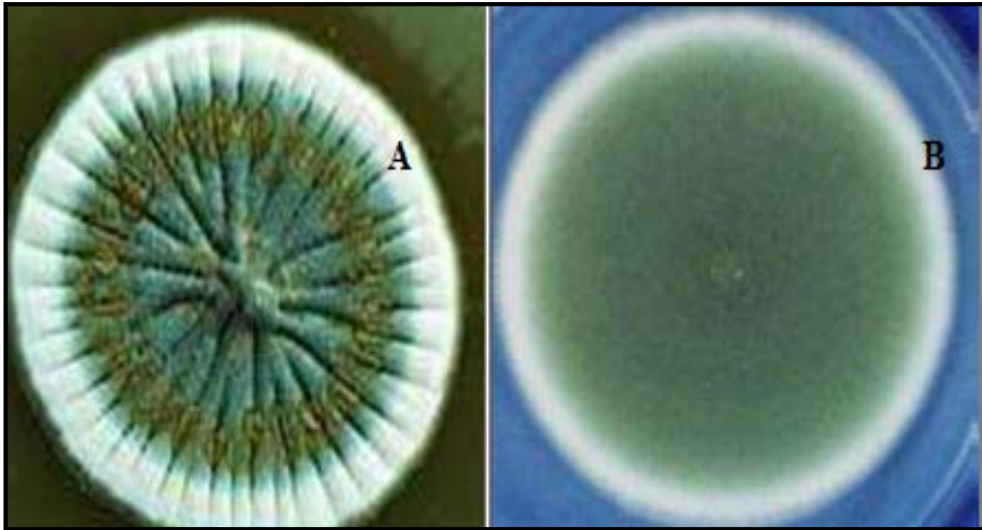


Fig 16: Les colonies de *Penicillium* (Stephen *et al.*, 2003).

Les couleurs permettent une première orientation dans l'identification des espèces (tab. 5) (Chermette et Bussieras, 1993).

Tableau 5 : Caractérisation macroscopique (couleurs) de quelques espèces de *Penicillium*.

Quelques espèces du <i>Penicillium</i>	Aspect macroscopique (couleur)
<i>P. citrinum</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. italicum</i>	Vert – gris
<i>P. chrysogenum</i>	Vert-jaune
<i>P. roquefortii</i> , <i>P. fellutatum</i> ,	Vert-sombre
<i>P. nalgiovense</i>	Jaune pâle
<i>P. purpurogenum</i>	Jaune vif à rouge
<i>P. islandicum</i>	Mélange d'orange et verdâtre
<i>P. camembertii</i> .	Blanche

4. Reproduction

Bien que de nombreux eucaryotes puissent se reproduire sexuellement, environ 20% des espèces fongiques présentent un mode de reproduction asexués. Toutefois, la capacité sexuelle des champignons a récemment été déterminée pour l'espèce *P. roquefortii* sur la preuve des gènes de types d'accouplement fonctionnels impliqués dans la compatibilité sexuelle fongique. La présence de la plupart des gènes importants dans le génome séquencé connus pour être impliquer dans la méiose, le *Penicillium chrysogenum* couvre une importance médicale majeure, car il présente une source industrielle importante de

l'antibiotique pénicilline. Le mode de reproduction de cette espèce a été considérée comme asexuée pendant plus de 100 ans, malgré les efforts fournis pour induire la reproduction sexuelle (Bohom *et al.*, 2013). Enfin, une reproduction sexuée démontrée chez certaines espèces telles que *P. chrysogenum*, *Penicillium marneffei* était également supposé de se reproduire de façon asexuée, cette hypothèse a reposé en grande partie sur la structure hautement clonale des espèces (Henk *et al.*, 2012).

Cependant, le cycle de vie du *Penicillium* se multiplie de manière végétative (conidiogénèse) en produisant sur les parties aériennes des conidiospores qui sont des spores non sexuées (conidies) et constituent, chez la plupart des espèces, un thalle vert (Dantigny *et al.*, 2005). Les critères morphologiques utilisés en taxonomie reposent sur les aspects et les modalités de branchement des conidiospores et des conidies. La propagation des conidies, produites en chaînes à partir de cellules appelées phialides est réalisée dans l'atmosphère ambiante. Dans des conditions favorables d'humidité et de température, les conidies gonflent et émettent des tubes germinatifs et ensuite du mycélium visible (fig. 17) (Botton *et al.*, 1990).

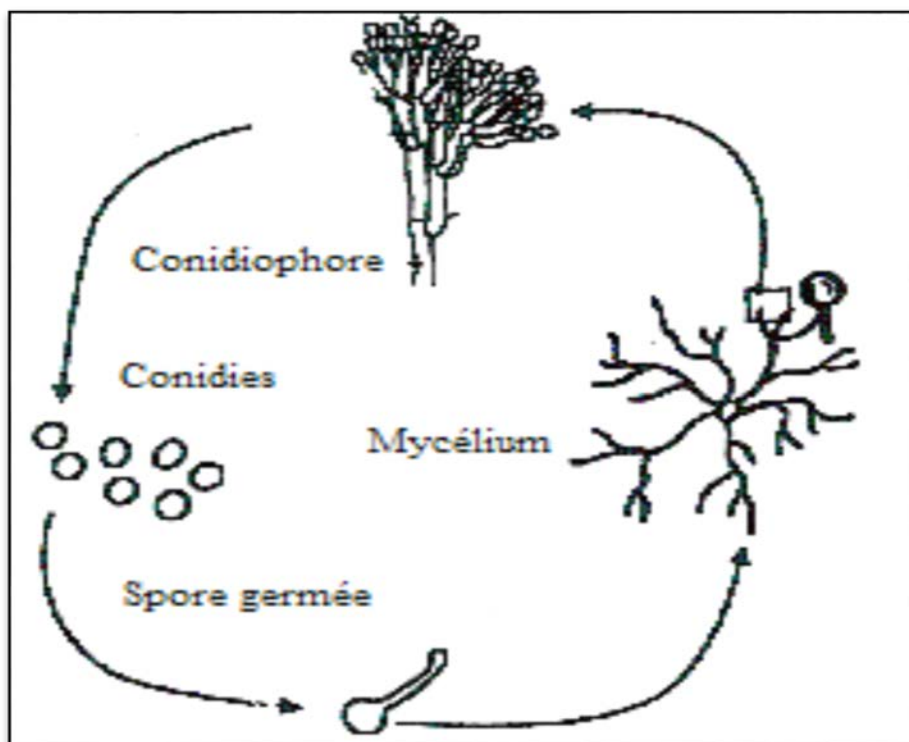


Fig. 17 : Cycle de vie de *Penicillium* spp. (Dantigny *et al.*, 2005)

5. Importance du genre *Penicillium*

5.1. Potentiel toxigène

La majorité des espèces du genre *Penicillium* ont un potentiel toxigène important, car elles ont la capacité de produire des mycotoxines de grande importance. Le tableau 6 résume les

principales espèces responsables de la synthèse de certaines molécules bioactives (Pitt, 2000 in Tabuc, 2007)

Tableau 6. Les *Penicillium* producteurs des mycotoxines (Pitt, 2000 in Tabuc, 2007).

Espèces de <i>Penicillium</i>	Mycotoxines produites
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Acide cyclopiazonique, roquefortine C,
<i>Penicillium citreonigrum</i>	Citréoviridine
<i>Penicillium crustosum</i>	Pénitrem A, roquefortine C,
<i>Penicillium expansum</i>	Citrinine, patuline, roquefortine C
<i>Penicillium griseofulvum</i>	Acide cyclopiazonique, griséofulvine, patuline,
<i>Penicillium nalgiovense</i> (sin. <i>jensenii</i>)	Roquefortine C
<i>Penicillium oxalicum</i>	Pénicilline
<i>Penicillium puberulum</i> (sin. <i>lanosum</i>)	Roquefortine C, acide sécalonique D
<i>Penicillium roquefortii</i>	Griséofulvine, acide kojique
<i>Penicillium rubrum</i>	Acide pénicillique, roquefortine C, PR toxine
<i>Penicillium rugulosum</i>	Rubratoxine
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Rugulosine, skirine Acide pénicillique, verrucologènes
<i>Penicillium vatiabile</i>	Rugulosine
<i>Penicillium verrucosum</i>	Citrinine, ochratoxine A

5.2. Pouvoir pathogène de *Penicillium*

Ces champignons sont des contaminants fréquents, ils peuvent être isolés au laboratoire. Les espèces de *Penicillium* nécessitent une température inférieure à 30°C pour leur croissance, se qu'ils les rendront très rarement impliqués en pathologie animale et humaine.

Généralement, les infections sont provoquées par l'inhalation des spores. Les premiers signes sont souvent pulmonaires, certaines espèces de *Penicillium* sont responsables de

kératomycose, d'autres d'otomycose, d'onychomycose et parfois d'infections des organes profondes telles que foie et la rate causés par *Penicillium marneffeii* (Hennequin et Lavarde, 1998 in Tabuc, 2007 ; Rosenthal et al., 2000 in Tabuc, 2007).

5.3. Les utilisations biotechnologiques de *Penicillium*

Les utilisations biotechnologiques de *Penicillium* dans la transformation des denrées alimentaires est très ancienne. De nombreuses études systématiques ont été entrepris sur ces microorganismes et elles ont permis d'élargir leurs champs d'application dans les différents domaines agroalimentaire, pharmacologie et/ou écologie (tab.7). Cependant, ce champignon fondamental fait partie des contaminants fongiques les plus couramment rencontrés. Il peut être responsable de la biodétérioration de nombreux produits (Botton et al., 1990)..

Tableau 7. Principaux domaines d'applications du genre *Penicillium* (Smith et Berry, 1975 ; Botton et al., 1985 ; Larpent et Sanglier, 1992 ; Smith, 1994).

Domaine d'applications		<i>Penicillium</i>
Produits alimentaires		<i>P. camembertii</i> Fromage (maturation) <i>P. nalgiovense</i> Saucissons (Ferments de surface)
Biomasse (enrichissement protéines)		Lactosérum, Résidus cellulosiques
Biodégradation/Dépollution		Biolixiviation, hydrocarbures,polyuréthanes
Biotransformations par	Conidies	<i>P. roquefortii</i> : Transformation de triglycérides en méthyl-cétones.
	Mycélium	Action sur des antibiotiques
Production d'acides organiques		Acides gluconique, érythorbique
Prduction de lipides		A partir de sucres simples
Production de métabolites secondaires		<i>P. chrysogenum, P. griseofulvum, P. notatum, P. jensenii</i> (<i>P. nalgiovense</i>) : Antibiotiques (Pénicillinees, amudol, griséofulvine). Autres:analgésique, anticholestérolémians, immunosuppresseurs
Production d'aromes		<i>P. roquefortii</i> :Cétones (arome du « bleu »)
Production d'enzymes		Glucose oxydase, dextranases, pectinases, cellulases, Ribonucléases

IV. Matériel et Méthodes

1. Objectif

L'objectif principal de ce travail consiste à isoler les espèces fongiques du genre *Penicillium* spp disponible dans deux sols de culture différentes de la région de Mostaganem. Afin, de déterminer les souches productrices de l'antibiotique « penicilline », des isolements, des purifications et des identifications vont être effectués de manière plus pratique et opérationnel.

2. Les sites des prélèvements

Les villages de Hassi Mamèche et de Abd-Malek-Ramden (la forêt de Benabdelmalek Ramdane), les lieux des prélèvements des échantillons, sont situés respectivement à 8,15 Km et 32 km du l'Est de centre ville de Mostaganem dont les coordonnées géographiques sont 35°51'37''nord ,0°04'23''Est et 36° 06' 12'' Nord et 0° 16' 34'' Est (fig. 18).



Fig. 18 : Carte géographique des stations de prélèvement des échantillons
(Google Mapp 13/05/2017).

A : région de Hassi Mamèche ;

B : Abd-Malek – Ramden (Forêt de Benabdelmalek Ramdane)

3. L'échantillonnage

Les prélèvements des échantillons ont été effectués le 13/04/2017 selon la méthode de cinq points dans deux stations différentes. Au niveau de chaque station, cinq échantillons au moyen ont été réalisés à une profondeur d'environ 20 cm sur une surface 100 m² (fig 19).



Fig 19 : Les prélèvements des échantillons (Photos prise le 13/04/20 17).

A : Le site de Hassi Mamèche ; **B** : Prélèvement à 20 cm ;

C : Le site de Abd-Malek- Ramden (Forêt) ; **D** : Profondeur de prélèvement d'environ 20 cm.

Après les prélèvements, les échantillons ont été tamisés à l'aide d'un tamis de 2 mm de maille pour éliminer les grosses particules, les cailloux et les débris organiques. Une fois les produits de tamisage assemblés, on pèse à partir de chaque échantillon de terre 10 g pour une ultérieure utilisation.

4. Méthodes d'étude

4.1. Les milieux des isolements de *Penicillium* spp

D'après **Harrigan et McCance (1976)**, quatre milieux synthétiques peuvent être employés pour l'isolement des moisissures (ex : *Penicillium* spp) tels que: L'agar blanc, le milieu Czapek Dox, le PDA potato dextrose agar et la gélose à l'extrait de malt (MEA). Dans ces milieux d'isolement, des antibiotiques doivent être additionnés comme la gentamycine, acide lactique, Amphotericine B et Ampicilline à une concentration d'environ de 5 mg/l dans les milieux de culture. Ces antibiotiques permettent d'inhiber la croissance bactérienne (**Botton et al., 1999 ; Ramirez, 1982 ; Botton et al., 1990 ; et Khelil, 1997**).

Dans les expériences de l'isolement des échantillons des deux stations d'étude Hassi Mamèche et Adb- Malek- Ramden , le choix a été porté sur le milieu Czapek Dox (annexe 1) vue sa meilleurs sélectivité pour le *Penicillium*. Un volume d'environ de 150 μ l d'antibiotique gentaxyn® [40mg/ml] lot 0052 a été addition à un litre du milieu Czapek Dox pour éliminer tout sorte de développement bactérien.

4.2. La préparation des dilutions de sol et l'isolement de *Penicillium*

Selon le manuel technique d'analyse microbiologique du sol, la préparation des différentes solutions mères ont été réalisées à partir d'un gramme de sol dans 9 ml d'eau distillée stérile de chaque échantillon. Des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-5} ont été effectués à partir de la solution mère pour chaque échantillon (fig.20) (Ulacio et al., 1997).

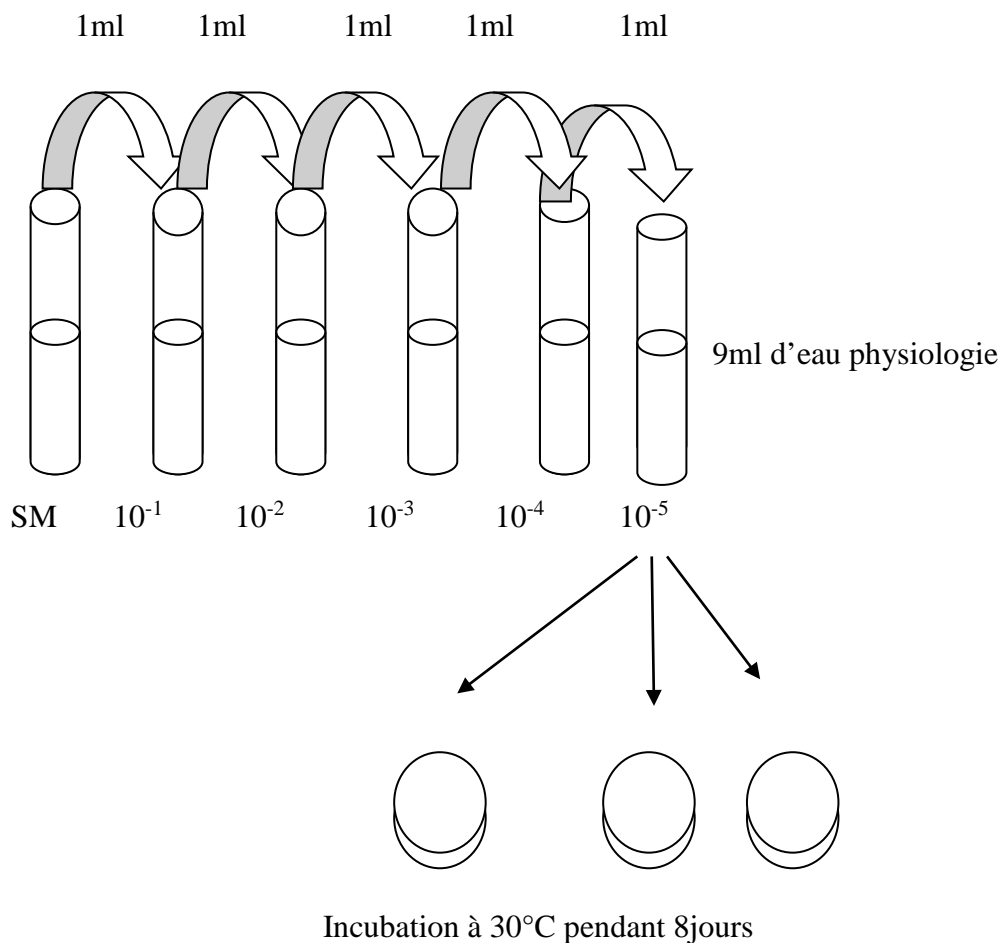


Fig 20 : Préparation des dilutions décimales des sols.

La préparation des dilutions consiste à pesé 1gramme du sol préalablement tamisé et homogénéisé, le verser dans un tube stérile contenant 9 ml d'eau distillée stérile en agitant vigoureusement à l'aide d'une pipette stérile on prélève 1ml de la solution mère dans le tube 1, il s'agit de la dilution 10^{-1} . De même pour le reste des tubes en transférant 1 ml de chaque solution d'un tube à l'autre, afin, de préparer les suspensions de dilutions (10^{-2} à 10^{-5}) (**fig.20**). La dilution 10^{-5} de chaque échantillon sera étalée à la surface des milieux gélosés additionnés d'un antibiotique, la gentamicine qui a été déjà cité ci-dessous pour inhiber la croissance des bactéries Gram positif et Gram négatif (**Leveau et Bouix, 1993**). Les boîtes de Pétri sont incubées à 30°C pendant 8 jours et trois répétitions ont été réalisé pour chaque dilution des trois échantillons pour chaque zone. Les évolutions des diamètres des différentes cultures fongiques ont été suivie et mesurer en cm.

4.3. Purification des souches *Penicillium* spp

Les colonies des deux espèces de *Penicillium* sont repérées dès leur apparition par leurs aspects macroscopique (couleur, forme) caractéristiques. Sur le milieu Czapek Dox les filaments sont ensuite repiqués, le milieu est supplémenté par la gentamicine qui permet d'avoir des souches pures et un développement optimal. Ces souches encore une fois sont sélectionnées en fonction de la couleur du mycélium aérien, la couleur du revers de la boîte, la production de pigment diffusible et de leurs temps d'incubation nécessaire (**Leveau et Bouix, 1993**).

4.4. Identification des souches *Penicillium*

L'identification d'une souche peut être effectuée par les deux techniques classiques macroscopiques et microscopiques (**Guiraud, 1998**).

4.4.1. Études macroscopique

D'après **Pitt (1991)**, l'examen macroscopique est basé sur une détermination des diamètres de la prolifération des colonies du *Penicillium*, la couleur, la forme, la sécrétion des pigments diffusibles et la vitesse de croissance des colonies. Ces observations se font à l'œil nu et à la loupe binoculaire (4×10 Zeiss 475022).

4.4.2. Études microscopiques

Les caractères morphologiques peuvent être aussi étudiés par l'utilisation de la technique microscopique photonique (B-350OPTIKA Microscopes Italy). Les préparations microscopiques se font à l'état frais en milieu liquide entre lame et la lamelle. La manipulation consiste à mettre un petit fragment mycélien sur une lame propre, l'examen microscopique passe par l'objectif le plus faible 10× jusqu'au le plus fort 100×. Les

observations sont fondées sur l'aspect morphologique des différentes structures de la souche fongiques (*Penicillium*) en déterminant les caractères suivants : le type de thalle (septé ou non), mycélium diffus, épais, la couleur des hyphes (foncées ou claires), la forme des têtes (en forme de pinceau, aspergillaire), le type de spores sexuées (oospores, zygosporos, ascospores, basidiospores) ou asexuées, le type et l'apparence du système sporal, la présence de type de structure particulière (**Botton et al., 1990**). Dans le présent travail une coloration au bleu de méthylène a été réalisée, cette coloration est très simple et permet d'observer les moisissures (*Penicillium* spp) afin d'avoir des renseignements sur :

- La forme de mycélium
- La taille
- Le mode de regroupement des spores

Le mode opératoire consiste :

- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène 1 à 2 minutes.
- Rincer à l'eau distillée.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph.
- Observation au microscopique aux différents grossissements.

5. Test d'antagonisme

Le test d'antagonisme de *Penicillium* a été mise en évidence par une méthode directe de diffusion en milieu solide contre deux espèces de bactéries pathogènes de références ATCC Gram négatif (*E.coli* ATCC 22923); et Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) afin de sélectionner les souches productrices des substances bioactives telles que les ATB pour une utilisation ultérieure dans fermentation submergé.

5.1. Mode opératoire

La méthode consiste à déposer dans des boites de Pétri contenant le milieu Mular-Hinton (Annex 4) un explant de diamètre inférieur à 1mm provenant d'une culture jeune de *Penicillium* spp en opposé avec les deux espèces bactériennes cité ci-dessous. Trois témoins ont été utilisé, une boite contenant uniquement le champignon (*Penicillium* spp), la seconde uniquement la souche *E. coli* et la troisième *S. aureus*. Les différentes cultures doivent être incubées à une température de 24°C. Le suivi de l'évolution de la croissance mycélienne est effectué toutes les 24 heures par la mesure des diamètres des colonies mycéliennes en centimètre (**Rapilly, 1968 ; Madigan et al., 1997**).

6. Préparation des différentes étapes de la fermentation

6.1. Préparation de l'inoculum :

La souche fongique *Penicillium* spp identifiée a été ensemencée en surface sur deux milieux de composition différentes Czapek Dox et PDA gélosés dans des erlenmyer (Annexes 1).

Après 10 jours d'incubation à 25°C, la souche sporule et ses spores sont récupérées par ajout de 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation vigoureuse. Le comptage des spores est estimé par un dénombrement à l'aide d'une cellule de comptage (cellule de malassez) au microscope (Objectif X40). Le Principe de comptage de nombre de spores par hématimètre de Malassez consiste à prélever à l'aide d'une pipette pasteur une quantité de suspension de spore à partir de l'inoculum de la souche fongique, on le pose sur la lame malassez au milieu (fig. 21 A). Après le comptage des spores se fait à l'aide d'un microscope (fig. 21 B). Selon la formule suivante le nombre est calculé :

$$X = C/5.10^{-7} \text{ spore /ml}$$

C : nombre des spores dans le petit carré

X : nombre des spores dans toute la cellule

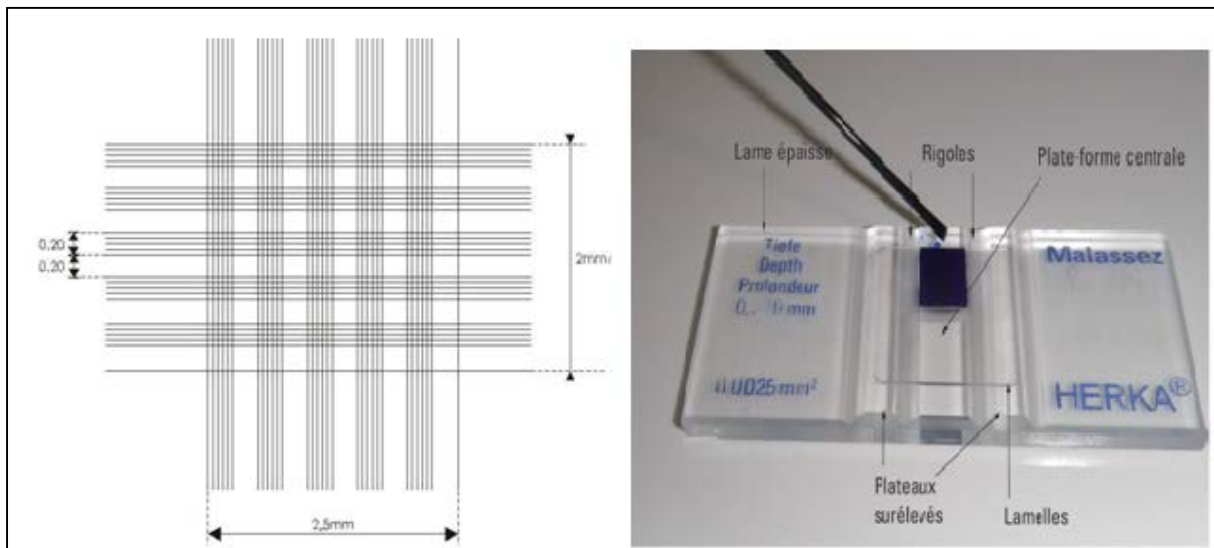


Fig. 21 : Le quadrillage de l'hématimètre de Malassez pour le comptage du nombre des spores .

Des dilutions décimales peuvent être effectuées en cas d'un inoculum concentré, afin d'obtenir une suspension sporale de 10^7 spore/ml. À cet effet, cette suspension sporulé concentré doit être diluée avec de l'eau distillée stérile, ensuite, le nombre de spores/ml de

cette solution doit être déterminée de la même façon (**Lenoir et Choisy, 1971 ; Rabie et al., 1977 ; Klich et al., 2000; Mechakra et al., 2002 ; Seo et al., 2003; Ehrlich et al., 2005**).

6.2. Ensemencement du milieu de fermentation

Selon **Frisvad et Filtenborg (1983)**, le milieu YESL (Yeast Extract Starch Liquid acidifié) est un milieu spécifique pour une production optimale des ATB (ex : pénicilline). La fermentation est réalisée dans des erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml du milieu de culture YES qui est composé à base de l'extrait de levure stérile à un pH 5,5 et aussi Milieu Czapek Dox liquide (Annexe 1). Chaque erlenmeyer contenant le milieu de culture est inoculée par un volume d'environ 3 ml de la suspension sporale (10^7 spore/ml) en agitation continue pendant 10 jour à l'aide d'un agitateur vibreur (**Tuomi et al., 2001 ; Rojas et al., 2005, Pamel et al., 2010**).

6.3. L'extraction de l'antibiotique (pénicilline)

Cette partie a été effectuée pour une seule souche fongique (*penicillium*) sélectionnée en fonction des résultats précédents (l'isolement, l'identification et le test antagonisme).

Après la fermentation, une filtration sous vide a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Le filtrat a été acidifié par l'acide H_2SO_4 (pH = 2).

Selon **Badji et al. (2005) ; Gogol et al. (2008) et Qin et al. (2009)**, l'acétate de butyle est le meilleur solvant pour extraire les ATB. Ce solvant était indisponible au niveau des laboratoires se qui nous a obligé de le remplacer avec le solvant acétate d'éthyle (3V/V). Un lavage à l'eau de la phase organique permet d'éliminer toutes les impuretés solubles. La penicilline V est ensuite précipités sous forme de sels de potassium puis cristallisée dans l'éthanol (3V/V) selon le protocole de **Larpen et al., 1998**) (fig. 22).

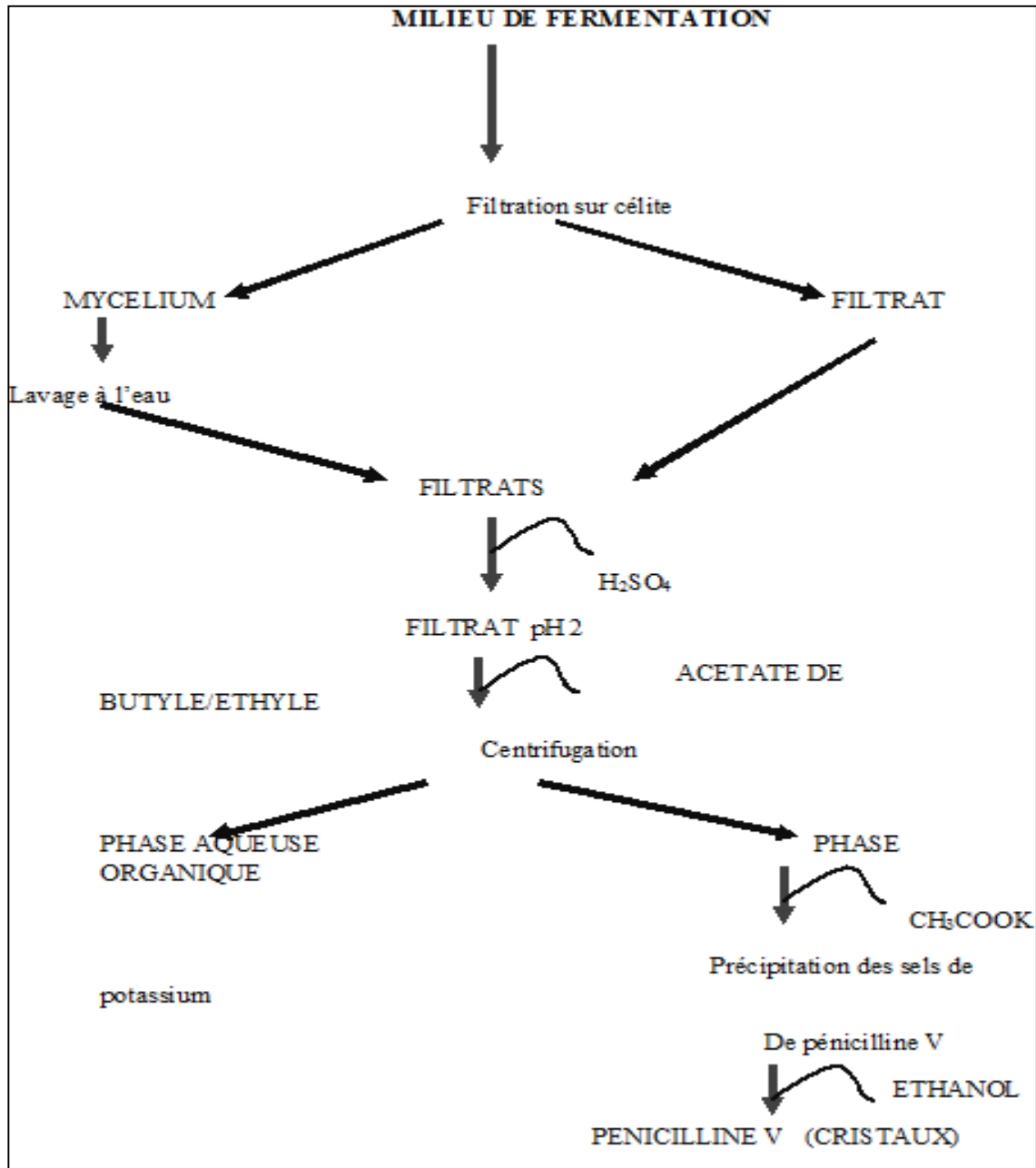


Fig. 22: Protocole d'extraction des antibiotiques (Larpent et al., 1998).

7. Test d'antibiogramme

Le teste antibiogramme, de l'extrait d'antibiotique de *Penicillium* spp, a été testée contre les mêmes souches bactériennes qui ont été utilisé dans le test d'antagonisme. Il s'agit de l'espèce *E.coli*, et *S aureu*. La **réactivation des bactéries test a été faite** à partir de souches bactériennes conservées, elles ont été réactivées dans un bouillon nutritif. Une culture bactérienne jeune a été obtenue après incubation à 37°C pendant 24 heures.

A l'aide d'un écouvillon stérile trempé dans la suspension bactérienne standardisée, un ensemencement uniforme de toute la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu Muller - Hinton a été réalisé (fig. 23). Après séchage de la surface, des disques de 5 mm ont été imprégnés dans des différentes concentrations de l'extrait antibiotique ($C_1= 0,0625$ mg/ml ; $C_2= 0,125$ mg/ml ; $C_3= 0,25$ mg/ml ; $C_4= 0,5$ mg/ml) et déposé sur les cultures, puis incubé à 28°C pendant 48 h. Les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés au millimètre (Prescott, 1995; Madigan *et al.*, 1997).

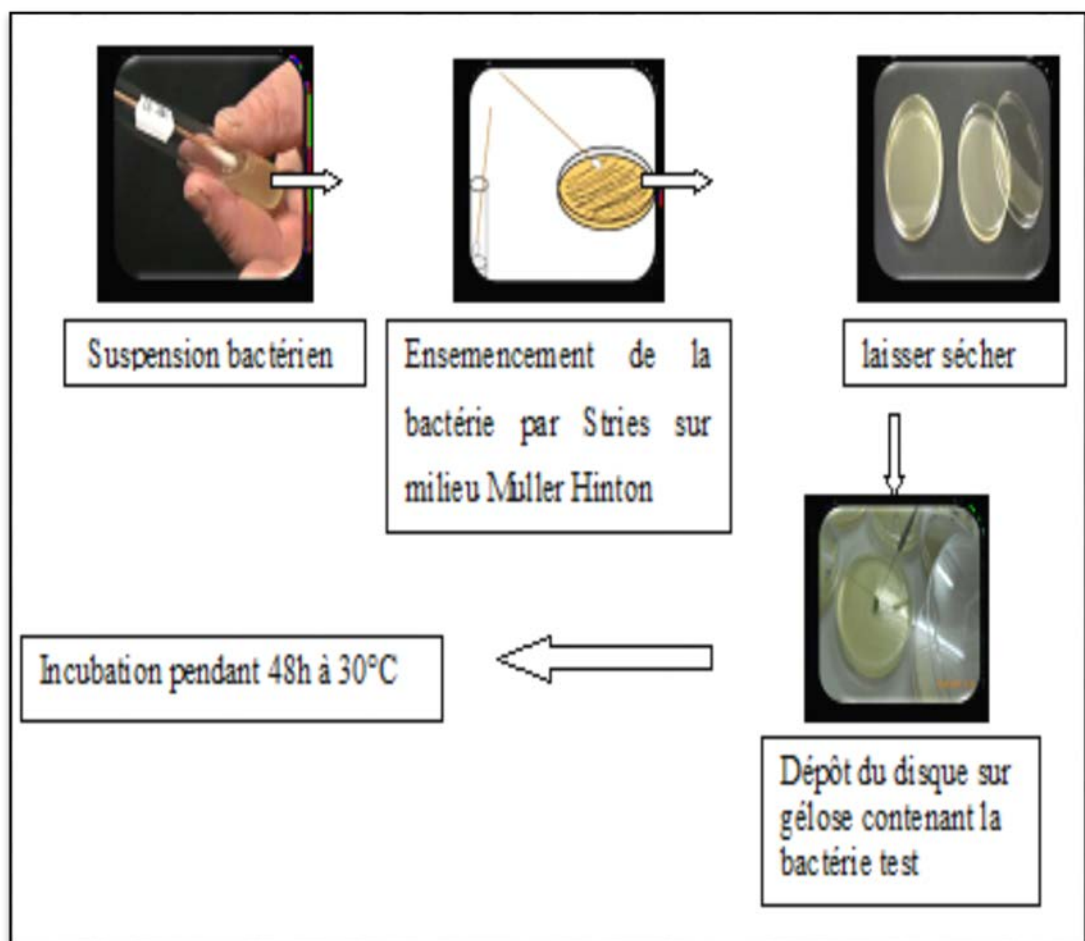


Fig. 23 : Illustration de la technique des tests antibiogramme (Prescott, 1995; Madigan *et al.*, 1997).

VI. Résultats et discussions

1. Caractérisations morphologiques de la souche fongique *Penicillium spp*

La caractérisation morphologique des souches fongiques de *Penicillium sp* est basée sur les l'aspect macroscopique observés à l'œil nu et à la loupe binoculaire, ainsi que l'aspect microscopique des isolats de sols.

1.1. Dénombrement des colonies de *Penicillium spp*

L'isolement des souches *Penicillium spp* révèle la présence de deux souches différentes de *Penicillium sp* (*P. chrysogenum* et *P. notatum*) dans le sol de Ouillis et une seule espèce de *Penicillium* (*P. chrysogenum*) dans le sol de Mamèche (fig. 24 et 25).

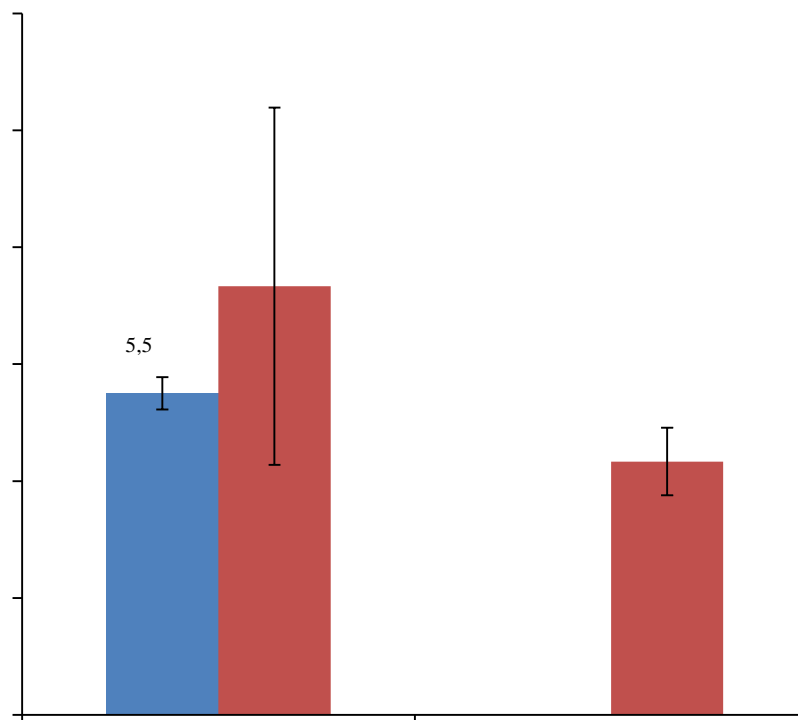


Fig. 24 : Nombre moyen des colonies par un gramme de *Penicillium sp* isolés des sols de Mostaganem.

L'utilisation du milieu Czapek Dox qui est un milieu sélectif du *Penicillium sp* a permis d'avoir un bon isolement dont le nombre moyen des colonies de *P. chrysogenum* enregistré dans 1g de sol est plus élevé par rapport à celui de *P. notatum* (fig. 25). On constate que le nombre moyen de la souche *P. chrysogenum* ($7,33 \times 10^6$ UFC/ml) isolé du sol Ouillis est supérieur à celui de la station de Mamèche.

Dans le sol de cette station (Mamèche) l'isolement de l'espèce *P. notatum* est absent, cela peut être due aux plusieurs facteurs biotiques, abiotiques ou techniques. Cependant, le nombre moyen des colonies de *P. chrysogenum* ($5,5 \times 10^6$ UFC/ml) de la station de Mamèche est plus faible comparant avec celui de Ouillis (fig. 25).

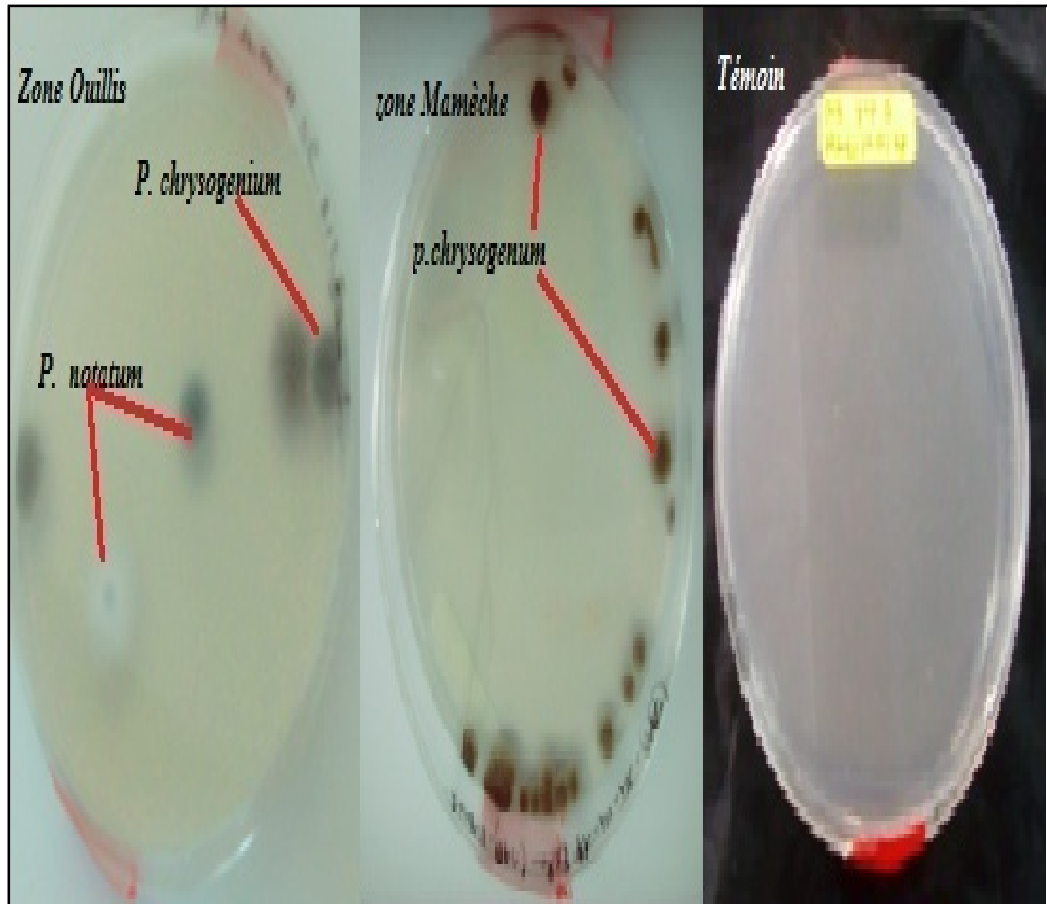


Fig. 25: Isolement des souches de «*Penicillium sp*» des deux stations de Mostaganem.

L'isolement des champignons du genre *Penicillium sp* à partir des différents échantillons de sols est bien établi, bien qu'aucun prétraitement n'ait été effectué pour réduire les contaminations et favoriser le développement.

Ces résultats obtenus coïncident avec les travaux Kholkhal (2006), qui a travaillé sur les isolats de *Penicillium* à différentes périodes de prélèvements (Novembre, décembre et Mars). Une distribution hétérogène de la souche *Penicillium* isolés a été révélée par cet auteur pour chaque période, respectivement 30 isolats, 12 isolats et 3 isolats.

1.2. L'évolution des diamètres des souches fongiques *Penicillium spp*

Les souches isolées de *Penicillium spp* sont sélectionnées, et le suivi de l'évolution des colonies par les mesures de leurs diamètres en (cm) est enregistré dans la figures ci-dessous :

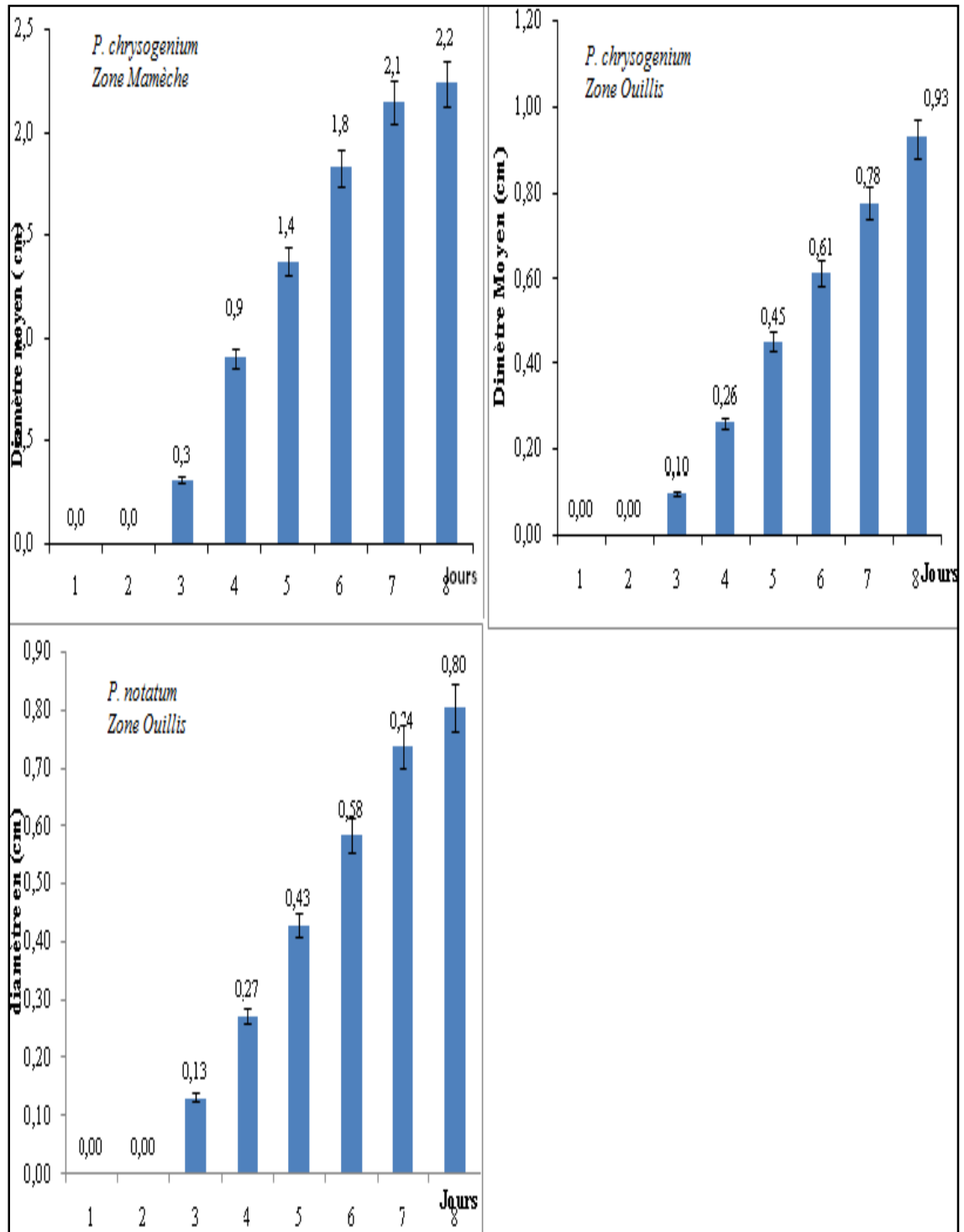


Fig. 26 : L'évolution des diamètres des colonies de *Penicillium sp.*

Selon les résultats présentés dans les graphes de la figure 26, une absence totale de *Penicillium* spp durant le 1^{er} et le 2^{ème} jour pour les deux zones Mamèche et Ouillis. Les colonies de *Penicillium* spp des échantillons de différentes régions commencent à apparaître à partir des 3^{èmes} jours. On remarque que les diamètres des colonies de *Penicillium chrysogenum* de la région de Mamèche sont importants ils varient de 0 à 2,5 cm (fig. 26).

Comparant, ces diamètres avec la même espèce de la zone Ouillis, on constate que les diamètres restent très faibles $1 \pm 0,1$ cm et ils présentent presque la moitié des diamètres *P. chrysogenum* de Mamèche (fig. 26). Donc on peut dire que la croissance de *P. chrysogenum* de la région de Mamèche est plus rapide que celle d'Ouillis. La souche de *P. notatum* dans la région d'Ouillis montre par contre des diamètres inférieurs par rapport au *P. chrysogenum* dont ils varient de 0 à $0,8 \pm 0,17$ cm (fig. 26). Néanmoins, la croissance reste rapide pour les deux isolats des deux zones comparant avec les résultats de **Ladjal (2012)** et **Kachour (2005)**.

Ces résultats se rapprochent de ceux qui ont été obtenus par **Leghlimi (2013)**, sur la souche de *Penicillium* (H4), qui montre une croissance lente avec un diamètre égale à 1,41 cm après 24 heures et 7,06 cm après 7 jours d'incubation. Il a signalé dans ses résultats une émergence et sporulation de plusieurs colonies après 3 jours, dont le diamètre égale environ 3,7 cm (**Leghlimi ,2013**). Le sol est milieu vivant des populations de différents genres, le nombre et l'activité de ces populations changent d'une région à une autre, influencé par la composition telles que la matière organique, la texture, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs (**Madiganet al., 1997; Subler and Kirsch, 1998 ; Peuk, 2000**).

Remarque : Le suivi de l'évolution des diamètres à été effectué dans la première étape de l'isolement. Ensuite, les isolats de *Penicillium* sp (*P. chrysogenum* et *P. notatum*) sont purifiés sur le même milieu Czapek-dox, ou on a relevé les mêmes observations (fig. 27).

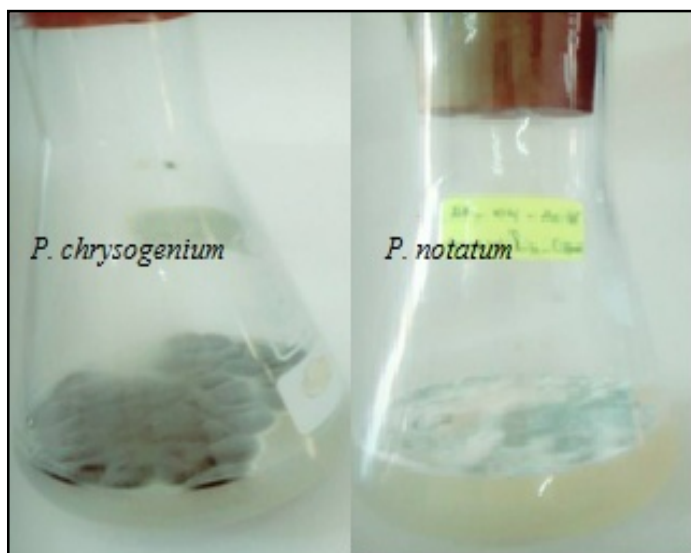


Fig. 27: Purification des isolats de *Penicillium* sp .

1.3. Caractérisation macroscopique

L'identification des genres fongiques est réalisée essentiellement selon les clefs de détermination de **Botton et al (1990)**. Elle résume l'aspect du mycélium des souches isolées, la surface et la croissance des colonies, la couleur du revers de la boîte ainsi que la présence ou l'absence de pigments caractéristiques de chaque souche sur le milieu Czapek –dox Agar. Les colonies sont opaques et denses, de diamètres variables (fig. 28) .On observe également l'aspect poudreux du mycélium aérien qui forme une croûte sur toute la surface de la colonie (fig. 28). Par contre, la présence d'une pigmentation visible à l'œil nu des mycéliums aérien au verso de la boîte de Pétri est un critère de différenciation des isolats de *Penicillium sp.* Les tableaux 8 et 9 regroupent les aspects macroscopiques des deux isolats *P. chrysogenum* et *P. notatum* sur le milieu Czapek – dox.

Tableau 8 : Les caractères macroscopiques de la souche isolat *P. chrysogenum*.

Recto : Colonies du surface duveteuses et lisse ; Poudreuses ; Relief peu surélevés ; Couleur vert – jaune et souvent de blanc à gris au départ

Verso : incolore

Croissance : moins de rapide de 3 a 7 Jours.

Un pigment jaune claire diffuse dans la gélose



Fig. 28 : Caractérisques macroscopiques de *P. chrysogenum*.

Tableau 9: Les caractères macroscopiques de l' isolat *P. notatum* sur le milieu Czapek – dox.

Recto : Colonie de surface poudreuse, et de reliefs planes, couleur blanc puis bleu vert, contour irrégulier.

Verso : Incolore

Croissance : Croissance rapide après trois jours.

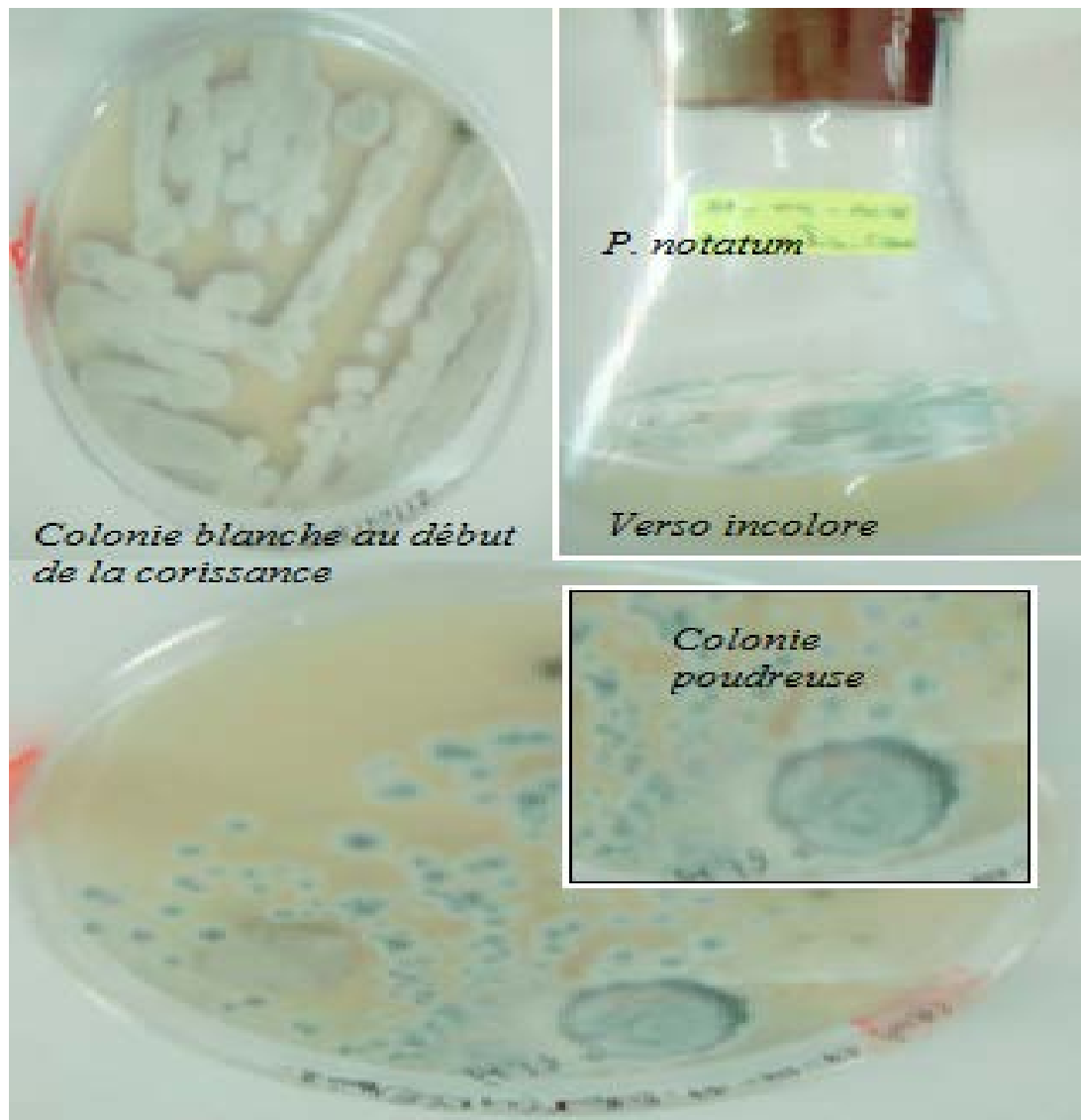


Fig. 29 : Les caractères macroscopiques de *P. notatum* de la station Ouillis (Mostaganem).

Les mêmes observations macroscopiques obtenues sur les deux isolats de *Penicillium sp* des zones de Mostaganem correspondent aux résultats obtenus par **Kachour (2005) et Ladjal (2012)**.

1.4. Caractérisation microscopique

Les résultats des observations microscopiques des deux isolats *P. chrysogenium* et *P. notatum* sont regroupés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 10: Les caractères microscopiques des souches de *Penicillium sp* isolés.

État frais

Conidiophores isolés simples ou ramifiés, terminés par un pénicille ; Pénicille constitués de phialides branchés directement à l'extrémité du conidiophore ; Conidies disposées en longue chaîne ; globuleuses, cylindriques ou fusiformes, lisse ou rugueuses.

Coloration simple au bleu de méthylène

Conidiophores en touffes compactes, très ramifiés, irrégulièrement verticillés avec des ramifications à angle droit ; Phialides ovoïdes à ellipsoïdales, atténuées au sommet ; Conidies réunies en glomérules au sommet des phialides

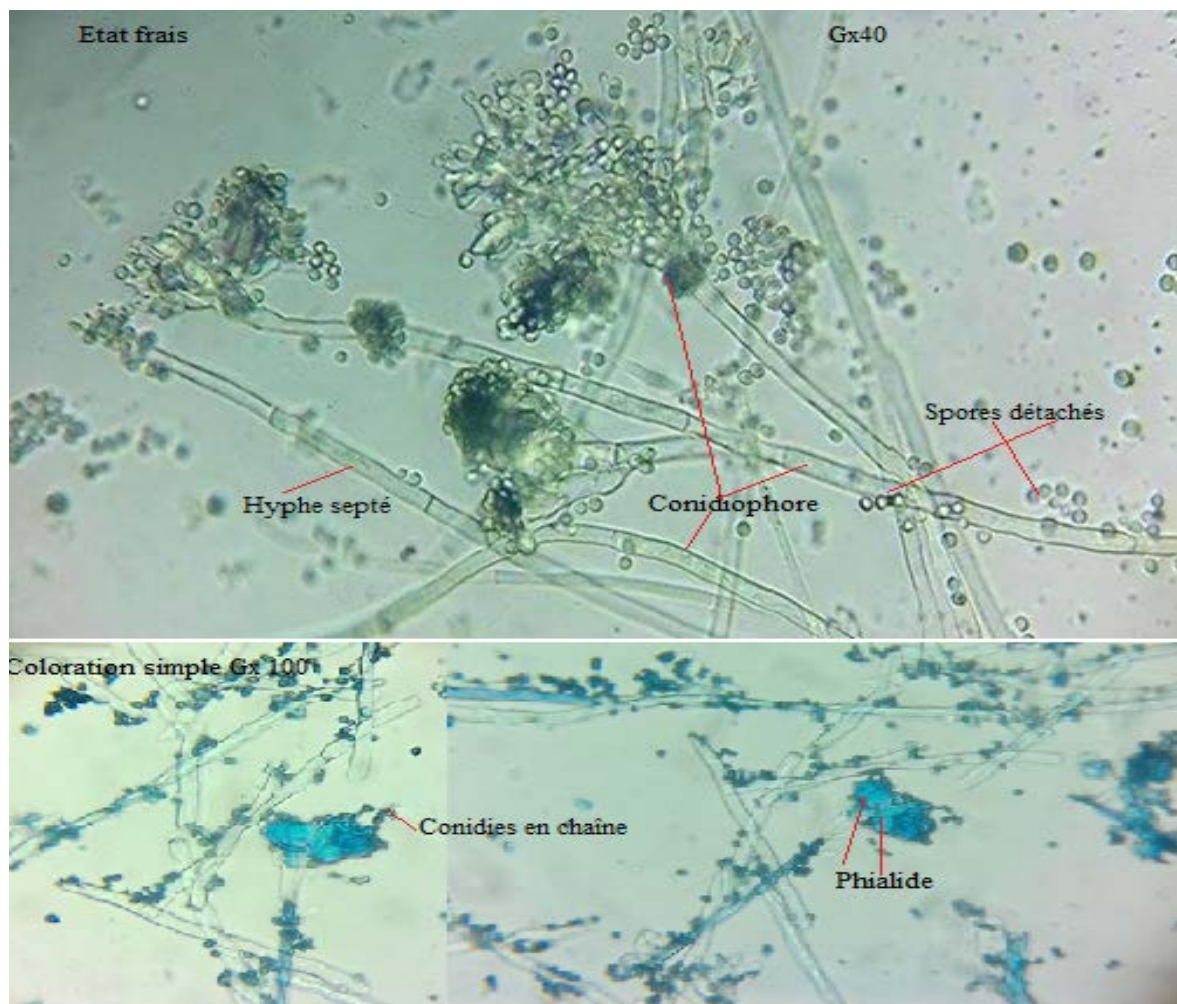


Fig. 30 : Les caractères microscopiques de *Penicillium sp.*

2. Test antagonisme

Les tests d'antagonisme a permis la sélection d'un seul isolat de *P. chrysogenum* de la zone de Mamèche comme souche productrice des substances bioactives. Cette souche s'est montrée très active contre la souche pathogène *S. aureus*, elle présente un diamètre moyen de zone d'inhibition de 4 cm avec un pourcentage d'inhibition de 56,54 % en comparant avec les autres cultures témoins (fig. 31).

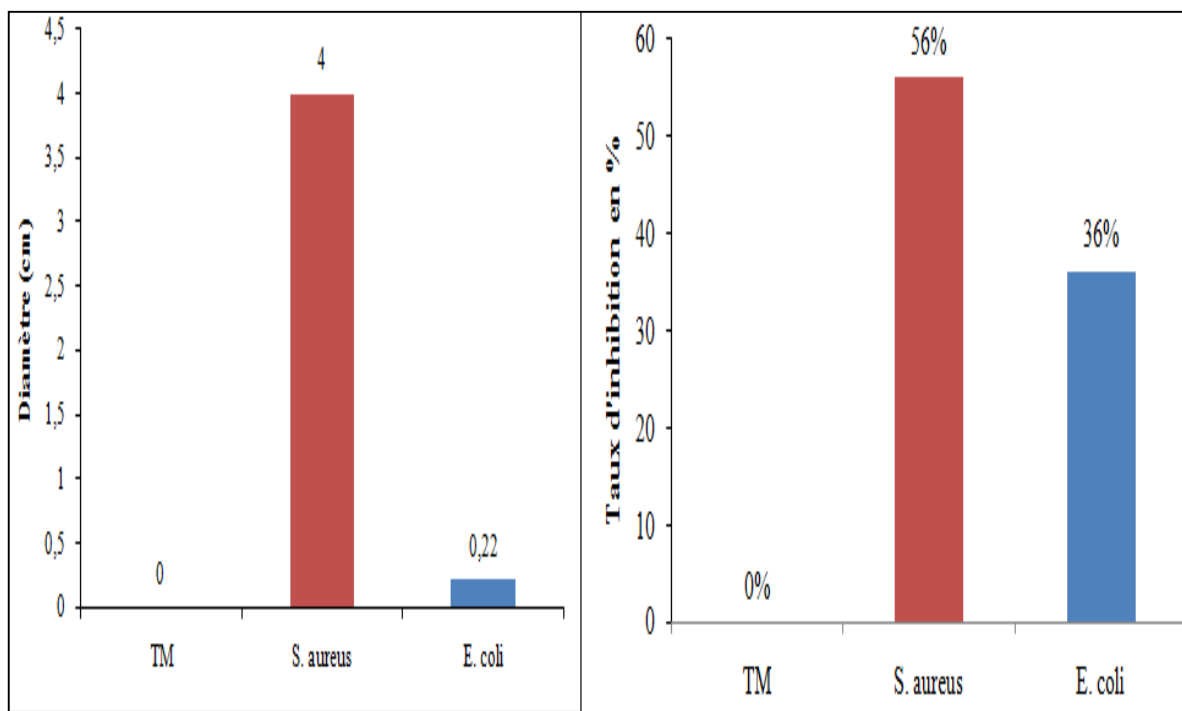


Fig. 31 : Diamètres et les taux d'inhibition de la souche fongique *P. chrysogenum* vis-à-vis *S. aureus*.

Par contre, la souche *E. coli* s'est montrée plus résistante le diamètre d'inhibition et le taux d'inhibition sont très faibles (0,22 cm, 36%) vis-à-vis les métabolites sécrété par *P. chrysogenum* (fig. 31).

Cependant, les autres souches de *Penicillium sp* de la zone d'Ouillis l'effet antagonisme enregistré est très faible. Cela peut être expliqué par une faible potentialité de sécrétion des molécules bioactives. Ce criblage a permis de sélectionner l'isolat de *P. chrysogenum* de la zone de Mamèche comme souche productrice des métabolites antibactériens, et qui va être utilisé la fermentation submergé pour produire les antibiotiques.

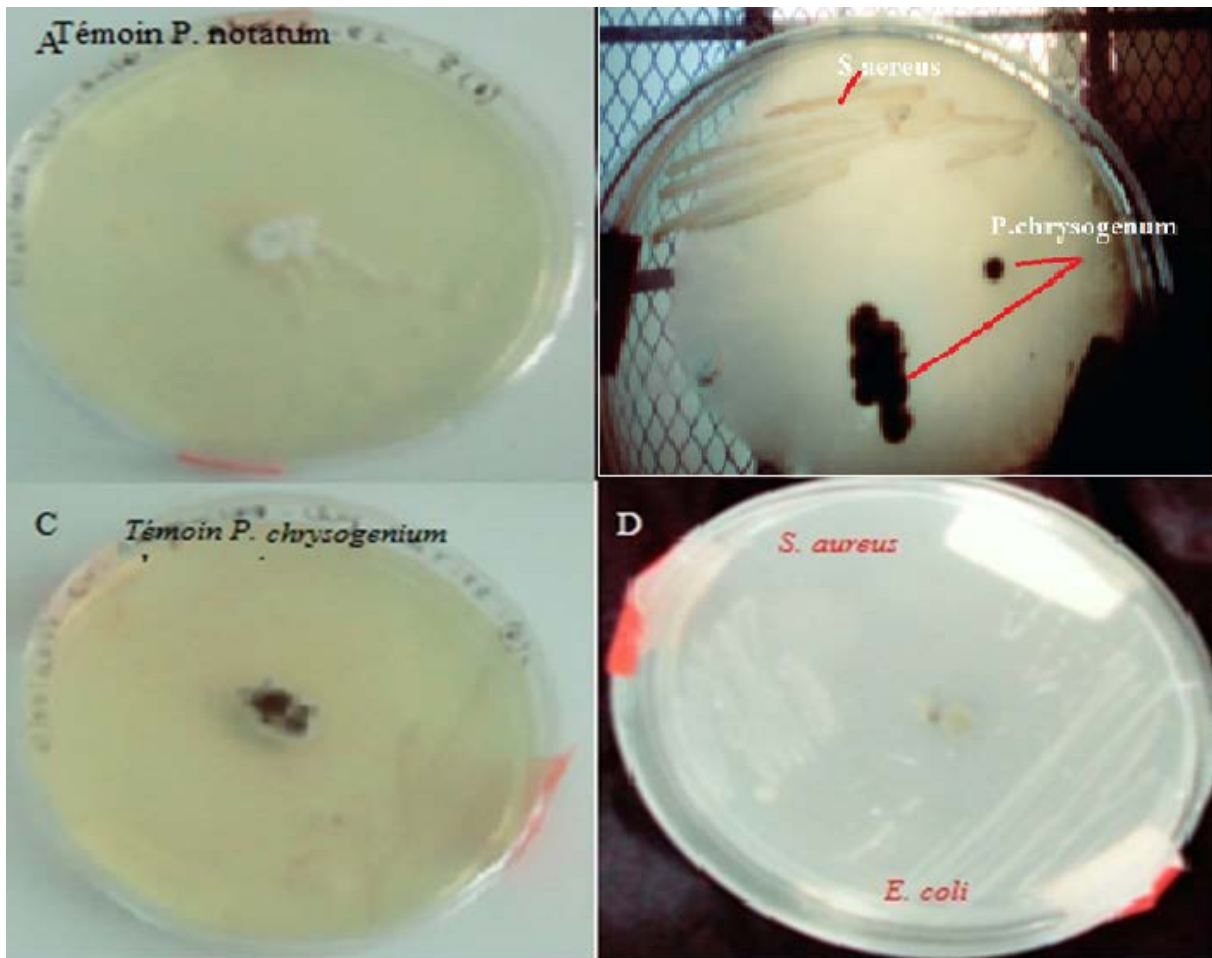


Fig. 32 : Test d'antagonisme de *Penicillium* spp sur les souches *S. aureus* et *E. coli*.

Cependant, il a été découvert par **Alexander Fleming en 1928** que le genre *Penicillium chrysogenum* est connu par sa propriété à produire des antibiotiques (pénicilline G) qui ont un pouvoir antimicrobien contre les bactéries Gram (+) *S. aureus*. Les résultats obtenus s'accordent avec ceux de **Abdelaziz en 2006** qui a remarqué un effet antibactérien *Penicillium* sp très fort vis-à-vis les bactéries Gram (+) telles que *Staphylococcus aureus*, *bacteridium anthradis* et *corynebacterium diphtheriae*.

3. Rendements de l'ATB et de l'huile brute de *P. chrysogenium*

Les rendements des extractions d'ATB

Le résultat de l'utilisation de *P. chrysogenium sp* dans la production de l'ATB correspond au résultat du test de l'antagonisme. On a constaté que la souche présente un rendement élevé de l'ATB d'environ 0,12 g (fig. 33 et 34). Après l'extraction de l'ATB, les mêmes phases organiques récupérées renferment une teneur en huile brute de $12,5 \pm 0,5$ g (fig. 33 et 34).

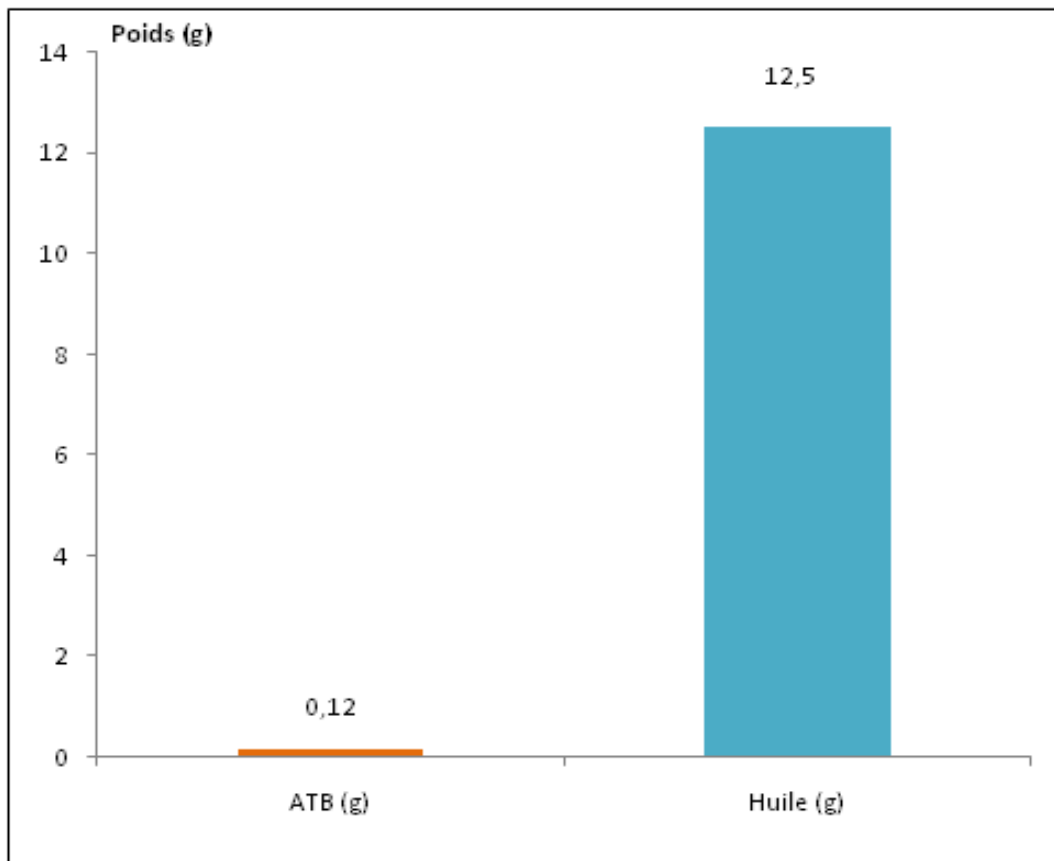


Fig. 33 : Les rendements moyens en poids de l'ATB et de l'huile brute de *P. chrysogenium*.

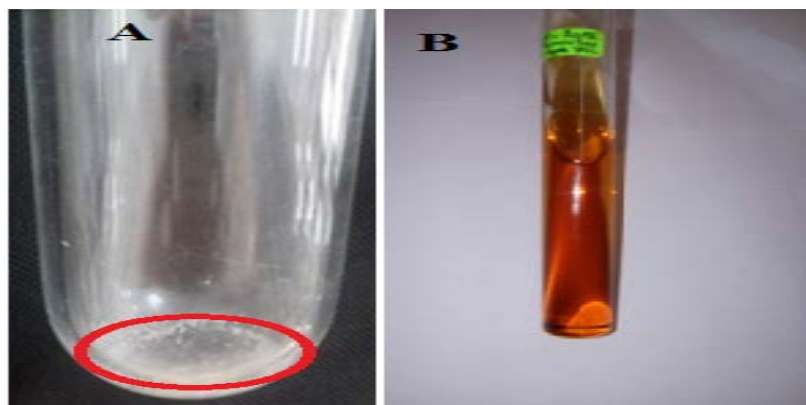


Fig. 34 : Les extraits de l'ATB et de l'huile brute de *P. chrysogenium*.
A : Résidu blanc ATB ; B : Huiles de couleur jaune brun

Après dix jours de fermentation, l'extraction par l'acétate d'éthyle permet d'extraire d'une façon plus efficace une grande quantité d'antibiotique et de l'huile. L'acidification de la phase aqueuse avant l'extraction permis d'éliminé une grande quantité de protéines et des impuretés qui risquent de gêner l'effet des substances actives (James et Gutterson , 1986).

Malheureusement, au cours des différentes étapes de l'extraction, une succession d'erreur de manipulation sont faites, bien sûr cela ce heurte sur le poids obtenu de l'ABT qui reste approximatif, à cause des essais qui sont éliminés.

4. Tests d'antibiogramme des deux extraits (ATB et l'huile)

L'évaluation du pouvoir antimicrobien de l'ATB et de l'huile de *P. chrysogenium* a été déterminée par les mesures des diamètres d'inhibitions en cm autour des disques (fig. 35).

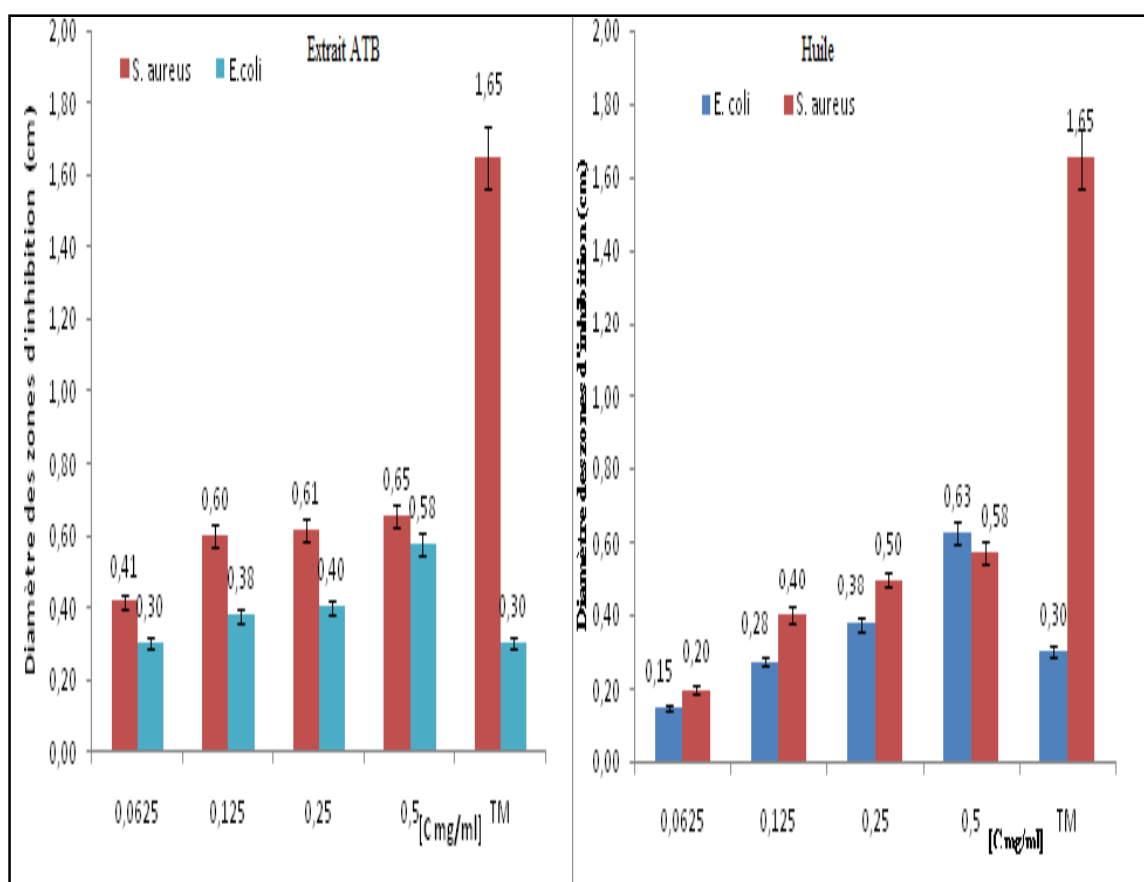


Fig. 35 : Les diamètres des zones d'inhibition des deux extraits de *P. chrysogenium* en présence des deux souches bactériennes.

Les deux extraits de l'ATB et de l'huile sécrétés par les *P. chrysogenium* révèlent un effet antimicrobien remarquable vis-à-vis la souche bactérienne Gram positif et négatif. Les diamètres des zones d'inhibition sont très élevés avec les cultures de *S. aureus* et plus ou moins faibles par rapport à la souche *E. coli* (fig. 35 et 36).

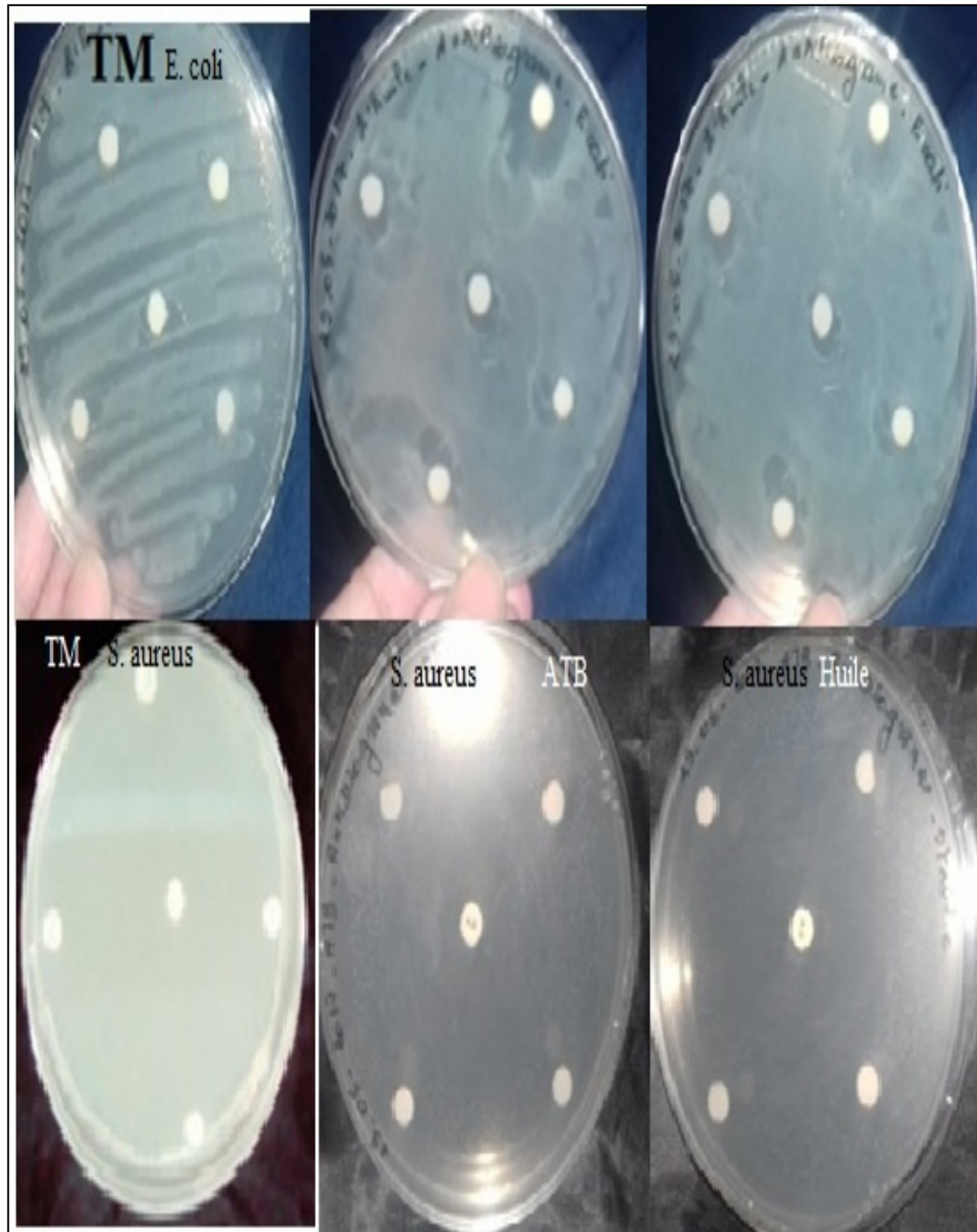


Fig. 36 : La variation des zones d'inhibition des extraits de *P. chrysogenium* vis-à-vis les souches pathogènes.

Les résultats montrent des diamètres de zones d'inhibition de $0,41 \pm 0,18$ à $0,65 \pm 0,47$ cm et $0,30 \pm 0,14$ à $0,58 \pm 0,39$ cm en présence de l'extrait brut de l'antibiotique respectivement pour les souches *S. aureus* et *E. coli*. Comparant, ces diamètres avec les disques de pénicilline pur des cultures témoins qui sont respectivement $1,65 \pm 0,47$ et $0,30 \pm 0,14$ cm pour *S. aureus* et *E. coli*, on constate une forte ressemblance (fig.36). Toutefois, l'huile brute de *P. chrysogenium* présente presque le même effet antibactérien vis-à-vis les deux souches *S. aureus* et *E. coli* avec des légères différences dans les diamètres des zones d'inhibition $0,58 \pm 0,19$ à $0,20 \pm 0,08$ cm et $0,63 \pm 0,35$ à $0,15 \pm 0,06$ cm respectivement (fig. 35 et 36).

La CMI de l'antibiotique est identique pour les deux souches, elle est de 0,0675 mg/ml. Cette valeur est très faible par rapport aux valeurs des CMI de l'huile brute qui représentent 0,125mg/ml et 0,25 mg/ml respectivement pour les souches *S. aureus* et *E. coli*.

Il n'est pas étonnant d'observer un tel comportement des extraits avec les différentes souches, car ces souches sont bien connues pour leur résistance à une large gamme de biocide à cause de la composition chimique de leur paroi cellulaire qui est différentes que se soit pour la souche *S. aureus* Gram+ et *E. coli* Gram- (**Tortora et al., 2003**).

Malheureusement, en ce qui concerne les huiles brutes de *P. chrysogeniums* et leur activité antimicrobienne aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature. L'effet antibactérien des deux extraits d'ATB et de l'huile de *P. chrysogeniums* peut être due principalement à leurs compositions chimiques bioactives tels que les groupements B - lactamines, glycopeptides, aminosides, macrolides et quinolones pour la pénicilline et les insaponifiables, polypénols et les tocophérols pour l'huile. Ces molécules sont douées d'une grande activité biologique, elles sont employées dans les différents domaines pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaires etc. comme des agents bactéricides ou bactériostatiques. Toutefois, on ne peut pas expliquer l'action antibactérienne des extraits bruts, car elle est très complexe comme tout phénomène biologique. Toute étude de valorisation doit commencer par l'extraction, la purification et la caractérisation des substances d'intérêts par les différentes techniques spectroscopiques et chromatographiques.

Cependant, plusieurs études sont réalisées sur les ATB des *P. chrysogenium* confirment les résultats obtenus tels que les travaux de **Kholkhal en 2006** sur la recherche des nouvelles souches fongiques productrices d'antibiotique à partir des sols de la région de Ain Fezza de Tlemcen. Les résultats de **Kachour (2005)** ; **Ladjal (2012)** et **Leghlimi (2013)**, confirment encore les résultats qui sont obtenus sur l'activité biologiques des extraits de *P. chrysogenium*.

Conclusion et perspectives

Dans la présente étude l'isolement et l'identification préliminaire de *Penicillium sp* des sols des deux stations (Mamèche et Ouillis) de Mostaganem sur un le milieu Czapek-dox sélectif révèle un nombre moyen et relative. Un seul isolat dans le sol de la station de Mamèche et deux isolats pour la station d'Ouillis. Basé sur des observations macroscopiques et microscopiques, ces isolats sont identifiés, il s'agit de *P. chrysogenum* pour les deux stations. Il présente un développement rapidement (de 8 jours) sous forme de filament septes d'environ 2 cm, les surfaces sont colonies lisses, poudreuses avec une couleur vert – jaune et souvent de blanc à gris au départ. La croissance est moins rapide de 3 à 7 jours. Le second l'isolat est *P. notatum* présent uniquement dans le sol d'Ouillis, présente les mêmes caractéristiques sauf que, les reliefs sont planes (contour irrégulier) et la couleur est blanc puis bleu vert. Toutefois, on a noté les mêmes observations microscopiques pour les deux isolats de *Penicillium*, présence des conidiophores, des phialides serrées en pénicilles etc.

Le criblage des isolats par le test d'antagonisme a parmi de sélectionné le *P. chrysogenum* de la station de Mamèche au tant qu'une souche productrice des métabolites secondaire pour l'opération de la fermentation des ATB. Son un pouvoir antagoniste vis-à-vis les bactéries *S. aureus* est remarquable, le diamètre de zone d'inhibition est d'environ 4 cm par rapport à la souche *E. coli*.

Les rendements en poids des extraits bruts de l'antibiotique et de l'huile sont respectivement de 0,12 g et de 12,5 g.

L'activité biologique de l'extraits brut ATB de *P. chrysogenum* révèle une CIM très faible de 0,0675 mg/ml vis-à-vis les souches *S. aureus* et *E. coli*. Pour l'huile brute les CMI sont légèrement élevés de 0,125 mg/ml et de 0,25 mg/ml respectivement pour les souches *S. aureus* et *E. coli* et comparant avec celle de l'antibiotique.

Cependant, l'identification des isolats nécessite plus d'études approfondies sur des milieux sélectifs autres que le Czapek-dox, pour une bonne investigation.

En fin, en perspectives, il serait nécessaire de continuer l'étude des métabolites obtenus (ATB et l'huile) par une optimisation des paramètres cultureux afin d'améliorer la production des deux extraits. L'utilisation des techniques chromatographiques (HPLC) et spectroscopiques (IR et RMN) est obligatoire pour une bonne identification de la composition chimique et structurales des molécules.

Aibar, J. (2006). La lutte contre les mauvaises herbes pour les céréales en semis direct : principaux problèmes. Communication orale. Les actes des 3 èmes rencontres méditerranéennes du semi direct. Zaragoza. *Options Méditerranéennes, Série A*, n° (69),p19-26.

Alexander, M. 1977. Soil microbiology (2nd dition), John Wiley and sons. New alimentaire. Dunod Paris: 171-334 and Biotechnology. 107 (13): 689-704.and community composition, and soil carbon and nitrogen pools after incorporation of rye into three California agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 31:221–236.

Arlet G. Panorama épidémiologique des résistances aux antibiotiques en France et dans le monde. *Revue du praticien.* sept 2012;62:962•967.

Atlas, R. M., and R. Bartha, *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, California: Benjamin Cummings, 1997. Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity. *Applied Biochemistry*

Barles, S., Breyse, D., Guillerme, A. & Laeyval, C.. 1999. *Le Sol Urbain*. Collection

Berthelin, 1. & Toutain, F. (1979). *Biologie des sols.* In Duchafour P. & Souchier B (eds) *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol.* Masson, Paris. 121-160

Botton B, Breton A, Fevre M, Gauthier S, Guy PH, Larpent JP, Reymond P, Sanglier JJ, Vayssier Y et Veau P (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2meEd. Masson. 426p

Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P H., Larpent J P., Reymond P., Botton B., Breton A., Fevre M., Gauthier S., Guy P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., Vayssier Y. & Veau P. (1999). Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle.Masson. Paris. P. 12-426.

BOTTON B., BRETON A., PEVRE M., GUY P., LARPENT J.P., VEAU P. (1985) Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle. Masson, Paris, New-York, Barcelone, Milan, Mexico, Sao Paulo.

Bowen GD, Rovira AD (1991) The rhizosphere. In: *Plant roots. The hidden half.* (eds Y. Waisel, et al.), pp. 641- 669. Marcel Dekker Inc., New York, NY. Normalemt 1999 Bruxelles

Calvet, R. (2003). *Le sol Propriétés et fonctions-Tome 1: constitution et structure, champignons mycorhizienne) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et champignons mycorhizienne) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et Cie Editeurs, paris ,796p.*

CLEMENT. M et LOZET. J, 2011. Dictionnaire encyclopédique de science du sol Collection: Sciences sup Company, Baltimore, U.S.A. company. Canada, , pp. 79-82

curves. Eur J Biochem. 240: 584-591.

D. Yala, A. S. Merad, D. Mohamedi, et M. N. Ouar Korich, *Medicine du Maghreb*, 2001,

Davet, P., Rouxel, F. (1997). Détection et isolement des champignons du sol. p.18-19.

DJIGAL. D, 2003. Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et

DOMMERGUES. Y et MANGENOT. F, 1970. Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie Editeurs, paris ,796p

DUCHAFOUR, Ph. (1979): *P édologie. 1 P édog énesis et clasii ication.* Ed. Masson

DUCHAFOUR P., 1983. Abrégé de pédologie.masson-edition. 220 Pages

Ed. Masson. Environmental microbiology. Academic press. A Harcourt Science and technology FACT SHEET. Agriculture and Natural Resources. The Ohio State University, for poultry, International Scientific symposium: Performances and competitiveness in animal *Fourth edn: Blackwell Publishing.*

Gherib.A, 1983 ‘‘Chimie Thérapeutique’’, *Office de Publication Universitaire, Alger, 1*

acid by **Lucas R .W,** immobilized actinomycete (*Kitasatospora* sp.) for soil applications. Current166p.

Girard M., Walter C., Rémy J., Berthelin J., Morel J. 1998, Sols et environnements.

Girard M., Walter C., Rémy J., Berthelin J., Morel J. 2005, Sols et environnements
Collection: Sciences sup .

Gobat J. M., Aragno M. et Matthey W., 1998. Le sol vivant. Bases de pédologie, biologie des sols, Presses polytechniques et universitaires romandes, vol 14, coll. gérer l’environnement, 565pp.

Gobat M., Argano M., Mathey W. (2003). Le sol vivant, France, 509 pages.

Guillaume G., 2000, Pédologie, EF Meymac, 147 p

Guiraud J. P. (1998). Microbiologie alimentaire. Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie Dunod. Paris. P. 7-330.

Habib Semira et Missoum Malika, 2011, Contribution à l’étude comparative de la microflore des sols rhizosphériques d’*Acacia raddiana* et d’Arganier spinosa de la région d’oued-El- ma (wilaya de Tindouf), Université Ibn Khaldoun – Tiaret pp : 9 – 13.

Harjunpaa V., Teleman A., Koivula A., Ruohonen L., Teeri T T., Teleman O.,

Harrigan W.F. & McCance M.E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic press. London. P. 21-277.

Hawksworth, D.L . et Rose , F. , 1970. Quantitative scale for estimating sulphur dioxide pollution in england and wales using epiphytic lichens. *Nature*. 277, 5254 : 145 _ 148.

Henin S., 1976, Cours de physique du sol. Ed ORSTOM: 159P

Hennequin C., Lavarde V., (1998), Infections à *Penicillium*, *Encycl. Med. Chir.* (Elsevier,

Hoog F. and Guarro J.1995. Medical mycology, London.

Hoorman, J. J. et R. Islam. 2010. Understing soil microbes and nutrient recycling.

http://www.Univ-Lyon 1 .Fr/mycolgie/Sitejabo_myco/enseignements/Thèses autres.htm.

industrielle. 2ème édition. Masson. Collection Biotechnologies. P: 34-428.

J. G. Benarous, N. E. Todeschi, P. Ladam, G. Bertho, M. Delaforge J. P. Girault, and J.P.Larpent, J.J. Sanglier, 1989 ; Biotechnologie des antibiotiques. Maisson Paris milan Barcelone Mexico page : 9,10, 20 -22, 104,105.

Kachoure laila 2005 ; identification des moisissures isolées à partir des eaux du lac Oubeira (PNEK) et impact des eaux usées sur leyr diversité , mémoire présentes en vue de l' obtention du diplôme de magister en microbiologie, pp : 191 -192 .

KHOLKHAL (2005). Mycologie. Thèse soutenue dans d'autre université. pp : 26.

Kwak M Y., Rhee J S. (1992). Cultivation characteriscs of immobilized *Aspergillus oryzae*

Kwon – chung K . J., Bennet J.E. Medical Mycology. Lea et Febiger, Londres, 1992, 866 pp. croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3ème cycle de biologie végétal,

la croissance de différente plante. Diplôme de docteur de 3ème cycle de biologie végétal,

Lacoste A., Salanon R. (2001). Eléments de biogéographie et d'écologie. *Ed, Nathan, 318*

LADJAL.S.2012.Activitédes antimicrobienne des métabolites secondaires des champignons endophytes du pin d'Alep (*pinus halepensis* Mill) de la Région de M'sila Algérie (Stif) ; Université FARHAT ABBAS – SETIF. PP : 61,62.

Lavelle P, Spain AV (2001) Soil Ecology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands.

Leclec H., Buttiaux R ; Guillaume J ; Watter P ; 1977. Microbiologie appliquée. Ed :Doin editeur, Paris.P 81-82.

Lenoir J. & Choisy C. (1971). Aptitude de l'espèce de *Penicillium caseicolum* à la production d'enzymes protéolytiques. *Le lait*. 503 :138-159 l'environnement. Presses polytechniques et universitaires romandes.

Leung, K. T, Errampalli, D., Cassidy, M., Lee, H., Hall, B., Trevors, J. T, Okamura, H. & Bach, H.-J. (1997). A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and

- toxicity of chlorophenols in soil. In: **Van Eisas J. D, Trevors J. T & Wellington E. M. H.** (eds) *Modem soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 577-605
- Leveau S. B. & Bouix M. (1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier Apria. P. 110-163
- Lucas R.W; casper B.B ; Jakson J.K ; Balsler T.C, 2007.** Soil microbial communautés and extracellulaire enzyme Activity in the new jersy pinelands. *Soil biol. Biochem.* 39, 2508 – 2519.
- Lundquist, E., L. Jackson, K. Scow, and C. Hsu. 1999.** Changes in microbial biomass
- Madigan M.T., Matinoko J.M & Parker J. (1997).** Brok biology of microorganisms, 8th edn.USA.
- Maier, R. M., I. L. Pepper et C. P. Gerba. 2000.** Microorganisms in surface soils. *In:*
- Mechakra A., Auburger B., Remeuf F. & Lenoir J. (1999).** Optimisation d'un milieu de culture pour la production d'enzymes protéolytiques acides par *Penicillium camemberti*. *Sci. Aliments.* 19 (6) : 663-675.
- MEYER. A, DEIANA. J et BERNARD.A ,2004.** Coure de microbiologie générale, DOIN ÉDITEURS, 2e édition, France. P257*microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 547-575.
- Musy, A., et Soutter, M. (1991).** Physique du sol. Lausanne, Collection gérerPage Paris), *Maladies Infectieuses*, 850-A-11
- Paul E. A. and Clark J. S., 1996.** Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego. *Penicillium marneffe* chez un patient infecté par le HIV, *Presse Med.*, 29, 363-364
- PERRY.J, STALEY.J et LORY.S, 2002.** Microbiologie. Édition par Sinauer Associates .États-Unis. P 160,163, 164,165 phénomènes aux interfaces, Éditions France Agricole.
- Pierzynsky GM., SIMS J. Thomas, Vance GF. 2005,** Soils and environmental. Quality, éd. Taylor & Francis, Etats Unis d'Amérique.
- Pitt J.I., (2000),** Toxigenic fungi and mycotoxins, *Br. Med. Bull.*, 56 (1), 184 – 192
- Pitt, 1.1. 1979.** The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States *Eupenicillium* and *Talaromyces*. pp. 4, 16-23. Academic Press, London.
- Pitt, J.I. 1991.** A Laboratory Guide to Common *Penicillium* Species. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Food Research Laboratory, N.S.W., Australia. Press, New York.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.-M. and Dusart J. (2010)** Microbiologie. De Boeck Université, 1164 pp.
- Prescott., Harly., Klein. (1995).** Microbiologie. 2th ed. Debroeck-wesmael.

price editions. Cambridge university press production, 26-27 avril 2007, Iasi, Roumanie

Quénéa K., 2005. Etude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chronoséquence forêt/maïs (CESTAS, Sud ouest de la France). Thèse de Doctorat. Université de Paris 6 (France).

R. J. Carbajo, J. Chem. Soc., Perkin Trans 2, 1999, 529.

Raoul CALVET, 2003. Le sol propriétés et fonction. tome 1 constitution , structure phénomènes aux interfaces , éditions France Agricole, pp : 82, 84, 89.

Raoul CALVET, 2013. Le sol ,2^e édition ; pp : 36,37 .France.

Raper, K. B. and Thorn, C.1968. A Manual of the Penicillia. The Williams and Wilkins

Robert B et al 1994)Robert B et al 1994) contribution a la recherche d'antibiotiques a partir des champignons ou burkina fa,so "recherche de microorganismes producteurs d'antibiotiqueu

Robert M (1996) Le sol: Interface dans l'environnement, ressources pour le développement. Masson, Paris, Milan, Barcelone.

Samson, R.A. and Pitt, J.I. 1985. Advances in *Penicillium* and *Aspergillus* Systematics.

Sanglier J J., Vayssier Y., Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles importance Sci. **94** (25): 1595-1604.

Shrivastava, S., S. F. D'Souza et P. D. Desai. 2008. Production of indole-3-acetic

Six J., Bossuyt H., Degryze S. et Deneff K., 2004 - A history of research on the link between (micro)aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. Soil & Tillage Research, 79, pp. 7-31.

SMITH J.E. (1994) ; Biotechnology handbooks. Volume 7. Plenum Press, New-York, London.

SMITH J.E., BERRY DR. (1975) ; The Filamentous Fut@. Volume 1. Edward Arnold, London.

SOLTNER D., 1996. Les Bases de la production végétale - Phytotechnie générale – Tome 1 Le Sol. Angers, Collection Sciences et Techniques Agricoles, 18^{ème} Edition

Stephen R., Decker William S., Adney Jennings E., Vzant T B., Himmel M E.(2003).

Subramanian, K. S. and Charest, C. 1998. Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiol. Plant.* **102**: 285–296.

Tabuc C., (2007), Incidence of *Fusarium* species and of their toxins in the compound feeds

Toop, E., Vallaey, T. & Soulas, G. (1997). Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In: **Van Elsas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H.** (eds) *Modem soil*

Trevors, J. T. & Van Elsas, J. D. (1997). Microbial Interactions in soil. In: Van Elsas J. D,

Trichoderma reesei – Association and rate constants derived from an analysis of progress

Ulacio D., Perez C., Pineda Y.J. (1997). Mycoflora in tobacco plant roots (*Nicotiana tabacum*) in portuguesa state, Venezuela. *Bioagro*. **9** (1): 3-11.

VAUBOURDOLLE.M, 2007. Infectiologie 3e édition. Wolters Kluwer SA.P 347,348.

Vaux S, Haus Cheymol R, La ruche G, Rabaud C. Rapport Institut de Veille Sanitaire (INVS) : Surveillance de la consommation et de la résistance aux antibiotiques. France; 2012 nov p. 471- 493. Report No.: 42- 43

VILLES, Economica, Paris. 278p.

White RE. 2006. Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource. .

WHO(2011). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective. (www.euro.who.int)

Wild, 1993. Soils and the environment. An introduction, pp. 281. *In*: Cambridge

Woerther P.L, Andreumont A. Comment expliquer la résistance aux antibiotiques? Revue du praticien. sept 2012;**62(7):967- 971**

Young I.M. and Crawford J.W. (2004) Interactions and Self-Organization in the Soil-Microbe Complex. *Science*, **304**(5677): 1634 -1637

Young I.M., Crawford J. W. and Rappoldt C. (2001) New methods and models for characterising structural hetero-geneity of soil. *Soil and Tillage Research*, **61**: 33-45.

Annexe 01

Les milieux de culture

PDA (Patato Dextrose Agar)

Glucose	20g
Agar	20g
Pomme de terre	200g
L'eau distillée	1000ml
pH	7
Autoclave à 115 oC pendant 20 minutes.	
On infuse 200g de pomme de terre en l'eau distillée pendant 20 min après l'ébullition puis ; on filtre le mélange avec un tissu (ex : mousseline) , on ajoute les autre composition , puis on rempli avec l' eau distillée jusqu'à 1000ml .	

Gélose nutritive

Peptone	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCL	5g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7,2
Autoclave à 115 oC pendant 20 minutes.	

Milieu de CZAPEK-DOX

NO ₃ Na	2g
KCl	0,5g
SO ₄ Mg	0,5g
SO ₄ Fe	0, 01g
KH ₂ PO ₄	1g
Saccharose	30g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml
pH	7
Autoclave à 115 oc pendant 20 minutes	

Gélose de MÜLLER HINTON (MH)

Infusion de viande de bœuf	300mg
Hydrolysate de caséine	17,5g
Amidon	1, 5g
Gélose	20g
Eau distillée	1000rnl
pH	7.4
Autoclave à 115 o C pendant 20 minutes.	

Le milieu YESL

Extrait de levure	20 g
Sucrose	150g
MgSO ₄	0,5
ZnSO ₄ .	0,01
CuSO ₄	0,005
Eau distillée	1000ml
pH	5,5
La stérilisation du milieu se fait à 121°C pendant 20 min.	

2. Annexe 02

Coloration avec le bleu de méthylène

Le mode opératoire consiste:

- On prépare une goutte de suspension de la souche avec l' eau distillée sur une lame
- Réaliser un frottis et le fixer.
- Recouvrir la lame de bleu de méthylène 1 à 2 minutes.
- Rincer à l' eau distillée.
- Sécher la lame entre 2 feuilles de papier Joseph.
- Observation au microscopique aux différents grossissements.