



Universités Mohamed Khider de Biskra

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département des Sciences de la Nature et de la vie

# MÉMOIRE DE MASTER

Sciences de la Nature et de la Vie

Réf: ...

Présenté et soutenu par :

---

Rouabah Rania

Rezgui Amani

Le :25/06/2023

## **Isolement des champignons filamenteux à partir du sol d'une source thermique (Hammam El-Baraka d'El- Hadjab) (Biskra) et étude de leur production d'oxydases**

### Jury :

Mme. Djouamaa Manal	MAA	UMK Biskra	Présidente
Mme .Benguraichi Fatiha	MAA	UMK Biskra	Examineur
Mme .Dendouga Wassila	MCA	UMK Biskra	Encadrante

Année universitaire: 2022/2023

## Remerciements

Louange tout d'abord à Dieu, notre créateur qui nous a donné la force pour terminer ce modeste travail.

Nos profonds remerciements et notre gratitude s'adressent à notre encadreur Mme DENDOUGA Wassila pour sa précieuse aide, ses orientations et le temps qu'elle nous a accordé pour notre encadrement, sa rigueur scientifique et pour la confiance qu'elle nous a accordé tout au long de cette étude.

Mes sincères remerciements vont aussi aux membres du jury pour l'honneur

Qu'ils auront fait en acceptant de juger ce travail.

Nous remercions également l'ensemble du personnel du laboratoire de département de la biologie et de l'agronomie et aussi les personnels de la bibliothèque.

Enfin je remercie toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

## Dédicaces

je dédie ce travail a mon parent est surtout maman pour l'aide et encouragements.

A tous mon frères lumière de mes jours Chaima ,Hanna , Ala , Loai

A mon cher mari yacine qui m'encourage tout jour

Ranya

Avec l'aide de dieu, le tout puissant, ce travail est achevé je

A ceux qui me sont les plus chère au monde, aux deux êtres

qui illuminé ma vie :

A ma chère maman et mon cher papa qui a su se montrer patient, et

encouragement,

A mes chers frères et à mes chères sœurs

À mes amis

Amani

# Sommaire

Liste des tableaux .....	
Liste des figures .....	
Liste des abréviations.....	
Introduction générale.....	01

## Première partie : synthèse bibliographique

### Chapitre 01 Champignons filamenteux

1.Généralité.....	2
2.Caractéristique et morphologie des champignons.....	2
3.Classification des champignons filamenteux.....	3
4.Mode de reproduction des champignons.....	4
5.Mode de vie des champignons.....	5

### Chapitre 02: Enzymes oxydases

1.Généralité.....	6
2.Classification et nomenclature des oxydase.....	6
3.Differenents sources d'oxydases.....	7
4.Proprité et structure des enzymes oxydases.....	7
5.Mécaniseme d'action des enzymes des oxydases .....	7
6.Application des oxydases.....	9

### Chapitre 03: Matériel et Méthode

1.Présentation de la région d'étude.....	10
2.Echantillonage.....	11
3.Préparation des milieux de culture.....	12
4.Préparation des suspensions de sol.....	12
5.Purification.....	12

**6. Identification microscopique et macroscopique.....12**  
**7. Recherche d'oxydase.....13**

**Chapitre 04 Résultat et discussion**

**1. Résultats d'isolement et purification.....14**  
**2. Résultats de Test oxydases.....16**  
**3. Discussions .....17**  
**Conclusion.....19**  
**Bibliographie .....20**  
**Résumés.....**

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Résultats d'isolement des champignons filamenteux a partir du sol thermal.....	14
Tableau 2: Résultats de test oxydases.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

## Liste des figures

Figure 1: Hyphe mycélium .....	2
Figure 2: organisation de la paroi des champignons filamenteux.....	3
Figure 3 : Mode de reproduction de <i>RHIZOPUS</i> (Zygomycètes) .....	5
Figure 4 : Schéma de principe de la dégradation de la lignine par les champignons basidiomycètes de la pourriture blanche .....	7
Figure 5 : Carte de la limites administrative de la wilaya de biskra.....	10
Figure 6 : Photooriginal du site de prélèvement de Hammam El – Baraka (El hadjeb – biskra).....	11
Figure 7 : les étapes d'échantillonnage de sol .....	11

## Liste des abréviations

**Lac** : laccase

**Lip** : lignine –peroxydase

**Mnp** : Manganèses peroxydase

**PDA** : Potato Dextrose Agar

**SAP** : Saburaud Dextrose Agar

**C°** :Degré Celsius

**PPO** : polyphénol oxydase

# **Introduction**

# Introduction générale

Le sol est un biotope riche de différents types de microorganismes, dont la distribution et l'activité de ces populations varient d'un sol à un autre en fonction de nombreux facteurs, à savoir ; les conditions physico-chimiques, la matière organique et la texture du sol. Les champignons représentent l'un des plus importants groupes d'organismes sur terre et jouent un rôle clé dans son équilibre et sa résistance (Dendouga, 2017 ; Mtibaa, 2019) .

Les champignons sont des organismes eucaryotes aérobies qui constituent un règne à part dans le monde vivant , appelé *eumycota*. Ils sont caractérisés par leur mode de reproduction, produisant deux types de spores ; asexuées et sexuées. Ils produisent en effet un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de diffusion et de contamination considérable (Iecellier, 2013 ; Daskalov, 2013)

Les champignons ont la capacité de produire des structures de résistances telles que les chlamydospores et les sclérotés qui peuvent jouer un rôle dans la survie de l'organisme lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (Chaboud, 2013 ; Dugat, 2014). Ces microorganismes produisent également une grande variété d'enzymes extracellulaires assurant la dégradation de presque toutes les macromolécules existantes dans la nature, tels que la chitine, la cellulose, les protéines animales et végétales ainsi que la lignine. Les enzymes produites par les champignons extrêmophiles, isolés des milieux extrêmes, sont qualifiées stables dans les conditions extrêmes de température, de salinité, de pH... (Carlisle et al., 2001)

Certains champignons ont la capacité à dégrader la lignine par la synthèse d'exo-enzymes oxydatives telles les peroxydases à hème, qui sont subdivisées en peroxydases de lignine, peroxydases à manganèse, peroxydases versatiles, et les phénol oxydases, qui sont les laccases (Gassara et al, 2011; Colpa et al, 2014). Ces champignons sont appelés des ligninolytiques ou des lignivores, et sont généralement des Basidiomycètes. D'autres de la classe des Ascomycètes ont montrés leur capacité à produire des enzymes ligninolytiques (Aranda, 2016).

L'objectif du présent travail est d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles à partir d'une source thermale, et de tester leur capacité à produire des oxydases, qui peuvent présenter un intérêt industriel.

**Première partie**  
**Synthèse bibliographique**

# **Chapitre 1**

## **Champignons filamenteux**

## Chapitre 01 : champignons filamenteux

### 1. Généralité

Les champignons sont des organismes eucaryotes de différentes formes appelés aussi "fungi" ou "mycètes" (Houis, 2011 ; Thibault *et al.*, 2016). Il existe plus de 5 millions d'espèces différentes qui jouent un rôle important dans l'écosystème (Sardin, 2016). Morphologiquement les champignons sont composés d'appareil végétatif des organes fonctionnels ainsi que de chlorophylle (Philippe *et al.*, 2005), ce qui en fait des hétérotrophes, ils ont donc besoin d'une source de carbone organique pour se développer (Salenave, 1999), carbone, azote, sels minéraux... (Chabasse, 1999).

### 2. Caractéristique et morphologie des champignons filamenteux

- **Thalle filamenteux** Tout les mycètes possèdent un appareil végétatif constitué de filaments plus ou moins ramifiés regroupés en thalle filamenteux appelé mycélium (Gauthier, 2016).

Il existe deux types de thalle :

- **Thalle siphone**

Constitué d'éléments tubulaire peu ou pas ramifiés de diamètre large et irrégulier (5 à 15  $\mu\text{m}$ ) non cloisonné, ils caractérisent les champignons inférieurs (Zygomycètes).

- **Thalle septé ou cloisonné**

Constitué de filaments de diamètre étroit (entre 2 à 5  $\mu\text{m}$ ) et régulier, divisé par de cloisons en articles uni ou pluricellulaires, ils caractérisent les champignons supérieurs (Ascomycète et Basidiomycètes et Deutéromycètes) (Tabuc, 2007). La figure 01 présente les deux types des

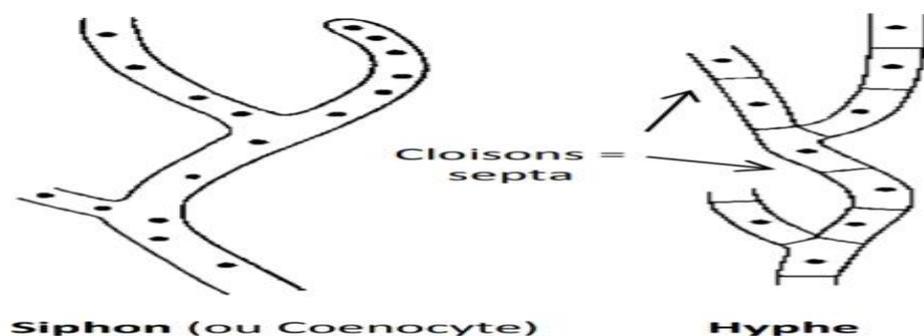


Figure 1: hyphé mycélien (sardin, 2016)

- **Paroi cellulaire**

La paroi cellulaire représente une structure multicouche composé de glycoprotéine, demannoprotéine et de polysaccharide (Saloum, 2001), figure 02.

Les glycoprotéines jouent un rôle dans l'adhérence et les mannoprotéines sont des formateur une matrice dense autour de la paroi (Lecellier, 2013)

Les principaux polysaccharides formant la paroi cellulaire des champignons sont :

- Glucanes : c'est un polymère de glucose liés par  $\beta$ 1,3-,  $\beta$ 1,6-,  $\alpha$ 1,4- ou liaisons  $\alpha$ 1,3-glycosidiques.
- Chitine : c'est un polymère de N\_ acetylglucosamine liés par des liaisons osidiques de type  $\beta$ -1,4 (Jiménez *et al.* , 2012).
- Ces deux polysaccharides assurent la protection des moisissures dans milieu extérieur et la chitine assure la rigidité de la paroi (Lecellier, 2013).

Les  $\beta$ -1,6 glucane jouent un rôle reliant les composants intérieurs et extérieurs de la paroi (Neil *et al.*, 2017).

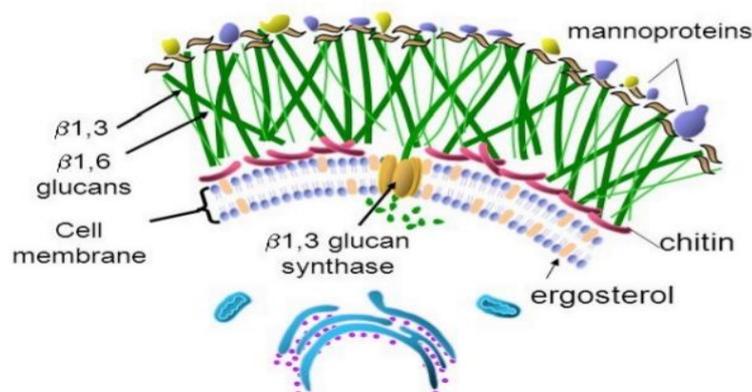


Figure 2:organisation de la paroi des champignons filamenteux (Sardin, 2016)

### 3. Classification des champignons

Les Eumycètes, appelés aussi les vrais champignons sont formés est (Quero, 2018).

- **Zygomycètes**

Ces champignons se caractérisent par la formation des zygospores dans la reproduction sexuée et par des spores endogènes (endospore) dans le cas de la reproduction asexuée,

Les endospores sont des spores immobiles produits à l'intérieur d'un sac fermé (sporocyste) porté par l'extrémité de filaments (Dugat, 2014)

- **Ascomycètes**

Ces champignons se caractérisent par la production des ascospores à l'intérieur des asques et dans la multiplication asexuée aboutit à des conidies au sommet d'un conidiophore (Simon, 2020), dans ce groupe existe six ordres, ces sont : les *Onygnéales*, *Eurotiales*, *Microascales*, *Dothidéales*, *Ophiostomatales*, *Sordariales* (Dugat, 2014).

- **Basidiomycètes**

Ces champignons se caractérisent par la formation des spores sexuées appelées Basidiospores à l'apex de cellules allongées (Marilyne, 2014), porté par un hyménium, il peut être un tube, des lamelles, des aiguillons (Chaboud, 2013).

- **Chytridiomycètes**

Ces champignons sous forme unicellulaire et vivant dans des environnements aquatiques et se reproduisant via de des spores asexuées propulsées par un flagelle (Quero, 2018).

- **Mode de reproduction des champignons**

Les champignons filamenteux se reproduisent par deux phases (Nageleisen *et al.*, 2010) :

- a. Phase asexuée (stade anamorphe)**

Dans ce mécanisme la cellule fongique est basée sur la production des spores asexués soit à l'intérieur des sporocystes (sporange, ou par des conidies à l'extrémité de filaments spécialisés appelés phalides, ou arthrospores résultant de la fragmentation d'un filament mycélium (Diongue, 2019).

- b. Phase sexuée (stade télé morphe)**

Dans cette reproduction est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose (Lopez, 1998), et s'effectue deux formes d'accouplement hétérothallisme ou homothallisme (même individu inverse avec autre système) et ils existent différentes modes de fécondation dans les champignons) (Voir Figure 03) (Strullu, 1999 ; Diongue, 2019)

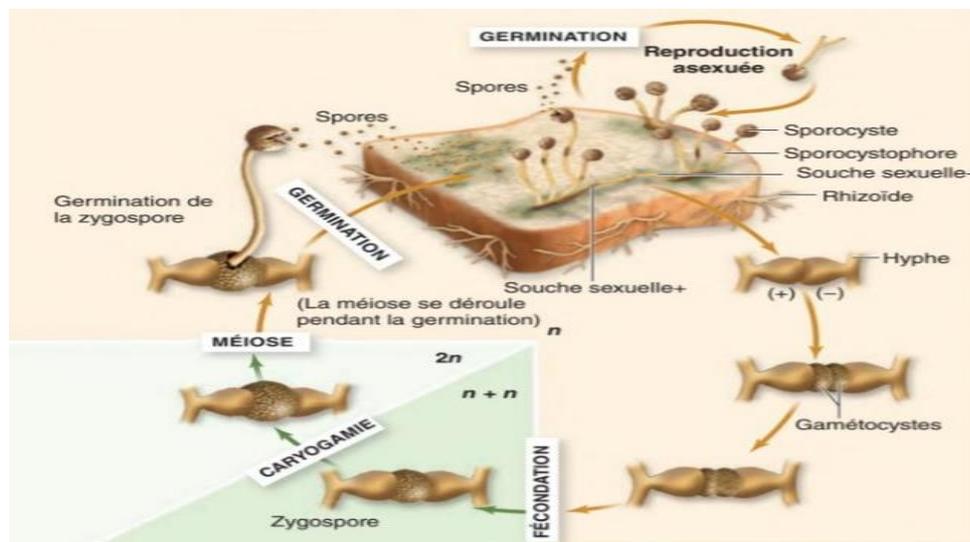


Figure 3: Mode de reproduction de *RHIZOPUS* (zygomycètes) (Peter et al., 2017)

- **Mode de vie des champignons**

Trois modes de vie existent :

- Saprophytisme : C'est la décomposition de la matière organique morte comme source de carbone et d'énergie, tels que les feuilles mortes, les débris végétaux ou animaux ...
- Parasitisme : Certains champignons (20%) sont capables de parasiter, de coloniser et d'exploiter la matière vivante et ils sont souvent pathogènes pour leurs hôtes (Clavez, 2009 ; Lebrun, 2010).
- Symbiose : Ces champignons coexistent avec d'autres organismes autotrophes tels que les algues et forme alors lichen). Ils peuvent coexister également avec des plantes cette relation symbiotique avec le système racinaire est appelée mycorhize, qui permet un échange de nutriments et d'énergie bénéfiques aux deux organismes (Ben Ali, 2021).

# **Chapitre 02**

## **Enzymes oxydases**

## 1-Généralités

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables d'exécuter la plupart des réactions biochimiques avec une vitesse et efficacité extraordinaires (Fabiano, 2002). Elles sont considérées comme des auxiliaires technologiques, en facilitant les opérations de transformation industrielles (l'amidon en sucre simple, la boulangerie, les produits laitiers) Les enzymes sont classées selon une nomenclature internationale (Enzyme Classification, EC), composée de quatre lettres (EC A.B.C.D.), dont le premier chiffre correspond à la classe d'enzyme (Spinnler, 2013).

## 2\_ Classification et nomenclature des oxydases

### ✓ Polyphénol- oxydase

Plusieurs nominations existent pour la PPO, à savoir ; la tyrosinase la crésolase, la catécholase, la diphénolase, la phénolase, la phénol oxydase, l'o- diphénol oxydase et l'acide chlorogénique oxydase, Ces enzymes sont classées en deux catégories : EC 1.14.18.1 – monophénol monooxygénase, et EC 1.10.3.2 p- diphénol oxydase ou laccase (Gouzi, 2014).

### ✓ Peroxydase

Les peroxydases (EC 1.11.1.7) sont des enzymes responsables de nombreuses fonctions de biosynthèse et de dégradation, ce sont des donneurs d'hydrogène en présence de  $H_2O_2$  (Ben Ali, 2021).

### ✓ Lignine peroxydase

Lip (EC 1.11.1.14) Sont des glycoprotéines extracellulaires non spécifique contenant un hème et jouent un rôle crucial dans la dépolymérisation de la lignine (Mtibaa, 2019).

### ✓ Magnésium peroxydase

Mnp: peroxyde d'hydrogène oxydoréductases ,(EC 1.11.1.13), ce sont des glycoprotéines extracellulaires ( Ben Ali, 2021 )

### ✓ Peroxydase versatile VP, (EC 1.11.1.16) Possèdent des activités antérieures et sont présentes chez plusieurs espèces fongiques. Ces enzymes peuvent attaquer directement la lignine, la cellulose et l'hémicellulose dans la paroi cellulaire végétale pour la décomposer (Nancy *et al.*, 2021).

### 3\_Différentes sources d'oxydases

- Phénol oxydases ou ( laccase) et peroxydase : Ces enzymes sont largement retrouvées dans les plants , les animaux , les champignons et même les bactéries (Diao, 2012 ; Ben Ali ,2021).
- Manganèse peroxydases :découverte pour la première fois chez *Phanerocheat echrysosporium*et chez plusieurs autres champignons de la pourriture blanche du bois ( Ben Ali, 2021).
- Peroxydase versatile : Elles sont sécrétées par plusieurs fongiques (Mathieu, 2012).

### 4\_Propriétés et structure des enzymes oxydases

- Les enzymes oxydases diffèrent les unes des autres par leur structure et leurs propriétés, parmi eux les laccases fongiques ; qui possèdent des propriétés biochimiques extrêmement diversifiées selon leur origine. Ceci peut démontrer une hétérogénéité considérable et entraîner des différences de propriétés catalytiques, d'affinité et de spécificité de substrat.
- La structure générale des manganèses peroxydases est similaire à celle des peroxydases de lignine (Mtibaa, 2019).
- Les peroxydases versatiles (VP) d'est un hybride structurel entre la lignine (LiP) et la peroxydase de manganèse (MnP) cet hybride combine les propriétés catalytiques des deux peroxydase ci-dessus, étant capable d'oxyder les substrats Lip et Mnp typique (Basosi *et al.*, 2005).

### 5\_Mécanisme d'action des enzymes des oxydases

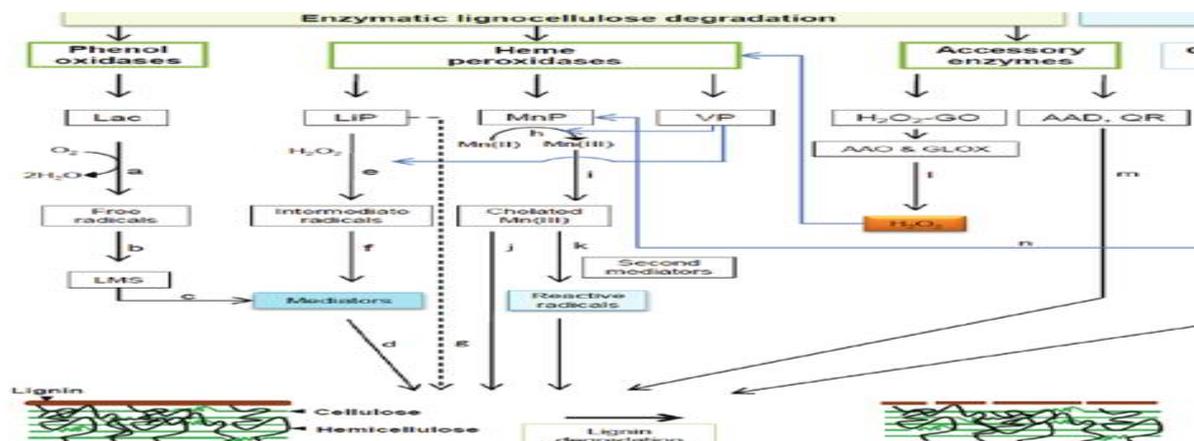


Figure 4:schéma de principe de la dégradation de la lignine par les champignon Basidiomycètes de la pourriture blanche

Les laccases associent la réduction électronique du dioxygène en deux molécules d'eau à l'oxydation d'une grande variété de substrats, tels que les lignines (Figure 1, a), les réactions d'oxydation catalysées par les laccases conduisent à la formation de radicaux libres qui agissent comme substrats intermédiaires pour les enzymes (Figure 1, b). Ces médiateurs peuvent quitter le site enzymatique et réagir avec une large gamme de substrats à potentiel redox élevé et ainsi créer des voies non enzymatiques de réactions de polymérisation ou de dépolymérisation oxydative (Figure 1, c). En fin de compte, le système laccase-médiateur (LMS) devient impliqué dans une gamme de fonctions physiologiques telles que la lignolyse (Figure 1, d)

- Les LiP oxydent les substrats lors de transferts d'électrons en plusieurs étapes et forment des radicaux intermédiaires, tels que des radicaux phénoxy et des cations radicalaires d'alcool vératrylique (Figure 1, e). Ces radicaux intermédiaires subissent des réactions non enzymatiques telles que le couplage radicalaire et la polymérisation, le clivage de la chaîne latérale, la déméthylation et l'addition et le réarrangement intramoléculaires (Figure 1, f), Contrairement aux autres peroxydes, comme MnP, LiP est capable d'oxyder des substrats aromatiques non phénoliques et ne nécessite pas la participation de médiateurs en raison de son potentiel redox inhabituellement élevé (Figure 1, g)

- MnP catalyse l'oxydation dépendante du peroxyde de Mn(II) (en tant que substrat réducteur) en Mn(III) (Figure 1, h), qui est ensuite libéré de la surface de l'enzyme en complexe avec de l'oxalate ou avec d'autres chélateurs (Figure 1, je). Le complexe Mn (III) chélaté agit comme un médiateur redox diffusible de faible poids moléculaire réactif (Figure 1, j), Le potentiel d'oxydation du chélateur Mn (III) n'est limité qu'aux structures de lignine phénolique. Cependant, pour l'oxydation des substrats non phénoliques par Mn(III), des radicaux réactifs doivent être formés en présence d'un second médiateur (Figure 1, k) (Dashtban *et al.*, 2010).

## 6. Application des oxydases

- .Détection de certaines maladies.
- .Détection des composés considéré comme contaminants dans l'industrie alimentaire.
- .Utilise dans industrie alimentaire comme ( lait , le pain ) .
- .Améliorer la conservaibilité des produit alimentaire liquide ( Marzougui, 2012 ).

- .Utilise dans médecine comme biodétecteurs dans l'identification et diagnostic pour quantification des sucres dans les urines et alcool et choline ( Dijkman *et al.* , 2013 ).
- .Employé comme catalyseur dans la bioremédiation des composés phénolique (Delannoy *et al.* , 2004 ).
- Utilise dans traitement des eaux usées contenant des composés phénoliques et des amines .
- .Employé dans l'industrie de textile ( coloration des vêtements).
- .fabrication des sondes d'ADN et ARN (Diao, 2012 ).
- Utilise dans le blanchiment de pâte papetière et produit pharmaceutique et cosmétiques (Czerwiec, 2020 ) .

# **Deuxième Partie**

## **Partie expérimentale**

# **Chapitre 03**

## **Matériel et Méthode**

## 1 . Présentation de la région d'étude

Nous avons choisi le sol thermal comme source d'isolement des champignons filamenteux. L'échantillon de sol est prélevé à partir de Hammam El- Baraka de El hadjeb, wilaya de de Biskra. La wilaya de Biskra est située dans le sud –Est de l'Algérie, où elle occupe une superficie de 21 671,2 Km ,sa hauteur est de 125 mètres au niveau de la mer ses limites territoriales se résumement comme (Sedrati, 2011) (Fig. 05) :

Nord : La wilaya de Batna.

Au nord-ouest : La Wilaya de M'sila.

Au sud-ouest : La Wilaya de Djelfa.

Au sud : La Wilaya d'El Oued.

Au nord-est : La Wilaya de Khenchela.



Figure 5 : Carte des limites administrative de la wilaya de Biskra (Bouchemal, 2017)

## 2. Échantillonnage

Les échantillons de sol ont été prélevés du Hammam El-Baraka d'El-Hadjeb situé à 12 km du l'ouest de la ville de Biskra (Figure 06).



Figure 6:Photo original du site de prélèvement de hammam El-Baraka (El hadjeb –Biskra)

Les échantillons du sol ont été prélevés le 16/05/2023 à une profondeur de 08 cm, en écartant les cinq premiers centimètres. Les échantillons sont prélevés avec une spatule stérile et placés dans des flacons en verre stériles. Les échantillons sont transportés au laboratoire pour les conservés à 4°C (Figure 07).



Figure 7: Les étapes d'échantillonnage de sol

### **3. Préparation des milieux de culture**

Le deux milieu utilisé dans notre travail est SDA (Sabouraud Dextrose Agar) et PDA (Agar Dextrose Potatoes), il s'agit d'un milieu usuel pour la culture de plusieurs espèces fongiques (Mondo *et al.*, 2016) Après stérilisation, les solutions sont refroidies pendant 30 minutes, puis coulées dans des boites de Pétri.

### **4. Préparation des suspensions de sol**

Les suspensions du sol sont préparées en ajoutant à 1g du sol 9 ml d'eau physiologique stérile, cette préparation représente la solution mère). La suspension est agitée pendant 10 minutes à l'aide d'un agitateur vortex (Leghlini, 2013).

L'ensemencement est pratiqué autour d'un bec bunsen, où 1 ml de la suspension du sol est prélevé avec une micropipette dans une boite de Pétri contenant préalablement le milieu de culture gélosé. Une homogénéisation est réalisée en agitant manuellement les boites d'un mouvement circulaire dans le plan horizontal. Les boites inoculées sont incubées à 30°C et observées quotidiennement pendant une semaine (Dendouga, 2017).

### **5 .Purification**

Après l'apparition des premières colonies fongiques, on effectue un repiquage au centre de chaque colonie dans une autre boite Pétrie contenant préalablement le milieu gélosé. L'opération est répétée jusqu'à l'obtention d'un isolat pure. Le repiquage se fait par prélèvement d'un fragment de colonie à l'aide d'une anse stérilise tout en évitant son contact avec les autres colonies avoisinantes de la même boite. Ce fragment est déposé au centre d'une nouvelle boite sur laquelle on indique la date de repiquage et les coordonnées de la boite de prélèvement (Hamidou *et al.*, 2016).

### **6. Identification microscopique et macroscopique**

L'identification des isolats repose sur une observation macroscopique et microscopique (Ruiz, 2007)

- **Étude macroscopique :** Cette étude est basée sur l'observation des colonies à l'œil nu, en suivant les caractères suivants :
  - L'aspect de la colonie : duveteux, laineux, granuleux.
  - La forme de colonie : plat, plissé
  - La taille de colonie : petite, étendue
  - La couleur de colonie : blanche, crème ou colorée (vert, orangé.....)
  - Vitesse de pousse de la colonie (Lecellier, 2013).
- **Étude microscopique :** L'étude microscopique est effectuée selon la méthode de drapeau, en appliquant à l'aide d'une pince un morceau de scotch par sa face collante sur la colonie à identifier, examiné ensuite en présence de bleu coton au lacto phénol. L'observation microscopique est réalisée au objectif  $\times 40$ . L'examen microscopique est basé sur les caractères morphologiques :
  - La forme du thalle ; siphonné ou sépte.
  - La paroi pigmentée ou hyaline.
  - Les spores: endogènes ou exogènes.
  - Le mode de formation des conidies : chaîne ou solitaire (Abdessemed, 2020).

### 7. Recherche d'oxydase

Déposer sur surface d'un milieu gélosé dans une boîte de Pétrie un disque d'oxydase (N,N,N,N tetramethyl -p-phenylenediamine dihydrochloride) et Prélever une partie de la colonie à étudier à l'aide d'une pipette, anse de platine stérile et étaler sur le disque l'observation d'une couleur violet foncé apparaît immédiatement sur le disque ou en

quelques secondes indique un test oxydase (+), dans le cas le disque est incolore, l'isolat est considéré comme non producteur d'oxydase ( Camille, 2014 ).

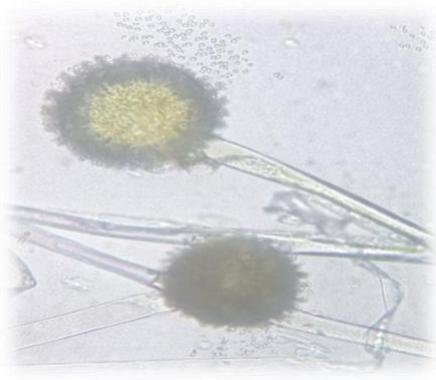
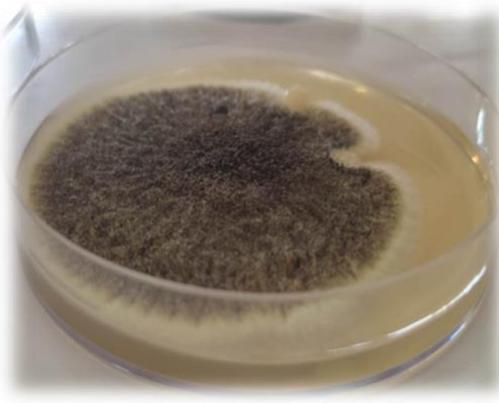
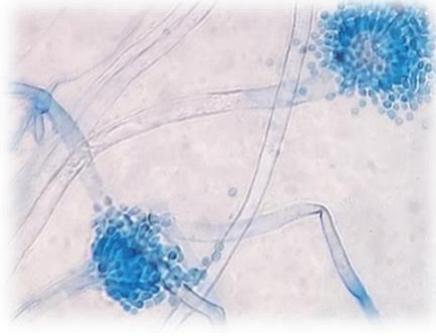
# **Chapitre 04**

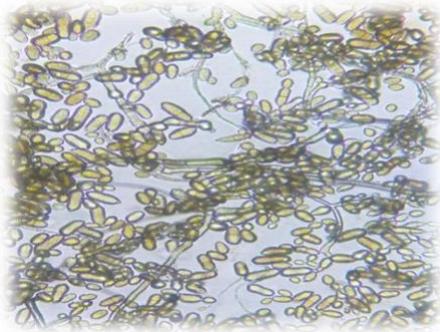
## **Résultats et discussion**

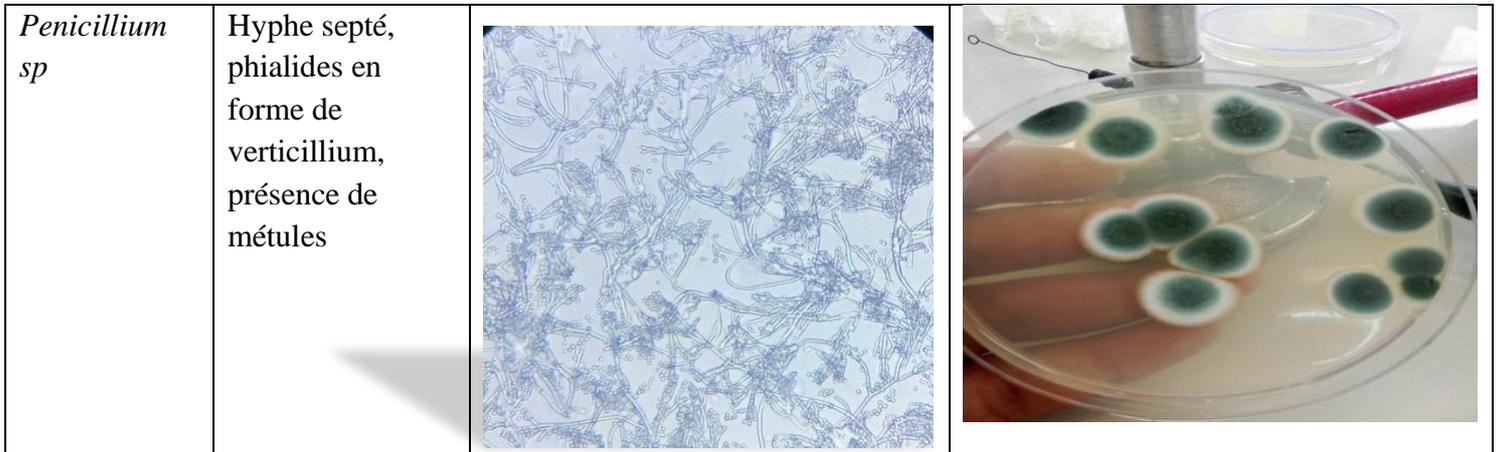
### 1. Résultats d'isolement et de purification

Les résultats d'isolement des champignons filamenteux à partir d'échantillons du sol collectés du Hammam El-Baraka d'El-Hadjeb Biskra ont été résumés dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1:** résultats des isolements des champignons filamenteux à partir du sol thermal

Espèce	Description	Aspect microscopique Au objectif × 40	Aspect macroscopique
<i>Aspergillus niger</i>	Conidies globuleuses brunes souvent disposées en chaînes, phialides formées sur la vésicule, mycélium non cloisonné.		
<i>Aspergillus flavus</i>	Conidiophore long, phialides insérés sur la vésicule sphérique, Conidies globuleuses.		
<i>Aspergillus Fumigatus</i>	Conidiophore court, vésicule hémisphérique, phialides directement portées par la vésicule, densément groupées.		

<p><i>Alternaria</i></p>	<p>Mycélium cloisonné, Conidies lisses d'aspect piriforme ou ovoïde, disposées en chaîne .</p>		
<p><i>Fusarium</i></p>	<p>Mycélium cloisonnée ,Conidiophore simple et courts ,les microconides nombreuses, ovoïdes ou claviformes, Les phialides (monophialides) sont longues et fines.</p>		
<p><i>Cladosporium</i> <i>Sp5</i></p>	<p>Les colonies sont colorées en vertes ,hyphes septées bruns ,conidies formée généralement elliptique à cylindriques et lisse</p>		



## 2. Résultats de test oxydase : le résultats de test oxydases sont présentés dans le tableau 2

Tableau 2: résultat de test oxydase

Espèce	Témoin	Résultat	Interprétation
<i>Cladosporium SP</i> <i>et Alternariasp</i> <i>Fusariumsp</i> <i>Penicillium Sp</i>		+	La réaction de test oxydase positive pour la souche <i>cladosporiumsp et Alternariasp Fusariumsp Penicillium s</i> traduit par le virage de couleur du disque d'oxydase, les espèces possèdent l'enzyme oxydase.
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillusfumigatus</i>		-	Les résultats du test oxydase ne donnent aucun changement de couleur de disque chez les souches, réaction oxydase négative, les souches ne possèdent pas d'oxydase.

Pour l'isolement des champignons filamenteux extrêmophiles, nous avons choisi un milieu extrême thermal situé à El-Hadjeb (Biskra), il s'agit de Hammam El-baraka. Les milieux

extrêmes offrent la possibilité d'isoler des microorganismes extrémophiles, dont leurs métabolites, y a compris les enzymes, sont stables dans des conditions extrêmes . En effet, les enzymes thermostables présentent plusieurs avantages d'application dans le domaine industriel et les différentes applications biotechnologiques(Dendouga, 2017)

Un totale de 8 isolats de champignons filamenteux est obtenu à partir de un échantillons du sol collectés du site de prélèvement, ces isolats appartiennent aux genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium* et *Cladosporium*. *Aspergillus* est le genre dominant avec cinq isolats, suivi par *Penicillium* avec cinq isolats. Plusieurs études ont rapporté la prédominance des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* dans le sol, expliquée par leur grande vitesse de production des spores et leur aptitude de dispersion ainsi que leur résistance aux conditions extrêmes (Demirel et al., 2005 ; Banakar et al., 2012 ; Dendouga et al., 2016 ; Dendouga et al., 2017).

Le deuxième objectif du présent travail était de tester la production d'oxydase par chaque souche fongique isolée, en suivant la méthode des disques imbibés par la suspension fongique. Les résultats obtenus ont montré la présence d'oxydase chez plusieurs isolats appartenant aux genres *Cladosporium sp* et *Fusarium*. Bien que, les isolats appartenant aux genres *Alternaria* et *Penicillium* ont présenté pratiquement un test positif . Le test est considéré positif avec l'apparition d'une coloration bleu foncée à violette dans un délai de 30 secondes, à l'inverse, il est négatif dans le cas d'absence de coloration ou coloration au-delà de 30 secondes.

Plusieurs travaux sont réalisés dans le cadre de cribler des champignons producteurs d'enzymes de la classe d'oxydase. Selon Dassi et al.,2016 parmi 51 souches testées, 31 ont présenté une activité significative d'oxydation du gaïacol exprimée au cours de la première semaine d'incubation. Selon la même référence l'activité ligninolytique des 31 champignons producteurs de laccase a été confirmée par leur capacité à oxyder le colorant industriel commercial (RBBR). Au cours du criblage des champignons sur le gaïacol fait par Batista-García et al. (2017),seulement trois (25%) souches de basidiomycètes (*P. dryinus*, *T. hirsuta* et *P. ostreatus*) ont présenté un test positif. Dans la classe des Deutéromycètes, le genre *Cladosporium*est connu par sa production des enzymes oxydases (laccase). Le travail publié par Djaouani et al. 2014 focalisés sur l'étude de la diversité et le profil hydrolytique

Des micromycètes isolés de Sebkha El melah (tunisie ) a montré la capacité des souches du genre *cladosporium* à produire de laccase .



# **Conclusion**

---

## Conclusion

L'objectif du présent travail est d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles à partir d'une source thermale, et de tester leur capacité à produire des oxydases, qui peuvent présenter un intérêt industriel.

Le choix de Hammam El-Baraka d'El-Hadjar (Biskra) comme site de prélèvement est basé sur deux paramètres principales ; la température élevée (source thermale) et la salinité élevée du sol. Ces conditions extrêmes peuvent augmenter la chance d'isoler des champignons filamenteux extrêmophiles.

Dans la présente étude, on a pu isoler et purifier plusieurs de souches fongiques à partir de un échantillons du sol. L'identification morphologique (macroscopique et microscopique) a permis de déterminer le genre de chaque isolat, et de rapprocher à l'espèce, qui reste à confirmer par les méthodes moléculaires. Les isolats obtenus appartiennent principalement au genre *Aspergillus* et *Penicillium* qui sont les genres dominants dans les différents écosystèmes, en particulier le sol.

La production d'oxydase des isolats fongiques obtenus est testée par la méthode de disques imbibés par la suspension fongique. Les résultats obtenus ont montré la présence d'oxydase chez certains isolats appartenant aux genres *Cladosporium* et *Fusarium*. En effet, avec le test effectué, nous n'avons pas pu corréliser le profil de production d'oxydase à un genre particulier. Cette constatation nécessite un nombre important des isolats appartenant à chaque genre.

En perspective ;

- L'identification moléculaire des isolats obtenus pour la confirmation de leur identité.
- Elargir l'isolement dans le but d'obtenir plusieurs isolats pour chaque genre.
- Caractérisation physico-chimique (température optimale, pH...) des souches productrices d'oxydases.

Produire, purifier, et faire une caractérisation biochimique et moléculaire de l'enzyme d'intérêt.

# Bibliographie

## Bibliographie

- Abdessemed N .2020. Champignons à potentiel mycoherbicide identification. efficacité et formulation. These de doctorat en science agronomique. Ecole nationale Supérieure agronomique El Harrach-Alger, 27 .
- Aranda E. 2016. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Current Opinion in Biotechnology* 38 : 1-8.
- Ben Ali w. 2021 Criblage de la diversité fongique Marine visant à identifier de nouvelles oxydases pour les biotechnologies et de développement durable. De doctora en microbiologie université d'Aix Marseille, 24.
- Banakar, S. P., Thippeswamy, B., Thirumalesh, B. V.,Naveenkumar, K. J. (2012). Diversity of soil fungi indry deciduous forest of Bhadra Wildlife Sanctuary, western ghats of southern India. *Journal of ForestryResearch*, 23, 631-640.
- Batista-García R. A., Kumar V. V., Ariste A., Tovar-Herrera O. E., Savary O., Peidro-Guzmán H., Cabana H. (2017). Simple screening protocol for identification of potential mycoremediation tools for the elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phenols from hyperalkalophile industrial effluents. *Journal of Environmental Management* ,198:pp.1-11
- Ben Ali W. 2021 . Criblage de la diversité fongique Marine visant à identifier de nouvelles oxydases pour les biotechnologie et le développement durable. De doctora en sciences de la vie et de la santé , université d'Aix Marseille avec université de sfax (Tunisie) , 24 -31-32-36-37-38 .
- Bouchemal f. 2017. Diagnostic de la qualité des eaux souterraines et superficielles de la région de biskra . These de doctorat en sciences en Hydraulique, Université Mohammed khider (biskra), 6.

- 
- Basosi R ., Pogani R . 2005 . Radical à base de tryptophane dans la mécanisme catalytique de la peroxydase polyvalente de Bjerkandera adustat. *Biochemistry* ,44 (11) :4267 .
  - Lopez C . 1998 . Isolement identification et physiologiques des champignons thermophiles en vue de la production lipase par fermentation en milieu solide. These de doctorat en biochimie et biologie moleculaire , université de Montpellier II ,23.
  - Carlile, M.J., Watkinson, S.C., Gooday, G.W. 2001. *Fungal diversity. The fungi.* Academic Press. 2nd ed. San Diego San Fransisco, 11-84.
  - Camille D. 2014 . *Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactérie et de levure et mois.* La voisiner libraire France, 114.
  - Chabaud A. 2013. Impact de l'approche moléculaire sur la classification systématique des Agaricomycetidae. These de doctorat en pharmacie, Université Joseph fourrier , 31.
  - Chabasse D ; Guiguen C; Audonneau N. C . 1999. *Mycologie Médicale.* Elsevier Masson , Paris , 1 .
  - Calvez Th .2009. Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. These de doctorat Biologie ,Université dE Rennes 1,11.
  - Colpa, D.I., Fraaije, M.W., van Bloois, E. (2014). DyP-type peroxidases : a promising and versatile class of enzymes. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 41(1), 1-7.
  - Czerwiec Q . 2020 .Evacuation du potentiel ligninolytiques bactérien pour la production de molécules aromatiques. De doctora en science agronomique et biotechnologique agroalimentaires , université de Reims Champagne Ardenne, 25 \_26 .
  - Dashtban M ., Schraft H ., Syed T.A ., Qin W.2010 .Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin . *Int J Biochen mol biol* . 1(1) :36-50.
  - Daskalov A . 2013. Implification des repliements amyloïdes à propriétés prion dans la transduction du signal chez les champignons filamenteux. These de doctorat en sciences et Technologie et santé, université Bordeaux 2, 7 .
  - Daâssi, D., Zouari-Mechichi, H., Belbahri, L., Barriuso, J., Martínez, M. J., Nasri, M., Mechichi, T. (2016). Phylogenetic and metabolic diversity of Tunisian forest wood-degrading fungi: a wealth of novelties and opportunities for biotechnology. *3 Biotech*,

6(1): pp.1-16.

- Dendouga W. 2017 .Impact des facteurs écologiques sur les moisissures antagonistes et productrices des enzymes hydrolytiques. De doctora en microbiologiques Université Ferhat Abbas Sétif 1.35.
- Demirel, R., Ilhan, S., Asan, A., Kinaci, E., Oner, S.(2005). Microfungi in cultivated fields in Eskisehirprovience. J. Basic. Microbiol., 45, 279-293.
- Dendouga.W., BOUREGHDA,H., BELHAMRA,M.,2016.Biocontrol of Wheat Fusarium Crown and Root Rot by Trichoderma spp. and Evaluation of Their Cell Wall Degrading Enzymes Activities,Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica 51 (1), pp. 1–12.
- Delannoy É ., Marmey P ., Pemel C., Nicole M .2004 . Les peroxydases végétal classe III. Acta Botanica Gallica, 151 (04):372.
- Dijkman Willem P Gonzalo Gonzalo : Matevi Andrea ; FraaijeMarco; 2013. Flavoprotéines oxydases ; classement et applications. Microbiologie appliquée et biotechnologie, 97 (12) , 1585
- Diao M . Dramane B . 2012 .peroxydase des plantes Supérieures du Burkina faso: application La bioremédiation des composés phénolique des effluents des Tannerie . These de doctora en Sciences Appliquées, université de Ouagadougou , 14 - 15 -16.
- Diongue kh. Etude Épidémiologique mycologique et molécule des champignons isolés au CHU le Dantec de Dakar de 2014 à 2017. These de doctorat en parasitologie et mycologie, université Cheikh anta diop de Dakar, 12-13 -17-18.
- Dugat M . 2014. Apport de la spectrométrie de la masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de Mycologie Médicale. These de doctora en Médecine, université de Limoges, 7.
- Simon É. 2020 .Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongiques. These de doctorat en biologie médicale, université de Rouen Normandie UfR santé département pharmacie, 28.

- fabiano S. 2002 . Immobilisation d'enzymes dans films de polymères conducteur : le PEDT . Application à la réalisation de biocapteur ampérométriques pour le dosage du glucose et de composés phénoliques. De doctora en chimie et biochimie, université Claude Bernard Lyon I ,01.
- Jaouani,A., Neifar, M., Prigione, V., Ayari, A., Sbissi, I., S Ben Amor,S., Ben Tekaya, S., Varese, G.C., Cherif,A., Gtari,M.,2014.Diversité et profilage enzymatique des micromycètesj halotolérants de Sebkh El Melah, salar saharien à Sud tunisien .Biomed Res Int.(2014):4- 5-6-7-8.
- Jiménez D .F.D., Luis A., García P., José A., Alvarez M.,Hector M., Montes M.2012.Role of the fungal cell wall in pathogenesis and antifungal resistance. Cur fungal infect Rep. 6 : 276 .
- Gassara, F., Brar, S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. (2013). Bisphenol A degradation in water by ligninolytic enzymes. Chemosphere, 92, 1356-1360.
- Gauthier A . 2016 . Les Mycotoxines dans l'alimentation et leur incidence sur la santé. Thèse de doctorat en pharmacie, université de Bordeaux, 21.
- Gouzi H .2014 . Extraction et caractérisation biochimique des polyphénol oxydases de champignons et leur application en biocatalyse supportée . de doctora en Chimie-Physique , Université Pierre et Marie Curie Paris VI, Université Abou Bekr Belkaid (Tlemcen, Algérie) , 5.
- Houis f . 2011. Les champignons de la famille des tricholomatacées source d'innovation thérapeutique ?. Thèse de doctorat en Pharmacie , université de Nantes, 10.
- Leghlini H. 2013. Cellulase de souches fongiques. issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales).sélection des souche et etude des caractéristiques des enzyme. De doctora en Co\_tutelle ,université de Reims Champagne Ardenne,
- Louis Michel Anglaise; François Xavier Saintonge; Dominique Piou: Philippe RiouNivert: 2010 La santé des forêts CNPFIDE, France 120.
- Lebrun J . D . 2010 . Biodiversité fonctionnelle fongique : Indicateur d'écotoxicité des

métaux dans les sols ? . de doctora en Biologie Intégrative et Santé et Environnement , Université de Rouen, 33.

- Lecellier A. 2013. Caractérisation et identification des champignons filamenteux par spectroscopie vibrationnelle . These de doctora en Biologie et biophysique ,Université de Reims Champagne Ardenne ,16.
- leghlini H. 2013. Cellulase de souches fongiques. issue du sol d'un milieu extrême (sol proche de sources thermales).sélection des souche et etude des caractéristiques des enzyme. De doctora en Co\_tutelle ,université de Reims Champagne Ardenne, 25.
- lopez C .1998. isolement identification et physiologiques des champignons thermophiles en vue de la production lipase par fermentation en milieu solide. These de doctorat en biochimie et biologie moleculaire , université de Montpellier II ,23.
- Marzougui S M . 2012 .Peroxydase d'origine végétale : purification, caractérisation biochimique, immobilisation et application dans la détermination des peroxydes au niveau des aliments conservés. de doctora en biochimie applique, Université Badji Mokhtar Annaba, 42 .
- Mathieu Y .2012 . Diversité écologique et fonctionnelle des champignons décomposeurs de bois : l'influence du substrat de la communauté à l'enzyme. de doctora en enbiologie végétale et forestière , l'Université de Lorraine 49 \_ 50 .
- Mondo J., Balezi A., Hugomaka V., Zigashanel., Bagula E.,Kashosi Th., Mputu J.,Mushagalusa G.2016. Effet des milieux de culture (PDA,SDA,SPDA, blé de maïs) sur la productivité in vitro de la souche P926 de *Pleurotus stratus* (Jacq)humm Afrique science. 12(04) :376.
- Mtibaa R . 2019. Isolement et étude de souche fongiques thermotolérantes productrice de laccases à Partir de sols des régions arides en bioremediation. These de doctorat en génie biologique, université de Sfax, 5-13.
- Nageleisen I M . Dominique P. Xavier S.F . Philippe R .N . 2010 .La santé des forêts CNPFIDE, France ,120.
- Ruiz N . 2007. Micromycètes et métabolites fongique en milieu marin.these de doctorat en mycologie et mycochimie. Université denantesuer dessciences pharmaceutiques, 17.
- Nancy Sofia ;Hernandez Bueno ; Ramon Suárez ; Rodríguez; Edgar BalcazarLópez; Jorge Luis FolchMallol ; José Augusto Ramírez Trujillo ; Gabriel Iturriaga, 2021 Une peroxydase polyvalente du champignon *Bjerkandera adusta* confère une tolérance au stress abiotique aux plants de tabac transgéniques. *Plantes (Bâle)* 10 (5), 859.

- 
- Neil A T .Gow ; Jean P 1 ; Carol A M . 2017 .the fungal cell wall : structure biosynthèse and function .microbiologie Spectrum 5 : 3-4 .
  - Péter H Raven: George B Johnson Kenneth A MAson; Jonathan B losos; Susan R Singer : 2017. Biologie (4 édition), de boeck supérieure, Paris, 626 .
  - Philippe B ; Jean L; Guigmard ; Pouchus Y . F . 2005 . Les champignons : Mycologie fondamentale et appliquée . Masson , Paris . 1.
  - Quero L . 2018 . Développement de la spectrométrie de masse Maldi-TOF pour l'identification des champignons filamenteux d'intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides. These de doctorat en Ecologie et Géosciences et Agronomie et Alimentation ,Université De Bretagne Occidentale , 10.
  - Raven P. H . George B. Johnson .Kenneth A. MAson. Jonathan B . losos .Susan R. Singer .2017. Biologie (4 édition), de boeck supérieure, Paris, 626 .
  - Ruiz N.2007. Micomycetes et metabolites fongiques en milieu marin . These de doctorat en Mycologie et Mycochimie. Université de Nantesufr des sciences pharmaceutiques , 17.
  - Sardin S . M . 2016. études physiologiques et moléculaires de l'adaptation des mucor aux matrices fromagères . Thèse de doctorat en microbiologie , université de bretagne occidentale, 9 .
  - Salenave C. 1999 . Etude de la Flore fongique des zones Conchylicoles De L'estuaire de la Loire Recherche de souches Toxinogenes . These de doctorat Sciences de la Vie et de la Santé , université de Nantes , 19
  - Saloum .M .2001. Études des champignons contaminants de l'air dans les hôpitaux de Dakar. These de doctorat en pharmacie ,université cheikh anta diop de Dakar,10
  - Sedrati N. 2011. Origines et caractéristiques physico-chimiques des eaux de la wilaya de biskra sud est Algérien. De doctora en science, université de Badji Mokhtar annaba ,01
  - Spinnler H. E . 2013 . Enzymes d'intérêt pour l fabrication d'aliments . Techniques de l'ingénieur , 650 ( 1 ) , 1\_3.
  - Simon É . 2020 . Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongiques. These de doctorat en biologie médicale, université de Rouen Normandie UfR santé département pharmacie, 28 .
  - Strullu, D. 1991. Les mycorhizes des arbres et des plantes cultivées. Paris: tec et doc.lavoisier.

- Tabuc C . 2007. flore fongiques de différentes Substrats et conditions optimales de production des Mycotoxines . These de doctorat en pathologie et mycologie et génétique et Nutrition, Université de Bucarest, 18.
- Thibault Maurice ; Tweddell Russell J . 2016 . Champignons Moléculaire bioactives d'intérêt Médical et pharmacologiques . Lise Morin . Canada , 1 .

**ملخص:**

في إطار فصل الفطريات الشعرية المحيطة بالظروف المتطرفة، تم جمع عينات تربة من حمام البركة في (بسكرة) كموقع للأخذ منها. تم استخدام طريقة التخفيف والتعليق لفصل العديد سلالات من العفن. أكد التحديد المجهرى والماكروسكوبى أن العزلات التي حصلنا عليها تنتمي إلى الأجناس التالية : *Aspergillus* و *Fusarium* و *Penicillium* و *Alernaria* و *Cladosporium*. تم اختبار قدرة كل عزلة على إنتاج إنزيمات الأكسدة باستخدام أقراص الأكسدة. أظهر هذا الاختبار وجود إنزيم السيتوكروم أكسيداز (نتيجة إيجابية) في *Cladosporium* و *Fusarium* و *Alernaria* و *Penicillium*، بينما كانت النتيجة سلبية في حالة *Aspergillus*.

**الكلمات المفتاحية:** الفطريات الشعرية ,تربة ,سلالات,إنزيمات الأكسدة

**Résumé**

Dans le cadre d'isoler des champignons filamenteux extrémophiles, un échantillon du sol ont été collectés de Hammam El-Baraka d'El-Hadjar (Biskra) comme site de prélèvement. La méthode de suspension-dilution a permis d'isoler plusieurs souches de moisissures. L'identification microscopique et macroscopique a confirmé que nos isolats appartiennent aux genres : *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alernaria*, *Cladosporium* ,La capacité de chaque isolat à produire des enzymes oxydases est testée par l'utilisation des disques oxydases. Ce test a révélé la présence de cytochrome oxydase (test +) chez

*fusarium*, *Alernaria*, *Penicillium* et il est négatif chez *Aspergillus*.

**Les mots clés :** champignons filamenteux ,sol ,genres ,enzymes oxydases

**Abstract:**

As part of isolating extremophilic filamentous fungi, soil samples were collected from Hammam El-Baraka in El-Hadjeb (Biskra) as the sampling site. The suspension-dilution method allowed for the isolation of many mold strains. Microscopic and macroscopic identification confirmed that our isolates belong to the genera: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Alernaria*, and *Cladosporium*. The ability of each isolate to produce oxidase enzymes was tested using oxidase discs. This test revealed the presence of cytochrome oxidase (test +) in *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alernaria*, and *Penicillium*, while it was negative in *Aspergillus*.

**Keyword :** filamentous fungi ,soil ,genera ,oxidase enzymes