

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji, Laghouat  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -  
كلية العلوم  
قسم البيولوجيا



*Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention de Master en Sciences  
Biologiques*

*Option : Microbiologie Appliquée*

**Thème**

**Techniques d'isolement et d'identification d'espèces  
halotolérantes d'*Aspergillus* à partir de milieux terrestres  
salins**

**Réalisé par :**

*Hadjer ALLALI*

Nesrine BENMANSOURE

Dehiba BOUTERFAYA

**Soutenu le 26 Octobre devant le jury composé par :**

**PRESIDENT :** Mr. Youcef BOUBRIMA, Maître Assistant A, Département de Biologie

**EXAMINATRICE :** Mme Djamila AMEUR, Maître Assistant A, Département d'Agronomie

**PROMOTRICE :** Mme Djalila TAKHI, Maître Assistant A, Département de Biologie

**Année universitaire : 2019-2020**

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Amar Telidji, Laghouat  
Faculté des Sciences  
Département de Biologie

جامعة عمار ثليجي - الأغواط -  
كلية العلوم  
قسم البيولوجيا



*Mémoire de fin d'études En vue de l'obtention de Master en Sciences  
Biologiques*

*Option : Microbiologie Appliquée*

**Thème**

**Techniques d'isolement et d'identification d'espèces  
halotolérantes d'*Aspergillus* à partir de milieux terrestres  
salins**

**Réalisé par :**

*Hadjer ALLALI*

Nesrine BENMANSOURE

Dehiba BOUTERFAYA

**Soutenu le 26 Octobre devant le jury composé par :**

**PRESIDENT :** Mr. Youcef BOUBRIMA, Maître Assistant A, Département de Biologie

**EXAMINATRICE :** Mme Djamila AMEUR, Maître Assistant A, Département d'Agronomie

**PROMOTRICE :** Mme Djalila TAKHI, Maître Assistant A, Département de Biologie

**Année universitaire : 2019-2020**



## *Remerciements*

### *Remerciement et Louange à Dieu Seigneur des Mondes*

*Nous tenons à remercier notre promotrice Madame TAKHI Djalila pour nous avoir fait l'honneur de diriger ce travail afin de le mener à bien. Nous la remercions pour ses précieux conseils, ses remarques avisées et de nous avoir souvent incités à approfondir nos connaissances. Pour tout cela nous lui sommes sincèrement reconnaissantes.*

*Nos remerciements les plus sincères vont aux membres du jury : à M. BOUBRIMA et à Mlle AMEUR, pour nous avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et de l'enrichir par leurs remarques.*

*Nous tenons à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué de près ou de loin à notre formation.*

*Nos sentiments de reconnaissance vont également à tous nos camarades de la promotion 2019 /2020 pour leur aide.*



## *Dédicaces*

*Je dédie ce mémoire :*

*A mes chers parents. Je vous remercie pour votre patience, amour, soutien et votre encouragement. Pour toutes les belles choses qui ont fait de moi ce que je suis.*

*A mes sœurs Djihan, Souad, Wahiba, Ikram et Salîha ; celles qui partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail.*

*Sans oublier l'ensemble de mes enseignants, ceux qui ont façonné mon parcours d'apprentissage, du primaire jusqu'à l'université.*



*Allali Hadjer*



## *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire :*

*A ma mère Mebarqa et mon père Tayeb, qui m'ont soutenu durant toutes mes années d'études, que Dieu les garde et les bénisse.*

*A mon cher frère Boubakeur, pour son soutien tout le long de mon parcours académique.*

*A mes chères sœurs Aicha et Zohra.*

*A tous les membres de ma famille qui m'ont aidée durant mes études, particulièrement ma chère cousine Amina.*

*A toutes mes chères amies : Chaima, Fatiha, Mebarqa, Naima, Ndjwa et Wafa.*



*Bouterfaya Dehiba*



## *Dédicace*

*À celle qui a le paradis sous ses pieds, à celle qui m'a soutenue à chaque instant, ma chère maman, Djamila.*

*À celui qui est ma force dans cette vie, une des portes du ciel, à lui tout le Respect et ma sincère appréciation, Abed Alkader*

*À mon partenaire de vie mon cher mari Saddam Hocine*

*À tous les membres de ma famille, en particulier mes frère et sœurs  
Abed Nour, Moussa, Anware, Bouchera et Mariem*

*À tous les enseignants qui nous ont aidés, en particulier notre promotrice, madame Takhi Djalila*

*À toutes mes amies, en particulier mes partenaires dans ce travail,  
Dehiba et Hadjer*



*Benmansoure Nessrine*

## **Technique d'isolement et d'identification d'espèce halotolérantes d'*Aspergillus* à partir de milieu terrestre salés**

### **Résumé**

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux largement répandus dans la nature, particulièrement dans les milieux salins. Ces champignons peuvent présenter à la fois des formes sexuées et des formes asexuées.

Les études sur l'isolement et l'identification des *Aspergillus* halotolérants terrestres reposent sur l'étude de leurs caractères morphologiques et phylogénétiques. L'identification moléculaire de ces champignons repose sur le séquençage et comparaison des séquences des gènes du cluster ribosomique (ITS, ARNr) ainsi que d'autres marqueurs génétiques.

L'analyse des résultats d'études mycologiques, réalisées sur 12 sols salins et non salins, a montré que deux régions non salins (Ein gedi et le barrage Kotri) et les 10 autres régions salines (rive du Lac Pomorie, Rive de la Mer Morte, la rive du lac Baskunchak, le Park national du lac Urmia, La grotte d'Atacama, Plaine salées d'Oklahoma, la zone AL-Shega, Sol salé à Adrar, la Sebkha El Melah Tunisie et d'Oran) montre la présence prononcée des espèces du genre *Aspergillus* (6.68%). Les caractéristiques physiologiques optimales de croissance de la majorité des espèces isolées sont un pH neutre, des températures autour de 25 à 30°C, et une faible salinité.

La présence des espèces communes entre les régions salins et les régions non salines tel que *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* et *A. niger*, *A. candidus*, *A. fumigati* affinis conclu que ce sont des espèces halotolérantes capables de s'adapter conditions extrêmes. Par ailleurs, *A. repens* semblerait être une espèce halophile.

**Mots clés :** *Aspergillus* halotolérant, sols salins, isolement, identification

## **Isolation and identification of halotolerant *Aspergillus* species from saline terrestrial environments**

### **Abstract**

*Aspergillus* species are filamentous fungi widely distributed in nature, particularly in saline environments. These fungi can present both sexual and asexual forms.

Studies on the isolation and identification of terrestrial halotolerant *Aspergillus* are based on the study of their morphological and phylogenetic characters. The molecular identification of these fungi is based on the sequencing and comparison of the sequences the ribosomal cluster genes (ITS, rRNA) as well as other genetic markers.

Analysis of the results of mycological studies, carried out on 12 saline and non-saline soils, showed that two non-saline regions (Ein Gedi and the Kotri dam) and the 10 other saline regions (shore of Lake Pomorie , Dead Sea shore, Lake Baskunchak shore, Lake Urmia shore, Atacama Cave, Oklahoma Salt Plain, AL-Shega area, Salty soil in Adrar, Sebkha El Melah of Tunis and of Oran) shows the pronounced presence of the species of the genus *Aspergillus* (6.68%). The optimum physiological growth characteristics of the majority of the isolated species are neutral pH, temperatures around 25 to 30 ° C, and low salinity.

The presence of common species in both saline and non-saline regions such as *A. terreus*, *A. fumigatus* *A. ochraceus* and *A. niger* *A. candidus*, *A. fumigatiaffinis* demonstrate that they are halotolerant species capable of adapting to extreme conditions. On the other hand *A. repens* appears to a halophilic species.

**Key words :** Halotolerant *Aspergillus*, saline soils, isolation, identification.

## عزل وتحديد أنواع فطريات *Aspergillus* من بيئات أرضية مالحة

### الملخص

فطريات *Aspergillus* هي فطريات خيطية منتشرة على نطاق واسع في الطبيعة ، خاصة في البيئات المالحة. يمكن أن تقدم هذه الفطريات أشكالاً جنسية وغير جنسية.

تعتمد الدراسات التي أجريت على عزل وتحديد خصائص فطريات *Aspergillus* الأرضية على دراسة خصائصها المورفولوجية والتطور. يعتمد التحديد الجزيئي لهذه الفطريات على التسلسل والمقارنة بين متواليات جينات الكتلة الريبوزومية بالإضافة إلى علامات جينية الأخرى.

أظهر تحليل نتائج الدراسات التي أجريت على 12 تربة مالحة وغير مالحة أن منطقتين غير مالحتين (عين جدي وسد كوتري) والمناطق العشر الأخرى المالحة (شاطئ بحيرة بوموري وشاطئ البحر الميت، يُظهر شاطئ بحيرة باسكونتشاك، شاطئ بحيرة أورميا ، كهف أتاكاما ، سهل ملح أوكلاهوما ، منطقة الشقة ، التربة المالحة في أدرار ، سبخة الملح في تونس ووهران) الحضور الواضح لأنواع جنس *Aspergillus* (6.68%). خصائص النمو الفسيولوجي المتلى لغالبية الأنواع المعزولة هي الأس الهيدروجيني المحايد، ودرجات الحرارة من 25 إلى 30 درجة مئوية، والملوحة المنخفضة.

إن وجود الأنواع الشائعة في كل من المناطق المالحة وغير المالحة مثل *A. niger* و *A. fumigatus* و *A. ochraceus* و *A. terreus* و *A. candidus* و *A. fumigati affinis* ، يثبت أنها أنواع مقاومة للملوحة وقادرة على التكيف مع الظروف القاسية. من ناحية أخرى، يظهر من الدراسات ان *A.repens* فطر محب للملوحة.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus* المتحملة للملوحة، التربة المالحة، العزل ، التعريف.

Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	
<b>Dédicaces</b> .....	
<b>Résumé</b> .....	
<b>Liste des figures</b> .....	
<b>Liste des tableaux</b> .....	
<b>Liste des abréviations</b> .....	
<b>Glossaire</b> .....	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I: Rappels Bibliographiques</b> .....	3
<b>II.1. Généralités sur les <i>Aspergillus</i></b> .....	3
<b>II.2. Taxonomie des <i>Aspergillus</i></b> .....	4
<b>II.3. Les caractères morphologiques des <i>Aspergillus</i></b> .....	5
<b>II.4. Isolement et identification morphologique des <i>Aspergillus</i></b> .....	9
<b>II.4.1. Isolement de champignons à partir des biotopes terrestres salins</b> .....	9
<b>II.4.2. Identification morphologique des <i>Aspergillus</i></b> .....	9
<b>II.5. Les caractères physiologiques des <i>Aspergillus</i></b> .....	11
<b>II.5. 1. Les caractères biochimiques</b> .....	11
<b>II.6. Identification moléculaire et phylogénétique des <i>Aspergillus</i></b> .....	12
<b>Chapitre II</b> .....	14
<b>Aperçu sur la diversité des <i>Aspergillus</i> dans quelques habitats terrestres salés</b> .....	14
<b>II.1. Résultats des études analysées</b> .....	25
<b>III.2. Analyse des résultats des études</b> .....	30
<b>II. 3. Distribution des <i>Aspergillus</i> halotolérants dans les régions</b> .....	32
<b>Conclusion</b> .....	25
<b>Références Bibliographiques</b> .....	29

## Liste des figures

	<b>Titres des figures</b>	<b>Pages</b>
01	Représentation schématique d'une tête aspergillaire	06
02	Partie supérieure des conidiophores d'espèces d' <i>Aspergillus</i>	07
03	Aspect macroscopique de quelques espèces d' <i>Aspergillus</i> .	10
04	Aspect microscopique de la tête aspergillaire observée par microscope photonique	11
05	Représentation schématique du cluster de gènes ribosomiaux fongique	13
06	Pourcentages de genres fongiques présents dans 10 habitats de sols salins.	20
07	Pourcentage des espèces d' <i>Aspergillus</i> halotolérant identifié dans les 10 régions salines	22

## Liste des tableaux

<b>Figures</b>	<b>Titre du tableau</b>	<b>Pages</b>
01	La classification sous-générique moderne d' <i>Aspergillus</i>	05

# Liste des abréviations

<b>AW</b>	activité d'eau
<b>BenA.</b>	Le gène $\beta$ - tubuline
<b>CaM</b>	Le gène de la calmoduline
<b>CYA</b>	Milieu Czapek à l'extrait de levures (Czapek Yeast Agar)
<b>ITS</b>	gène de l'Espaceur transcrit interne (Internal Transcribed Spacers)
<b>MEA</b>	gélose à l'extrait de malt (Malt Extract Agar)
<b>PDA</b>	Gélose aux pommes de Terre (Potato Dextrose Agar)

# Glossaire

**Activité de l'eau** : indice de la disponibilité d'eau "libre" d'une matrice alimentaire ou l'eau susceptible d'intervenir dans des réactions biochimiques, chimique et microbiologique.

**Cellules Hiill**: cellules à parois épaisses appelées Ces cellules sont terminales ou intercalaire sur les hyphes ; leur fonction est inconnue le la forme des cellules de Hiille est un indice précieux pour l'identification des groupes et des espèces(Hugo *et al.*,1988)

**Extrémophile** : Est un organisme qui vit de façon optimale dans des environnements extrêmes qui caractérisée par des valeur physique-chimique s'approchant limites (Jean *et al.*,2003)

**Gymnothèces** : c'est une variante du cléistothèces peu de chose le différencie de ce dernier à l'exception du péridium fait de filaments las lui donnant un aspect chevelu (Nelly *et al.*, 1999)

**Phialoconidies** : phialides produisant 2 types de phialoconidies, des macro conidies en forme de fuseaux souvent incurvée en croissant, avec cloisons transversales, et micro conidies en amas ou en chaînette rares (Jean *et al.*,1993).

**Saprophyte** : Est un organisme qui se nourrir de matière organique en décomposition et qui dépourvu de pouvoir pathogène (Dutuit et Gorenflot,2016).

# ***Introduction***

Les champignons habitent un large éventail d'environnements, y compris les plus extrêmes comme les eaux hyper salines et les déserts. On dénombre environ 1,5 million différentes espèces de champignons sur terre, même si seulement 5% environ ont été décrites taxonomiquement (Brase *et al.*, 2009).

Les moisissures ou champignons filamenteux sont des acteurs importants du monde microbien. Ils peuvent être définis comme des microorganismes hétérotrophes filamenteux et immobiles (Hissein *et al.*, 2019). Ils produisent une gamme diversifiée de métabolites bioactifs, ce qui en fait une source riche de différents types de médicaments potentiels (Greve *et al.*, 2010). Le genre *Aspergillus* constitue une de ces moisissures qui ont une grande importance économique, écologique et médicale. Et la production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces de ce genre a été rapportée (Abu-Seidah, 2003).

Le genre *Aspergillus* est un genre fongique diversifié, contenant environ 185 espèces fongiques filamenteuses productrices de produits pharmaceutiques et valeur commerciale (Lubertozzi, 2009).

Une faune et une flore spécifiques caractérisent les écosystèmes salins. Plusieurs études ont montré ces habitats sont peuplés des bactéries, d'archées, d'algues et de champignons. Ces derniers peuvent s'y développer et prospérer malgré le stress salin de ces écosystèmes (Oren *et al.*, 2002 ; Gunde, 2004). En général, les communautés fongiques dans les environnements hyper salins sont dominées par les *Aspergillus* (Mal *et al.*, 2012).

Les principales raisons d'étudier les extrémophiles, y compris les microorganismes halophiles, sont de comprendre leurs mécanismes d'adaptation au stress et pour l'application biotechnologique de leurs métabolites adaptés aux conditions extrêmes. La faible activité de l'eau et la forte concentration de sel des environnements salins font de ces habitats une source importante de microorganismes halophiles qui peut fournir des enzymes d'intérêt industriel (Oren, 2010). Plusieurs recherches sur les hydrolases halophiles telles que les amylases, les cellulases, les lipases et les protéases ont été rapportées à partir de bactéries et de champignons halophiles (Moreno *et al.*, 2013 ; Damare *et al.*, 2012).

C'est dans ce contexte que s'inscrit ce présent travail dont l'objectif consiste à la présentation des techniques d'isolement et d'identification des d'*Aspergillus* à partir de milieux terrestres salés. Pour ce faire, le manuscrit présentera en premier les particularités biologiques de ces champignons, qui constituent la pierre angulaire sur laquelle s'appuieront les techniques d'identification. Une deuxième partie exposera des résultats, avec analyse, d'études portant sur l'isolement et l'identification de champignons, dont des *Aspergillus*, à partir de biotopes terrestres salés.

***Chapitre I : Rappels  
Bibliographiques***

## **II.1. Généralités sur les *Aspergillus***

Les espèces d'*Aspergillus* appartiennent aux premiers organismes fongiques qui ont été cultivés sur des milieux artificiels et étudiés pour leurs propriétés biochimiques. Ils sont parmi les champignons les plus courants dans l'environnement de l'homme (Samson, 1994). Les *Aspergillus* sont saprophytes et cosmopolites. Les spores aspergillaires, ou conidies, sont ubiquitaires et retrouvées constamment en suspension dans l'atmosphère (Desoubeaux et Chandenier, 2010).

Les champignons du genre *Aspergillus*, dont la première description date de 1729 (Micheli 1729 in Desoubeaux et Chandenier, 2010), sont des moisissures saprophytes à filaments hyalins, cloisonnés, et haploïdes. Ils appartiennent aux Ascomycètes et à la famille des *Trichocomaceae*. Ce genre comprend aujourd'hui quelques 185 espèces. Ces champignons ont un métabolisme aérobie et participent au recyclage du carbone et de l'azote de l'environnement, pouvant survivre à des températures élevée pour certaines espèces (*Aspergillus niger*), et ne requièrent pas de nutriments spécifiques (Desoubeaux et Chandenier 2010).

Les espèces du genre *Aspergillus* ont une grande importance économique, écologique et médicale. Et la production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces de ce genre a été détectée (Abu-Seidah, 2003).

## II.2. Taxonomie des *Aspergillus*

La classification d'*Aspergillus* est traditionnellement basée sur des caractères morphologiques (Houbraken *et al.*, 2014) et sur le mode de reproduction asexuée (anamorphe) ou sexuée (teleomorphe) (Aubir *et al.*, 2009).

Selon Houbraken et Samson 2011 *in* Houbraken *et al.*, 2014 et Gareth 2015 Les *Aspergillus* sont inclus dans :

<b>Règne :</b>	<i>Fungi</i>
<b>Embranchement :</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Sous-embranchement :</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Classe :</b>	<i>Eurotiomycetes</i>
<b>Sous classe :</b>	<i>Eurotiomycetidae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Eurotiales.</i>
<b>Famille :</b>	<i>Trichocomaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Aspergillus</i>

Raper et Fennell en 1965, ont divisé *Aspergillus* en 18 groupes. Plus récemment, Peterson 2008, Peterson *et al.*, 2008 et Houbraken et Samson 2011 ont étudié la relation parmi les *Aspergillus* utilisant une phylogénie multigénique. Ces études montrent que les groupes phénotypiques de Raper et Fennell correspondent largement avec les classifications, 4 sous-genres et 19 sections sont acceptés chez *Aspergillus* (Houbraken *et al.*, 2014).

**Tableau01** : La classification sous-générique moderne d'*Aspergillus*

Sous genre	Séction
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus (Eurotium)</i> <i>Restricti (Eurotium)</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i> <i>Circumdati (Neopetromyces)</i> <i>Flavi (Petromyces)</i> <i>Flavipedes (Fennellia)</i> <i>Nigri</i> <i>Terrei</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i> <i>Clavati (Neocarpenteles, Dichotomomyces)</i> <i>Fumigati (Neosartorya)</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Aeni (Emericella)</i> <i>Bispori</i> <i>Cremeia (Chaetosartorya)</i> <i>Nidulantes (Emericella)</i> <i>Ochraceorosei</i> <i>Silvati</i> <i>Sparsi</i> <i>Usti (Emericella)</i>

Houbraken *et al.*,2014

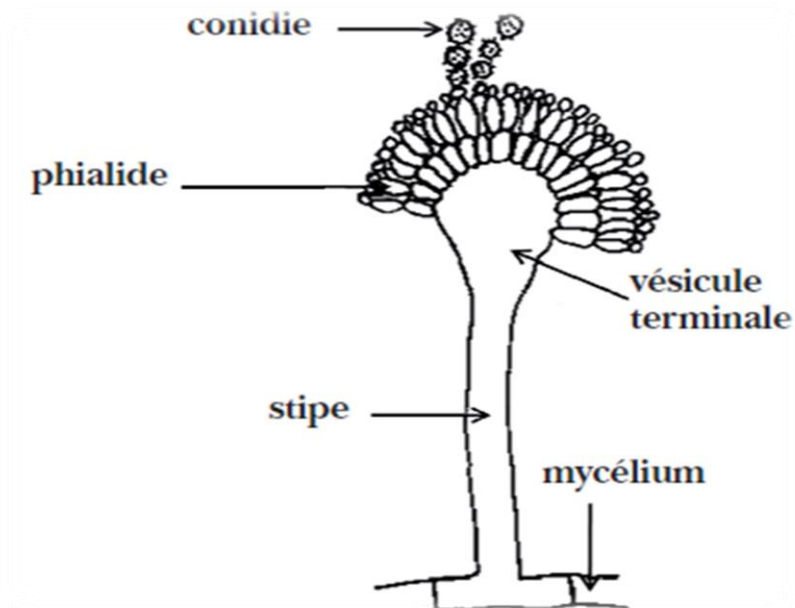
### II.3. Les caractères morphologiques des *Aspergillus*

Le genre *Aspergillus* comprend 185 espèces attribuées à 18 groupes étroitement liés morfo-physiologiquement et génétiquement (Cristina *et al.*, 2010). La tête aspergillaire dont les caractéristiques affineront l'identification (Calera *et al.*,1997 in Desoubeaux et Chandénier 2010). Cette forme de fructification asexuée stade dit « anamorphe » d'*Aspergillus* est composée d'une vésicule située à l'apex d'un fragment de filament appelé « stipe ». Elle est recouverte d'une rangée de phialides

(cellules conidiogènes en forme de bouteilles) portée ou non par une rangée de métules, et de très nombreuses conidies de 2 à 4 micromètres de diamètre naissantes à partir de ces phialides. La présence ou non de certains de ces éléments, leurs formes et couleurs respectives permettent de porter une identification sur l'espèce aspergillaire isolée (Desoubeaux et Chandener 2010).

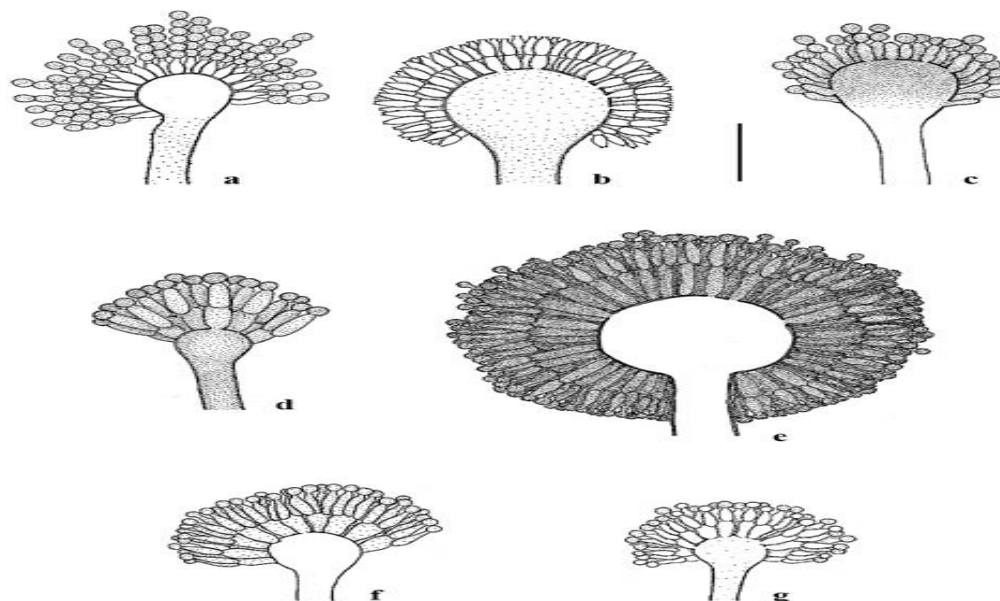
Ce dernier peut être unisérié ou bisérié (figure 02) avec un stipe asepté se terminant par une vésicule, sur laquelle les cellules conidiogènes (phialides et métules) sont portées (figure 01). Ces phialides produisent des conidies en longues chaînes avec des pigmentations et des ornementsations différentes (Samson, 1994).

Lorsqu'elles sont mises en culture, les espèces d'*Aspergillus* forment des colonies qui se développent généralement rapidement pour afficher différentes couleurs, qui sont à leur tour très utiles pour l'identification phénotypique de certaines espèces. Les hyphes du mycélium végétatif sont hyalins et cloisonnés (Guarro *et al.*, 2010).



Source : Desoubeaux et Chandener, 2010

**Figure 01** : Représentation schématique d'une tête aspergillaire



Source: Guarro *et al.*,2010

**Figure 02 :** Partie supérieure des conidiophores d'espèces d'*Aspergillus*

**a)** *Aspergillus flavus* (conidiophore uniseriate); **(b)** *Aspergillus flavus* (conidiophore biseriante); **(c)** *Aspergillus fumigatus*; **(d)** *Aspergillus nidulans*; **(e)** *Aspergillus niger*; **(f)** *Aspergillus terreus*; **(g)** *Aspergillus ustus*. Barre = 25  $\mu$ m

### **a. Tête conidiale**

La détermination des caractéristiques de la tête conidiale est de première importance dans l'identification de genre *Aspergillus*. En fait, l'un des deux critères d'identifications clés de Groupes *Aspergillus* dans la monographie de Raper et Fennel est le couleur et forme de la tête conidienne. Les formes des têtes conidiales varient de colonnaire à cunéiforme à globuleux. La forme de la tête est en grande partie influencée par la disposition des phialides sur les vésicules (Hugo *et al.*,1988)

### **b. Conidiophore**

Le conidiophore est une branche dressée à paroi épaisse produit perpendiculairement à un hyphe aérien ou de substrat. Dans la plupart des espèces d'*Aspergillus* les conidiophores sont composés de trois parties

morphologiquement distinctes. Celles-ci sont la cellule du pied, le stipe et la vésicule (figure 2). (Hugo *et al.*,1988).

**c. Vésicule**

Dans la plupart des espèces d'*Aspergillus*, la partie apicale du conidiophore est élargie pour former une cellule globuleuse, hémisphérique ou elliptique appelée vésicule. Les vésicules sont hyalines ou colorées, et leur couleur est toujours la même que celle du conidiophore (Hugo *et al.*,1988)

**d. Conidium**

Les conidies dans les espèces d'*Aspergillus* sont uni- ou multi-nuclées mais toujours unicellulaires. La conidie est produite à partir de la pointe étroite de la phialide, qui est parfois appelé le tube producteur de conidium (Hugo *et al.*,1988)

**e. Phialides et Métules**

Les phialides sont des éléments en forme de flacon dont l'intérieur produit successivement des conidies. Les conidies sont formées en interconnectés chaînes, sont fortement hydrophobes et généralement hyalines ou pâles mais en masse peuvent être de différentes couleurs reproduites dans les colonies. Les phialides peuvent être composés par un seul élément ou formé par de courtes branches (metule) .Lorsque les metule sont les cellules conidiogènes formées sont appelées bisériate. En l'absence de metule, conidiogène les cellules sont considérées comme unisériées (Guarro *et al.*, 2010).

**f. Cléistothèce**

Cellules rond ou allongée de paroi dense, elles sont à l'intérieur de cellules appelées asques, ces asque sont soit libres soit enfermés dans une enveloppe plus ou moins complexe, loure structure fermée ou bien apothécie si la structure est ouvert en forme de corbeille. La formation des asques est précédée du développement de filaments spéciaux compatibles (+ ou -) transformés en gamètes males anthéridies ou femelles ascogones (Nelly *et al.*, 1999).

## II.4. Isolement et identification morphologique des *Aspergillus*

### II.4.1. Isolement de champignons à partir des biotopes terrestres salins

Les échantillons de sols salés, dûment prélevés, sont utilisés pour l'isolement de champignons halotolérants, dont les *Aspergillus*. En général, la méthode de la plaque de dilution décimale pour mettre le sol en suspension dans l'eau stérile jusqu'à l'interprétation des résultats sur gélose PDA préparé avec différentes concentrations de NaCl (5% jusqu'à 20%) et incubé à 25°C pendant 7 à 10 jours (Davet et Rouxel, 1997).

### II.4.2. Identification morphologique des *Aspergillus*

L'identification est faite sur des cultures pures. Elle repose sur l'observation des critères macroscopiques et microscopiques

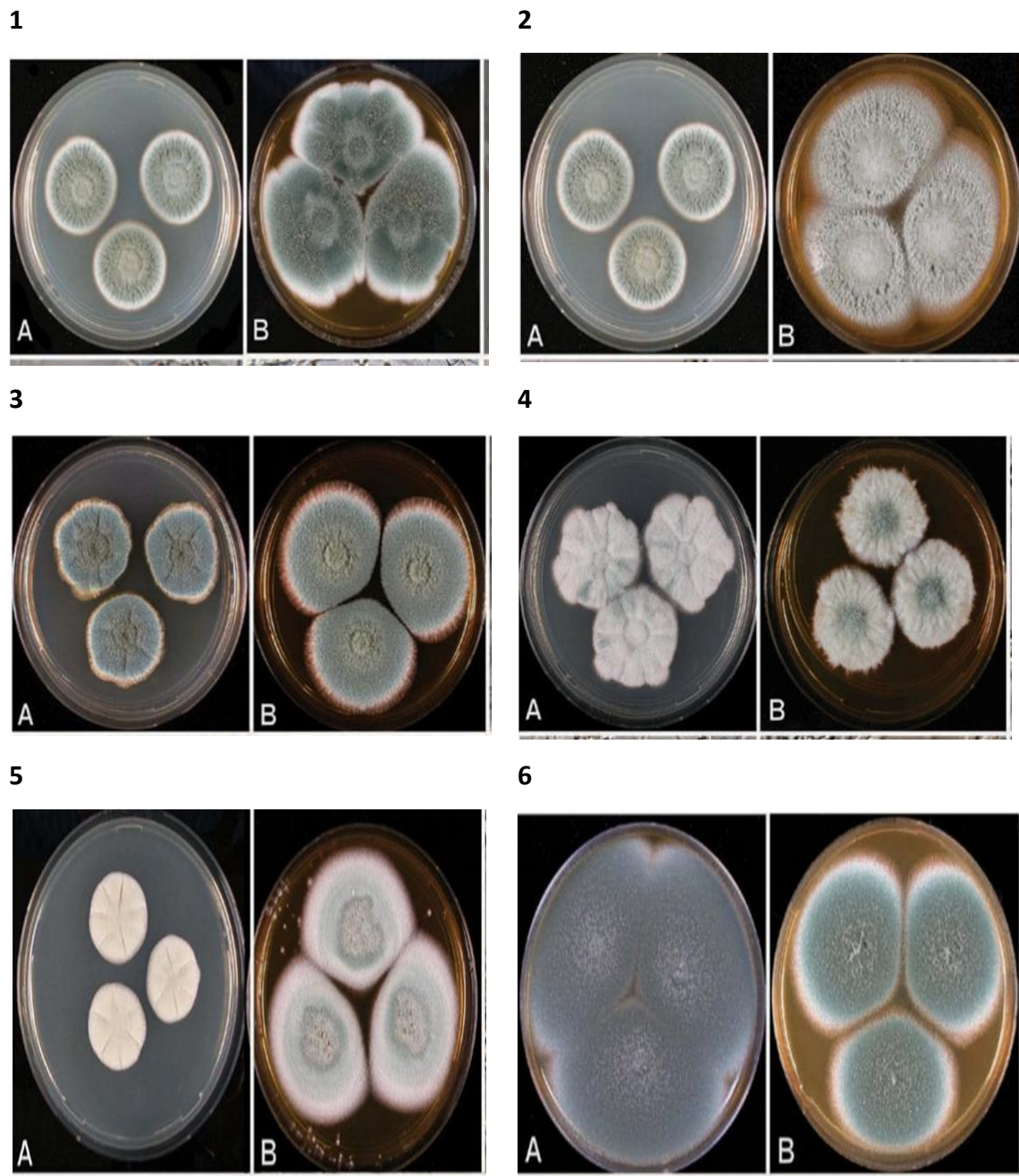
#### II.4.2. 1. Observation macroscopique

Lors de l'analyse macroscopique des colonies obtenues après culture des champignons, plusieurs caractéristiques sont observées : la forme, la couleur, la taille, le contour, la texture et le diamètre des colonies (Christensen, 1981 ; Hocking, 1982 ; Doster *et al.*, 2009 in Pane2011). Ces observations doivent se faire en prenant les conditions de croissance en considération (température, PH, milieux de culture et la salinité).

Selon Pitt et Samson(2005), les critères morphologiques macroscopiques à observer sont :

- ✓ Diamètre : qui varie selon l'espèce et les conditions de croissance.
- ✓ Couleur de mycélium: jaune, brune, gris ou orange, selon l'espèce.
- ✓ Couleur revers : Jaune, orange vert, rouge, bronzer ou brune.
- ✓ Couleur de l'exsudat : Jaune, rouge, incolore
- ✓ L'aspect de colonies : poudreuse, cotonneuse, chevelu ou autre
- ✓ La Contour : régulier ou irrégulier.
- ✓ Forme de la colonie : Bombé ou plate ; Lisse ou plissée, n cratère....
- ✓ Pigmentation : Jaune, brune, rouge ou rose

Le figure ci-dessous montre l'aspect macroscopique de quelques espèces d'*Aspergillus* qui incubaient pendant 7 jours à 25 ° C sur les milieux CYA et MEA.



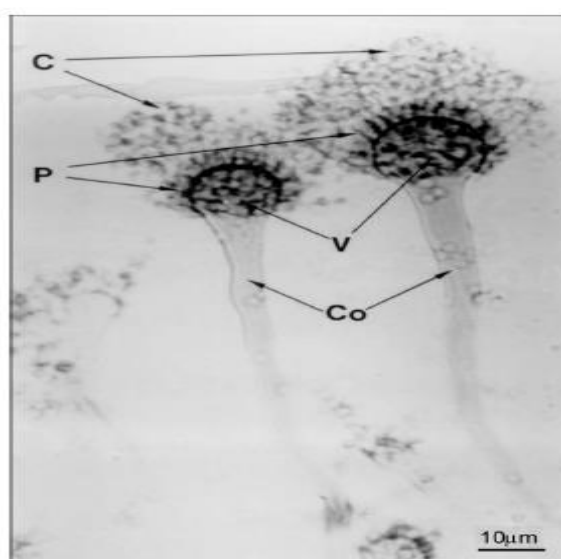
Source : Samson *et al.*,2007

**Figure03** : Aspect macroscopique de quelques espèces d'*Aspergillus*. Ce sont des Colonies de 7 jours à 25 ° C sur les milieux **A.** CYA. **B.** MEA.

1. *Aspergillus duricaulis* ; 2. *Aspergillus unilateralis* 3. *Aspergillus turcosus* ; 4. *Aspergillus novofumigatus* ; 5. *Aspergillus viridinutans* , 6. *Aspergillus fumigatus*

#### II.4.2.2. Observation microscopique

Les critères observés sous le microscope sont La forme des têtes conidiales (rayonnées ou colonnaires), le nombre de points de ramification entre vésicule et phialides (uniseriate ou biseriata), couleur de conidiophores, et la taille, la forme et la texture des conidiophores, des vésicules, des métules (lorsqu'ils sont présents), phialides (figure04), conidies, cellules de Hülle cleistothécies (lorsqu'elles sont présentes)(Samson *et al.*, 2014).



Source : Desoubeaux et Chandener, 2010

**Figure 03** : Aspect microscopique de la tête aspergillaire observée par microscope photonique

(C) : conidie ;( P) : Phialide/Vésicule ; Co : conidiophore)

### II.5. Les caractères physiologiques des *Aspergillus*

#### II.5. 1. Les caractères biochimiques

##### II.5. 1.1. Métabolites primaires

Le D-Glucose est la principale source de carbone dans le métabolisme de la plupart des eucaryotes hétérotrophes. Bien qu'*Aspergillus*, la glycolyse sert de voie catabolique majeure, ils peuvent croître sur les produits de décomposition dérivés de polysaccharides extracellulaires (comme le D mannose ou le D-galactose), ainsi que des métabolites C3 d'autres voies cataboliques (lipides, acides aminés), le

catabolisme de l'éthanol et de l'acétate et leur conversion en glucose est relativement bien compris chez *A. nidulans* (Michel et al., 2009).

### II.5.1.2. Métabolites secondaires

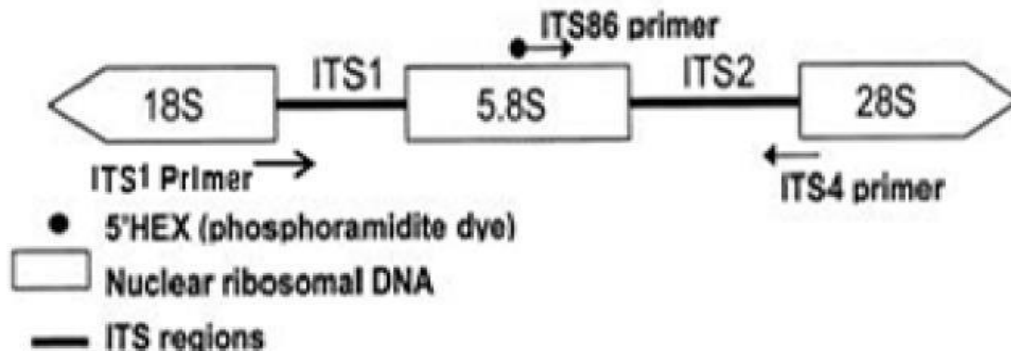
Les *Aspergillus* produisent plusieurs types de métabolites secondaires. Chaque espèce peut produire une gamme de métabolites secondaires associés à la croissance fongique et au développement (Hicks et al., 2002). Les *Aspergillus* sont les principaux producteurs des enzymes microbiennes extracellulaires telles que les lipases et les protéases (Scazzocchio, 2019), les acides organiques tels que l'oxalique, citrique, itaconique, acides citriques, les acides tricarboxylique (Milson et Meers, 1985) et des antioxydants (Elaasser et al., 2011).

Certaines souches d'*Aspergillus* produisent des aflatoxines B1, B2, M1, G1 et G2 (Besoubeaux et Chandener, 2017) qui sont des métabolites secondaires cancérigènes, immunosuppressives et tératogènes (Who, 2006 in Pane, 2011).

## II.6. Identification moléculaire et phylogénétique des *Aspergillus*

Anciennement, l'identification des *Aspergillus* était principalement basée sur des caractères phénotypiques et physiologiques. L'identification basée uniquement sur le phénotype est souvent difficile et nécessite un personnel bien formé. Une identification correcte par les laboratoires de routine uniquement basée sur des caractères phénotypiques devient donc difficile et de nos jours, les techniques moléculaires, en particulier le séquençage de l'ADN, sont fréquemment utilisées pour l'identification (Houbraken, 2014).

Le séquençage des régions ITS (Internal transcribed spacers) du cluster des gènes ribosomiaux est utilisé pour l'identification des champignons, y compris les *Aspergillus* (Alastruey *et al.*, 2014 ; Samson *et al.*, 2007). Spécifiquement, les régions ITS1 et ITS2 (figure 05) qui se trouvent de chaque côté du gène de l'ARN<sub>r</sub> 5,8S, sont souvent utilisées (Balajee *et al.*, 2007). En effet, ces régions génomiques contiennent des séquences variables qui permettent de distinguer les espèces et les sous espèces (Henry *et al.*, 2000).



Source : Alhussaini *et al.*, 2013

**Figure 04** : Représentation schématique du cluster de gènes ribosomiaux fongiques

Les séquences de  $\beta$ -tubuline (BenA) et de calmoduline (CaM) sont fréquemment utilisées pour l'identification des espèces *Aspergillus* et sont de meilleurs marqueurs d'espèces que ITS par ce que, à partir des recherches sur l'analyse phylogénétique a révélé que dans la plus part des cas, le séquençage ITS était incapable de distinguer entre deux espèces d'*Aspergillus*. Par contre les gènes BenA et CaM distinguent fiable de ces espèces étroitement apparentées (les gènes BenA et CaM offraient la discrimination intra spécifique la plus élevée) (Shu-Ying *et al.*, 2020).

## ***Chapitre II***

# ***Aperçu sur la diversité des Aspergillus dans quelques habitats terrestres salés***

## **II.1. Résultats des études analysées**

Afin d'avoir un aperçu sur la diversité des espèces des *Aspergillus* dans différents habitats terrestres salins et non salins, ainsi que l'effet des conditions extrêmes de ces habitats sur leur variabilité, 12 études sur le sujet, issues de 12 régions géographiques, ont été analysées. Les résultats sommaires de ces études sont comme suit :

### **II.1.1. Ein Gedi (Palestine)**

Une étude a été menée en 1997, par Steiman *et al.*, sur le sol non salin d'une oasis à Ein Gedi, l'une des treize réserves naturelles d'Israël. Cette oasis se trouve entre les rives ouest de la mer Morte, où la température maximale, durant la journée, atteint 38 °C en été et 20°C en hiver, et dont le pH se situe entre 7 à 7,8. Cette zone est caractérisée par une précipitation annuelle de 70mm.

103 isolats fongiques ont été obtenus d'échantillons de sol d'Ain Gedi. Ces isolats ont été. Tous les isolats ont été déterminés *saccharomyceta* des *Ascomycètes*. Représentants de six familles fongiques ont été récupérés du SGP. La plupart des isolats étaient étroitement liés à la *Trichocomaceae*, représentés par les espèces *Aspergillus*, *Eurotium* et *Penicillium*. Selon l'étude menée par Régine et ses coll. En 1997, 61 espèces fongiques ont été isolées (technique de plaque de sol) de ce site avec 4 espèces appartenant aux *Aspergillus* : *A. ochraceus*, *A.fumigatus*, *A.terrus* . *A.ustus*.

### **II.1.2. Le barrage de Kotri (Pakistan)**

Une étude menée par Suhail et ses collaborateurs, et publiée en 2007, a été réalisée sur les sols de trois rives du barrage de Kotri. Ce barrage est situé sur le fleuve Indus entre Jamshoro et Hyderabad dans la province du Sind au Pakistan longitude 68.022'E, latitude 25.022'N. La zone est située sur la rive droite du fleuve Indus. La température de l'air varie entre 9,3°C à 40,4°C. Il existe des extrêmes significatifs de précipitations dans le bassin principalement adaptées à l'agriculture irriguée. La valeur du pH, qui est alcalin, varie généralement de 8 à 8,50.

Trente échantillons de sol, prélevés sur divers profondeurs à partir de ce sol non salin (en surface, 10, 20, 30 et 50 cm), ont été utilisés pour l'isolement des

champignons. L'isolement a été réalisé par les techniques de dilution et d'incorporation directe de sol.

Vingt et une espèces d'*Aspergillus* y ont été isolées, et identifiées. Ces espèces sont : *A. niger* (21.07), *A. flavus* (18.26), *A. ochraceus* (17.28), *A. wentii* (7.47), *A. flavus oryzae* (7.85), *A. fumigatus* (8.49), *A. sulphureus* (2.29), *A. ustus* (3.48), *A. violaceofuscus* (1.82), *A. flavipes* (2.97), *A. terreus* (0.80), *A. clavatus* (0.72), *A. restrictus* (0.93), *A. versicolor* (0.55), *A. candidus* (1.35), *A. nidulans* (0.38), *A. citrisporus* (0.04), *A. granulatus* (1.95), *A. sparsus* (0.55), *A. elegans* (0.50), *A. giganteus* (1.14).

### **II.1.3. Lac Pomorie (Bulgarie)**

Le lac Pomorie est situé près de la ville de Pomorie en Bulgarie. La salinité de l'eau dans la lagune de Pomorie atteint plus de 80 ‰ et son rivage est caractérisé par formation de sol naturel hyper salins avec pH neutre.

L'étude faite par Smolyanyuk et Bilanenko, en 2011, a conduit à l'isolement de 24 isolats de micromycètes à partir de sol de rive avec une PH 10,6, dont 15 espèces ont été identifiées morphologiquement. Parmi ces espèces deux appartiennent au genre *Aspergillus* : *A. halophilicus* et *A. repens*.

### **II.1.4. La mer Morte (Palestine)**

La mer Morte représente l'un des lacs les plus salés de la planète L'activité de l'eau de la mer Morte non-diluée est d'environ 0,669 et de salinité de 34‰ (Krumgalz *et al.*, 1982).

En plus d'étudier le lac Pomorie, Smolyanyuk et Bilanenko (2011), ont également analysé les communautés de micromycètes halotolérantes non loin de la Mer Morte. Les échantillons ont été prélevés de la rive du lac près de la ville d'Ein Bokek. Huit espèces de micromycètes ont été isolées et identifiées morphologiquement, parmi lesquelles une seule espèce du genre *Aspergillus* a été isolée : *A. repens*.

### **II.1.5. Lac Baskunchak (Russia)**

Des échantillons de sol ont été prélevés par Smolyanyuk et Bilanenko (2011) près de l'eau du lac Baskunchak, en Russie. La salinité de l'eau du lac atteint 30% et PH 10,6.

54 souches ont isolées ces souches appartiennent à 14 espèces anamorphiques des genres suivants ont été identifiées : *Aspergillus* (*A. repens* avec deux espèces non identifiées), *Penicillium*, *Ulocladium*.

#### **II.1.6. Les grandes plaines salées (GPS) d'Oklahoma (États-Unis)**

Les croutes d'évaporites des grandes plaines salées d'Oklahoma constituent un habitat terrestre hyper salin. C'est une étendue de 65 km<sup>2</sup> de salines stériles alimentées par un flux capillaire de saumures saturées provenant de gisements souterrains (Johnson, 1980; Reed, 1982; Major *et al.*, 2005 in Evans *et al.*, 2013 )

Dans l'étude menée par Evens *et al.*, et publiée en 2013, vingt-cinq isolats fongiques ont été obtenus. Ces isolats ont été identifiés morphologiquement et génétiquement (séquençage de ARNr 18S). Tous les isolats appartiennent au phylum Ascomycota, avec une prédominance des *Trichocomaceae*. Cette famille est représentée par des espèces des genres : *Eurotium*, *Aspergillus* et *Penicillium* trois espèces d'*Aspergillus* ont été obtenues à partir de cet habitat : *Aspergillus candidus*, *A. ochraceus* et *A. oryzae*.

#### **I.1.7. Sebkhah d'El Melah (Tunisie)**

La Sebkhah d'El Melah, un sol salin saharien du sud de la Tunisie. Elle présente une superficie d'environ 150 km<sup>2</sup> et se situe légèrement en dessous du niveau de la mer (Jaouani *et al.*, 2013).

Dans l'étude menée en 2014 par Jaouani ses collaborateurs, une collection de vingt et un isolats de champignons, tous modérément halotolérants, a été constituée à partir d'échantillons de cendres collectées à Sebkhah El Melah. L'identification de ces champignons a été basée sur le séquençage des gènes de l'ITS, ARNr 28s, BenA et CaM.

Les isolats fongiques appartiennent à 15 taxons, distribués sur 6 genres : *Cladosporium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Ulocladium* et *Engyodontium*. Parmi

les 21 isolats, trois appartenaient au genre *Aspergillus* : *A. flavus*, *A. fumigatus* et *A. fumigatiaffinis*.

#### **I.1.8. Le parc national du lac Urmia (Iran)**

Une étude a été réalisée par Samadi *et al* sur la diversité fongique terrestre du parc national des îles du lac Urmia (Iran) et des zones côtières du lac (de 2011 à 2012) qui est caractérisé par une PH et une salinité variable.

Après isolement sur différents milieux de culture (MEA et PDA) et sur différentes concentrations en NaCl (0 à 30%), un total de 27 isolats fongiques a été obtenus à partir des sols hyper salins du Parc. Les analyses morphologique et culturale ont permis aux auteurs d'identifier neuf espèces d'*Aspergillus* : *Eurotium amstelodami*, *A. alliaceus*, *A. ochraceus*, *A. persii*, *A. leproris*, *A. parasiticus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. sydowii*, *A. niger* et *A. tubingensis*.

#### **I.1.9. Al Shiga (Arabie Saoudite)**

En 2016 Al Tamie a publié les résultats d'une étude sur l'effet de la salinité sur des champignons isolés de différents habitats salés de la Zone de Al Shega, à Al Qasim, en Arabie Saoudite.

9 isolats sont isolée (*Emericilla*; *Mucor*; *Alternaria* ; *Penicillium*; *Syncephalastrum*; *Aspergillus* ; *Alternaria* et *Ulocladium*) sont identifier parmi eux 2 espèces de genre *Aspergillus*. *A.fumugatus* et *A.parasiticus* ont montré un taux de croissance élevé à 0, 5, 10% de NaCl .A 20%la croissance est arrête pour *A.fumugatus* et diminué pour *A.parasiticus*. La température idéale de ces espèces est 30°C et ph =7. L'étude a conclu que *Aspergillus fumigatus* est faiblement halotolérant, *Aspergillus parasiticus* est modérément halotolérant.

#### **I.1.10. La grotte d'Atacama (Chili)**

En 2017, Martinelli et son collaborateur ont publié une étude qui a porté sur l'étude de souches fongiques halophiles isolées à partir d'un biofilm mural et sol d'une grotte localisée sous un ancien gisement de guano, dans les collines de la chaîne côtière du désert d'Atacama, à environ 106 km au sud d'Iquique, au Chili.

Trois souches fongiques halophiles ont été isolées et identifiées morphologiquement et phylogénétiquement, en utilisant les marqueurs génétiques(ITS) Ces souches ont été identifiées comme : *A. sclerotialis*, *A. chlamydosporus* et *A. caninus*.

#### **I.1.11. Grand Sebkhah d'Oran (Algérie)**

Chamekh *et al* ont publié, en 2019, une étude sur la biodiversité de champignons halophiles isolés de la grande Sebkhah d'Oran, situé à 12 km de la Méditerranée, au nord-ouest algérien. L'échantillonnage a été réalisé dans une zone de 5 km<sup>2</sup>, entre Boutlelis et Al Amria, dans 9 stations réparties sur deux zones : une zone recouverte par une végétation halophile et des cultures céréalières le sol est neutre et moins salin. Selon l'échelle de Durand, une seconde zone dépourvue de toute végétation de sol alcaline et présente un taux de salinité élevé. Les isolats ont été identifiés morphologiquement et analyse moléculairement grâce au séquençage des gènes TEF-1,  $\beta$ -tubuline et ITS.

136 isolats fongiques ont été obtenus à partir des deux zones. *Aspergillus* est un champignon filamenteux isolé et identifié dans cette étude. Sa fréquence d'apparition dans le premier site était de 13,25%, avec une moindre représentation dans la seconde zone.

Les *Aspergillus* identifiés dans cette étude sont comme suit : Zone1 : *A. amstelodamii*, zone2 : *A. subramanianii*, *A. calidoustus* et trois souches d'une espèce non identifiée *Aspergillus sp*

Tous les isolats d'*Aspergillus* de cette étude pouvaient se développer en absence de NaCl, et tous pouvaient tolérer une salinité de 12,5%. Cependant, seul *Aspergillus subramanianii* pouvait croître à 17,5% de NaCl, avec un optimum de 2.5%. Ainsi, ces isolats ont été considérés comme halotolérants.

#### **I.1.12. La station expérimentale de l'Institut National De La Recherche Agronomique INRA (Adrar)**

La wilaya d'Adrar se situe au Sud-Ouest de l'Algérie. Elle est limitée, au Nord, par la wilaya d'El Bayadh, au Nord-Ouest par la wilaya de Bechar, à l'Ouest par la

wilaya de Tindouf, au Sud-Ouest par la Mauritanie, au Sud par le Mali, au Sud-Est par la wilaya de Tamanrasset et à l'Est par la wilaya de Ghardaïa.

Guentri *et al.*, en 2020, ont isolés quarante-neuf isolats fongiques du sol salé proche de la rhizosphère et ont été identifiés morphologiquement comme appartenant aux genres : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*, avec une dominance des *Aspergillus* section *Nigri* et *Aspergillus* section *Terrei*.

### **III.2. Analyse des résultats des études**

Après analyse des études présentées dans ce travail, nous constatons que la région située dans la grande Sebkhah d'Oran (Algérie) présente la plus forte salinité, de 46% de NaCl (m/v) (Chamekh *et al.*, 2019).

Parmi les sols étudiés, les pH de 3 habitats étaient légèrement alcalins à alcalins (7.5 à 8.5) de sol non salin de barrage de Kotri (Pakistan) Ein Gedi (Palestine), et de sol salin de Grand Sebkhah d'Oran (Algérie). Le sol salin près de lac Baskunchak en Russie de pH 10,6, et le sol de la Sebkhah El Melah en Tunisie avec un pH de 10. La Zone salin d'Al Shiga, en Arabie Saoudite, présentait un pH neutre. Les mesures de PH des 4 sites restent sont mentionné pas.

En ce qui concerne les températures des sites étudiés, elles n'ont pas été mentionnées dans la plupart des études analysées. Quatre habitats étudiés présentaient des températures de 38, 45, 45 et 49°C. Ces habitats sont respectivement: Le barrage de Kotri (Pakistan), Les grandes plaines salées d'Oklahoma (USA), La Sebkhah El Melah (Tunisie) et la Station expérimentale INRA de Adrar, étant le site le plus chaud.

Les échantillons de sol ont été prélevés, après avoir retiré la couche superficielle, à des profondeurs différentes d'une étude à une autre.

Deux méthodes pour les champignons halotolérants ont été employées dans ces études :

- **La méthode de dilution** : utilisée sur des milieux sélectifs préparés avec différentes concentrations de NaCl. Cette méthode a été utilisée dans les études des sites du parc national du lac Urmia (Iran), de la Grande Sebkhah

d'Oran (Algérie), de la station expérimentale INRA d'Adrar (Algérie), du sol du Lac Pomorie (Bulgarie) et du sol du Lac Baskunchak (Russie).

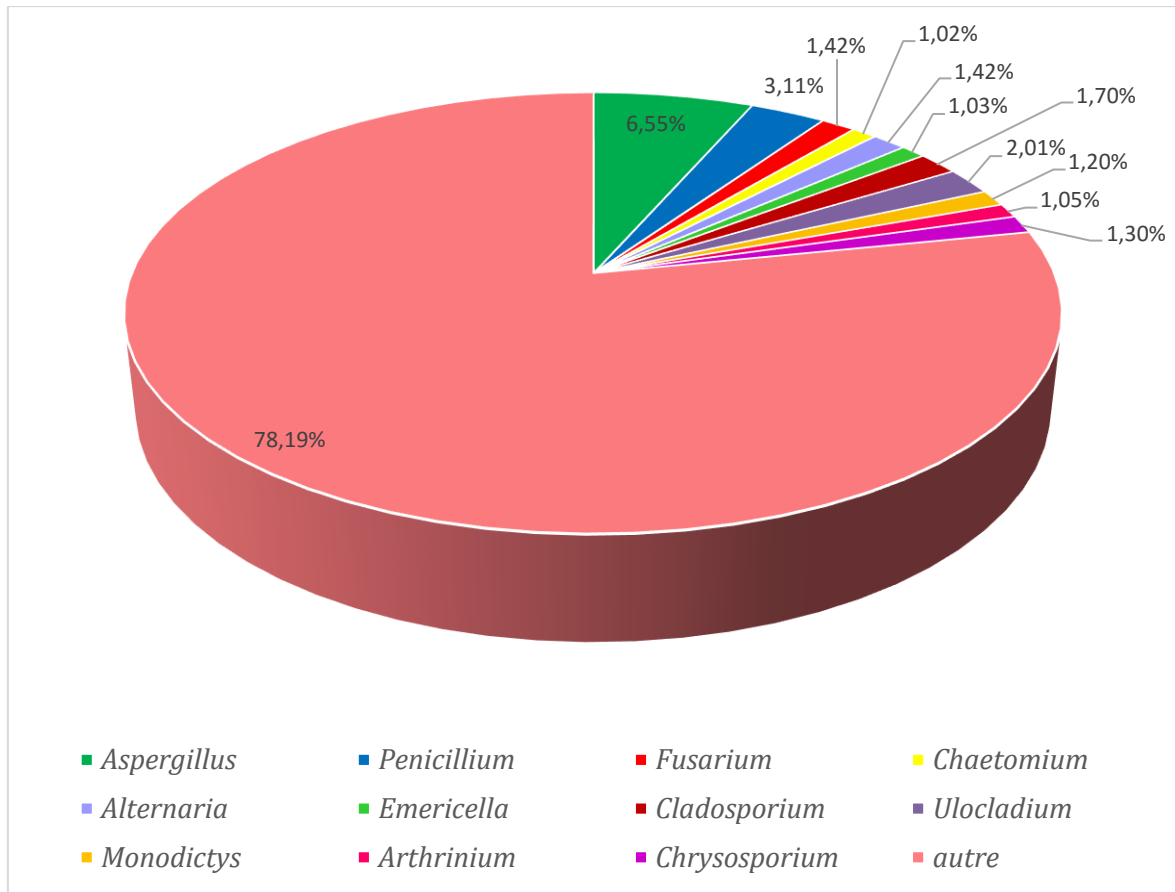
- **La méthode d'incorporation directe du sol** : où quelques milligrammes de sol ont été directement inoculés sur le milieu de culture sélectif, préparé avec différentes concentrations de NaCl. Cette méthode a été employée dans l'étude des régions suivantes : le sol de Ein Gedi (Palestine), les grandes plaines salées d'Oklahoma (Etats-Unis) et La grotte d'Atacama (Chili).
- Suhail *et al.* (2006), qui ont étudié le myosite du sol de barrage Kotri ont utilisé les deux méthodes dans leur étude. Ces auteurs ont constaté qu'un plus grand nombre d'espèces et de colonies a été isolé par la méthode d'incorporation directe.

Les milieux de cultures les plus utilisés pour l'isolement étaient : MEA, PDA, CZK. Quant au milieu Sabouraud, il a été utilisé dans une seule étude, celle des plaines salées d'Oklahoma (États-Unis).

Les cultures fongiques de ces études ont été incubées à des températures allant de 25°C à 45°C. La durée d'incubation pouvait aller de 5 à 15 jours, pour avoir une bonne charge coloniale.

Toutes les études analysées ont utilisé des critères morphologiques, suivants des clés établies dans la littérature scientifique, pour l'identification des champignons isolés, y compris ceux appartenant aux *Aspergillus*. Quant à l'identification phylogénétique, elle a été adoptée par Jaouani *et al.*, 2014 (Sebkha Melah Tunisie), Martinelli *et al.*, 2017 (La grotte d'Atacama) et Evans *et al.*, 2013 (GPS). Les marqueurs génétiques utilisés dans cette identification étaient les gènes du Cluster ribosomique ITS, 28S et 18S et les gènes de la  $\beta$ -tubuline, de l'actine et la calmoduline.

En se basant sur les résultats des études citées précédemment dans les 10 habitats salés, différents champignons ont été caractérisés dans ces sites salés (fig. 5).



**Figure 05** : Pourcentages de genres fongiques présents dans 12 habitats de sols salins

Selon ce diagramme, nous constatons que parmi les champignons identifiés le genre *Aspergillus* est dominant par rapport aux autres genres, avec un pourcentage de (6,55%). Ce genre est suivi par *Penicillium* (3,11 %) et le genre *Ulocladium* (2,01%) qui était présent dans 6 régions. Les genres *Alternaria* et *Fusarium* ont été isolés de cinq régions (1,42%). Le pourcentage marqué autre (78.19%) représente le pourcentage de différents genres qui ne sont présent que dans une seule région.

### II. 3. Distribution des *Aspergillus* halotolérants dans les régions

Les régions les plus riches en espèces d'*Aspergillus*, parmi les sols analysés, étaient : le sol du barrage de Kotri au Pakistan ; où 16 espèces ont été isolées en 2006. Cette fréquence élevée pourrait être dû présence des conditions édapho-climatiques du site, entre autres, la faible salinité et la présence de végétation, ce qui constitue des conditions optimales pour le développement des *Aspergillus*

La deuxième région la plus riche en *Aspergillus* est le parc national du lac Urmia (Iran), où, en 2011, Samadi *et al* ont isolé 8 espèces. La raison de ces résultats pourrait être le fait que ces espèces d'*Aspergillus* sont adaptées au stress à l'aide des mécanismes d'adaptation aux conditions extrêmes.

La région de Adrar présente également une faible présence des *Aspergillus*, dans laquelle trois espèces d'*Aspergillus* ont été isolées. Cette faible représentation serait dû à la haute température de cette région qui peut atteindre 49°C.

En outre, les régions avec la plus faible diversité d'*Aspergillus*, parmi les études analysées, est la région de la Mer morte en Palestine et les grandes plaines salées d'Oklahoma (États-Unis), dans lesquelles une seule espèce d'*Aspergillus* a été isolée dans chaque région. Cette faible fréquence d'apparition pourrait être dû à la haute salinité de ces régions.

Dans toutes les autres études les isolats d'*Aspergillus* pouvaient pousser de manière optimale dans une plage de température comprise entre 25°C et 40°C, avec un minimum de 10°C par rapport aux autres champignons.

Après la comparaison entre les deux milieux salins et non salins investigués analysés dans ce travail, il en ressort qu'*A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* et *A. niger*, *A. candidus*, *A. fumigatus affinis* sont communs dans les deux types milieu. Ainsi, ces *Aspergillus* peuvent être considérés comme halotolérants. Ces espèces possèderaient des mécanismes d'adaptation aux teneurs élevées de sels. Par ailleurs, *A. repens* constitue un halophile comme constaté dans l'étude menée par Smolyanyuk et Bilanenko (2011).

Le diagramme circulaire (Fig. 6) montre le pourcentage des espèces d'*Aspergillus* présents dans les 12 zones étudiées, où *Aspergillus repens* constitue l'espèce la plus fréquemment isolée (12,5%) dans 3 sites. Ce serait dû à sa capacité à tolérer des salinités élevées (10-15 % de NaCl). Elle pourrait également posséder la capacité de se développer dans des températures élevées. Après cette espèce, viennent les espèces : *Aspergillus amstelhami*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *A. fumigatus*, *A. niger* et *A. terreus*. Ces espèces ont été isolées à une fréquence de 8,33%. Les autres espèces, présentent une fréquence d'apparition de 4,16 %, chacune (fig. 6).

Nous constatons que le genre *Aspergillus* est fortement présent dans les régions non salines ou avec une salinité faible, comme dans les sols de barrage Kotri et Ein Gedi de Palestine et moins diversité dans les régions hyper salines, telles que Mer noire de Bulgari la ville d'Ein Bokek la rive du lac Baskunchak (Palestine) Lac Baskunchak (Russie).

A partir des résultats présentés, la répartition des espèces d'*Aspergillus* sur ces régions diffère d'une région à l'autre. Ceci pourrait être dû aux variations des facteurs édapho-climatiques de chaque site. Dans certains cas, tels que mentionné par Al Tamie (2016), les espèces non halophiles sont présentes dans des régions salines car elles posséderaient possèdent des mécanismes d'adaptation aux teneurs élevées au sel.

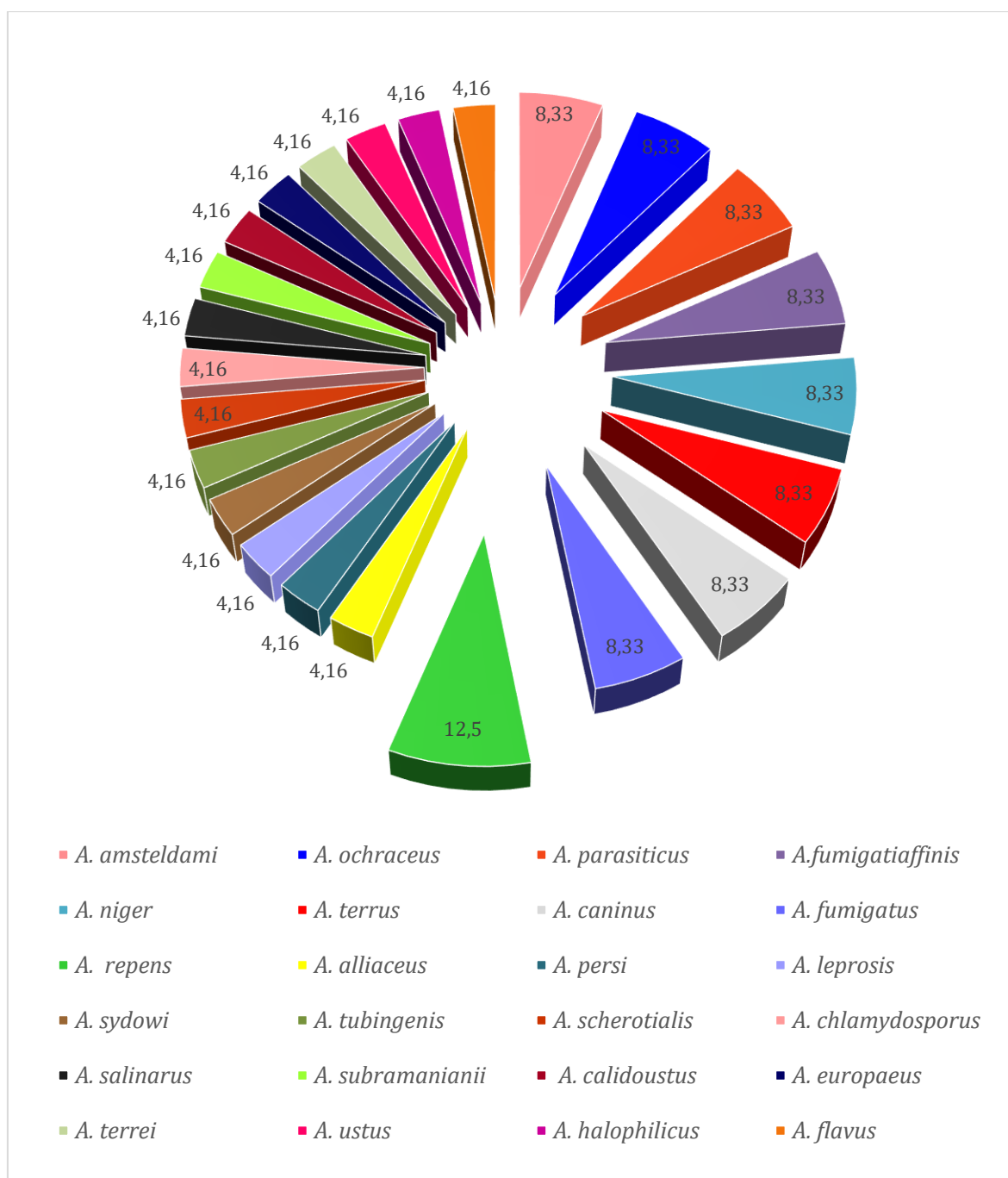


Figure 6 : Pourcentage d'espèces d'*Aspergillus* présentes dans 12 sols salins

# *Conclusion*

A partir des analyses des travaux de recherches qui ont porté sur l'isolement et l'identification des *Aspergillus* halotolérants provenant de différents sols salins terrestres, nous constatons que la fréquence d'apparition et la spécificité des espèces présentes dans ces sites sont influencées par les effets des facteurs environnementaux.

L'analyse des études démontrent que la majorité de ces isolats aspergillaires poussent optimalement à faible salinité, ainsi, ces derniers peuvent être classés comme des halotolérants, capables de tolérer certaines concentrations de sel. Cette tolérance pourrait être dû à la production de différentes enzymes et métabolites.

La capacité des *Aspergillus* à prospérer dans des régions hyper salines et leurs capacités à produire des métabolismes secondaires et de métabolites bioactifs fait d'eux une source prometteuse de substance d'intérêt industriel et pharmaceutique.

A cet effet, il serait intéressant d'étudier, à l'avenir, d'un côté, les mécanismes d'adaptation de ces champignons aux conditions extrêmes de croissance, ces mécanismes qui influencent leur réparation et leur caractéristiques physiologiques. D'un autre côté, il serait fort utile d'étudier et d'exploiter leurs potentiels biotechnologiques.

## ***Références Bibliographiques***

1. A.El Halouat,J.M.Deb; (1997) Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated ,from prunesevere ;International Journal of Food Microbiology vol 35/p41\_48.
2. A.H.Moubasher, S.I.I.Abdel-Hafez, M.M.K.Bagy et M.A.Abed Sata; 1990; Halophilic and halotolerant fungi in cultivate dessert and salt marsh from Egypt .ACTA Mycological .Vol XXVI :P 65-81..124.
3. Abu-Seidah A.A. (2003). Secondary metabolites as comarkers in the taxonomy of *Aspergillus* ACTA .Microbiologica.Polonica VOL 52 : P15-23.
4. Ahouirén Kouadio, Ahmed Lebrihi,Georges N’zi Agbo,Floreonce Mathieu, Annie Pfohl-Leszkowiz et Mireille Bretin Dosso; 2007; Influence de l’interaction de la temperature et de l’activité de l’eau sur la croissance et la production de l’ochratoxine A par *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* et *Aspergillus ochraceus* sur un milieu de base café. J Microbiologie VOL 53 p 852-859..
5. Antonie van Leeuwenhoek (1997) édition 72: P261–270,. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
6. Atef Jaouani, Mohamed Neifar, Valeria Prigione, Amani Ayari, -Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaghuchi, T., Varga, J. et Samson Bennett, J.( 2010) An Overview of the Genus *Aspergillus*. In M. Machida and K. Gomi *Aspergillus* Molecular Biology and Genomics.
7. Atef Jaouani, Mohamed Neifar, Valeria Prigione,Amani Ayari, Imed Sbissi, Sonia Ben Amor, Seifeddine Ben Tekaya, Giovanna Cristina Varese,Ameur Cherif, et Maher Gtari,(2014); Diversity and Enzymatic Profiling of Halotolerant Micromycetes from Sebkh El Melah, a Saharan Salt Flat in Southern Tunisia, Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International Volume 2014,P 11 ;Article ID 439197.
8. Brase S, Encinas A, Keck J, Nising CF. (2009) Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. Chemical Reviews, VOL109, P39031.-3990.
9. Cristina Tabuc, Alina Georgeta Neacsu, Ciprian Stroia, (2010). Incidence of *Aspergillus* strains and of aflatoxin b1 in cereals in southwestern

- Romania p8. Christensen, M. 1981. A synoptic key and evaluation of species in the *Aspergillus flavus* group. Journal of Mycological VOL73:P 1056-1084.
10. Damare S, Singh P. Raghukumar S,(2012). Biotechnology of marine fungi. In: Raghukumar C, editor. Biology of marine fungi. Berlin, Heidelberg: Springer. Progress in Molecular and Subcellular Biology VOL 53. P278-291.
11. David S Hibbett 1, Manfred Binder, Joseph F Bischoff, Meredith Blackwell, Paul F Cannon, Ove E Eriksson, Sabine Huhndorf, Timothy James, Paul M Kirk, Robert Lücking, H Thorsten Lumbsch, François Lutzoni, P Brandon Matheny, David J McLaughlin, Martha J Powell, Scott Redhead, Conrad L Schoch, Joseph W Spatafora, Joost A Stalpers, Rytas Vilgalys, M Catherine Aime, André Aptroot, Robert Bauer, Dominik Begerow, Gerald L Benny, Lisa A Castlebury, Pedro W Crous, Yu-Cheng Dai, Walter Gams, David M Geiser, Gareth W Griffith, Cécile Gueidan, David L Hawksworth, Geir Hestmark, Kentaro Hosaka, Richard A Humber, Kevin D Hyde, Joseph E Ironside, Urmas Kõljalg, Cletus P Kurtzman, Karl-Henrik Larsson, Robert Lichtwardt, Joyce Longcore, Jolanta Miadlikowska, Andrew Miller, Jean-Marc Moncalvo, Sharon Mozley-Standridge, Franz Oberwinkler, Erast Parmasto, Valérie Reeb, Jack D Rogers, Claude Roux, Leif Ryvarden, José Paulo Sampaio, Arthur Schüssler, Junta Sugiyama, R Greg Thorn, Leif Tibell, Wendy A Untereiner, Christopher Walker, Zheng Wang, Alex Weir, Michael Weiss, Merlin M White, Katarina Winka, Yi-Jian Yao, Ning Zhang. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycology VOL111:P 47-509.
12. E. V. Smolyanyuk et E. N. Bilanenko, (2011), Communities of Halotolerant Micromycetes from the Areas of Natural Salinity, , Vol. 80, pp. 877-883.
13. Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., and Samson, R.A. (2007). The status of species recognition and identification in *Aspergillus*. Stud. Mycology .VOL 59,P 1-10.
14. Greve H, Mohamed IE, Pontius A, Kehraus S, Gross H, König GM. (2010) Fungal metabolites: structural diversity as incentive for anticancer drug development. Phyto-chemistry Reviews, 9, p 537-545.

15. Guillaume Desoubieux. Et J. Chandener; 2010. Biological diagnosis of an *Aspergillus* infection. feuillets de Biologie VOL 293.
16. Gunde-Cimerman N, Zalar P, Petrovič U. Fungi in the salterns. In: Ventosa A,
17. Henry, T., Iwen, P. C. ET Hinrichs, S. H. (2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, VOL 38(4), P 1510- 1515.
18. Hissein Ousman Abdoullahi ,Abdelsalam Tidjani ,Adama Sawadogo ;Bakary Tarnagda ;Lawane Idriss Abakar ;Hama Cissé Yves Traoré et Aly Savadogo (2019): *American Journal of Innovative Research and Applied Sciences*. P2429-5396.
19. Hocking, A.D. (2006). *Aspergillus* and related teleomorphs: Food Spoilage Microorganisms, P. 451–487 Woodhead Publishing Ltd, Australia.
20. Houbraken, J., & Samson, R. A. (2011). Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. *Studies in Mycology*, p1-51.
21. J. Houbraken, S. Kocsub\_, C.M. Visagie, N. Yilmaz, X.-C. Wang, 4M. Meijer, B. Kraak, V. Hubka, K. Bensch, R.A. Samson, and J.C. Frisvad, (2020), Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species.p.
22. Jean Bussiéras, René Chermette et René Bussiéras. (1993) *Mycologie vétérinaire* -
23. Jean Marie Lehn, Muriel Gargoud, D.Despois, Jp.Parisot et J-Reisse (2003) ;les traces de vivants ;presses Universitaire de Bordeaux pessae,;P255-256.
24. Joan W. Bennett (2010) An Overview of the Genus *Aspergillus* p3\_p4.
25. Jos Houbraken<sup>1</sup>, Ronald P. de Vries, Robert A. Samson (2014). Modern Taxonomy of Biotechnologically Important *Aspergillus* and *Penicillium* Species. *Microbiology*, Volume 86.P200.
26. Joseph Guarro, Melissa Orzechowski Xavier, and Luiz Carlos Severo,(2009), Differences and Similarities Amongst Pathogenic *Aspergillus* Species. A.C. Pasqualotto (ed.),

27. Karim M, Alam M, Shah AA, Ahmed R, Sheikh H. (1997) Chronic invasive aspergillosis in apparently immunocompetent hosts. Clin Infect Dis. Apr; 24 (4): 723-33.
28. Klich M (2002) Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. Mycologia VOL 94: P21-27.
29. Livia Martinelli • Polona Zalar • Nina Gunde-Cimerman • Armando Azua-Bustos • Katja Sterflinger • Guadalupe Piñar (2017). *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology. p755
30. Livia Martinelli<sup>1,2</sup> • Polona Zalar<sup>3</sup> • Nina Gunde-Cimerman<sup>3</sup> • Armando Azua-Bustos<sup>4</sup> • Katja Sterflinger<sup>1</sup> • Guadalupe Piñar<sup>1</sup> (2017), *Aspergillus atacamensis* and *A. salisburgensis*: two new halophilic species from hypersaline/arid habitats with a phialosimplex-like morphology, DOI 10.1007/s00792-017-0941-3
31. Lubertozzi D, Keasling JD. (2009) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression. Biotechnology Advances, vol 27, p53-75.
32. M. Suhail .Fozia Irum, T. Jatt Farzana Korejo et Abro (2007); *Aspergillus* microflora isolated from soil of Kotri barrage Sindh Pakistan: Pak J. Bot. VOL39(3):P981-984.
33. Mahmoud M. Elaasser (2011) J. Microbiol. Biotech. VOL 1 (4):P5-17
34. Michel AUBIIR, Bruno Crestani Michel Fournier, Hervé Mal (2009). Traité de pneumologie 2<sup>ème</sup> édition. Flammarion Médecine-Sciences. 87 quai Panhard -et-Levassor 75013 Paris.
35. Mohammed S. Alhussaini (2013). Evaluation and Molecular Characterization of *Candida* species in Urine Samples from Renal Failure Patients Journal of pure and applied Microbiology , Vol. 7(1), p. 65-77.
36. Mona S. S. Al Tamie (2016) Sodium Chloride Stress Induced Morphological Changes in Some Halotolerant Fungi, The Egyptian Journal of Hospital Medicine Vol. 62, Page 109 – 126
37. Moreno ML, Perez D, Garcia MT, (2013) Halophilic bacteria as a source of novel hydrolytic enzymes. Life; p38–51.
38. Mullins J, Harvey R, Seaton A (1976). Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). Clin Allergy. May; 209-17.

39. Nelly Contet-Audonnaeu, Claude Guiguen, Dominique Chabasse, (1999) Mycologie médicale ,page 27
40. Oren A. (2002) Halophilic microorganisms and their environments. Dordrecht: Kluwer Academic .
41. Oren A. (2010) Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. Environ Technol., p825– 834.
42. Pierre Dutuit, Robert Gorenflot; (2016) Unité du monde vivant et développement durable; p269.
43. Pitt JI. (1994) The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. J Med Vet Mycol. 32 Suppl 1: p17-32.
44. R.A. Samson, C.M. Visagie, J. Houbraken, S.-B. Hong, V. Hubka, C.H.W. Klaassen, G. Perrone, K.A. Seifert, A. Susca, J.B. Tanney, J. Varga, S. Kocsub\_e, G. Szigeti, T. Yaguchi, and J.C. Frisvad. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*.
45. Raja Chamekh, Franck Deniel, Christelle Donot, Jean-Luc Jany, Patrice Nodet & Lakhder Belabid (2019). Isolation, Identification and Enzymatic Activity of Halotolerant and Halophilic Fungi from the Great Sebkh of Oran in Northwestern of Algeria, Mycobiology, 47: 2, p230-241,
46. Raper, K.B., and Fennell, D.I. (1965). The Genus *Aspergillus* (Baltimore: Williams & ilkins).
47. Régine Steiman, Pascale Guiraud, Lucile Sage & Franc,oise Seigle-Murandi .(1997) . Soil mycoflora from the Dead Sea Oases of Ein Gedi and Einot Zuqim (Israel). *Kluwer Academic Publishers.VOL 72*: 261–270.
48. ROBERT A. SAMSON (1994). Taxonomy-Current Concepts of *Aspergillus* Systematics. *Aspergillus*, edited by J. E. Smith. Plenum Press, New York, 1994.
49. Rosita Samad, Mahdi Arzanlou, Youbert Ghosta and Abbas Samadi (2015). Biodiversity of *Aspergillus* species in soils of the National Park of Urmia Lake (NW Iran) Rostaniha VOL 16(2):135-145.
50. Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. et Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. Stud Mycol, 59, 147-203. doi: 10.3114/sim.2007.59.14

51. Samson, R. A., Seifert, K. A., Kuijpers, A. F. A., Houbraken, J. A. M. P., & Frisvad, J. C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial b-tubulin sequences. *Studies in Mycology*, 49, 175–200.
52. Samson, R. A., Yilmaz, N., Houbraken, J., Spierenburg, H., Seifert, K. A., Peterson, S. W., et al. (2011). Phylogeny and nomenclature of the genus *Talaromyces* and taxa accommodated in *Penicillium* subgenus *Biverticillium*. *Studies in Mycology*, 70, 159–183.
53. Samson, R.A., and Pitt, J.I. (1990). *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*. series A: life science VOL185 (New York: Plenum Press).
54. Saori Amaike and Nancy P. Keller (2011). *Aspergillus flavus*. The Annual Review of Phytopathology is online at [phyto.annualreviews.org](http://phyto.annualreviews.org).
55. Sarah EVANS a, Ryan W. HANSEN a, Heather M. STONE a & Mark A. SCHNEEGURT , Isolation and Characterization of Halotolerant Soil Fungi from the Great Salt Plains of Oklahoma (USA), *Cryptogamie, Mycologie*, 2013, 34 (4): 329-341
56. Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 109, 6241–6246.
57. Sidjè Paule-Marina Nanguy a , Jean-Marie Perrier-Cornet a , Maurice Bensoussan b , Philippe Dantigny a, Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species, *International Journal of Food Microbiology* 142 (2010) 273–276.
58. Skouboe, P., Frisvad, J. C., Lauritsen, D., Boysen, M., Taylor, J. W., & Rossen, L. (1999). Nucleotide sequences from the ITS region of *Penicillium* species.
59. Valerie Gonsalves, Shweta Nayak and Sarita Nazareth. Halophilic fungi in a polyhaline estuarine habitat. *Journal of Yeast and Fungal Research* Vol. 3(3), pp. 33-36, May 2012 Available online at <http://www.academicjournals.org/JYFR> DOI: 10.5897/JYFR12.007 ISSN 2141-2413.