



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة محمد البشير الإبراهيمي برج بوعريريج
Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi B.B.A
كلية علوم الطبيعة والحياة وعلوم الأرض والكون
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Science de la Terre et de l'Univers
قسم العلوم البيولوجية
Département des Sciences Biologiques



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de Master
Domaine des Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

**Evaluation du potentiel antimicrobien des
champignons rhizosphériques associés à la plante
médicinale *Peganum harmala* L.**

Présenté par :

KHAZNADJI Maya & TOUAHRIA Lamia

Soutenu le 11/06/2025

Devant le Jury :

Président:	Mr. MERIBAI Abdelmalek	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Encadrante:	Mme. ZERROUG Amina	MCA	Université de Bordj Bou Arreridj
Examinatrice:	Mme. SOUAGUI Yasmina	MCB	Université de Bordj Bou Arreridj

Année Universitaire 2024/2025.

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

En tout premier lieu, nous exprimons nos remerciements et notre profonde gratitude à ALLAH le tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

*La première personne que nous tenons à remercier est notre directeur de mémoire **Mme. ZERROUG Amina**, pour l'orientation, la confiance, la patience qui ont constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.*

*Nous tenons à remercier et à exprimer nous profonde gratitude à **Mr. SADRATI Nouari** pour son aide et son soutien ses encouragements et ses conseils durant la réalisation de ce mémoire.*

*Nous tenons à remercier chaleureusement **Mr. MERIBAI Abdelmalek** qui nous a fait l'honneur de présider le jury, et **Mme. SOUAGUI Yasmina** qui a bien voulu examiner ce travail.*

Nous ne saurions laisser passer cette occasion sans exprimer notre gratitude envers l'ensemble du corps enseignant de la faculté SNV de l'université de BBA.

Nous joignons ces remerciements à toute l'équipe de la conservation des forêts de BBA.

Nous exprimons notre profonde gratitude envers l'ensemble des individus qui ont participé, directement ou indirectement, à l'accomplissement de ce travail.

Dédicaces

Merci mon Dieu de m'avoir donné la capacité d'écrire et de réfléchir, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur

Je dédie ce modeste travail :

À mon père YACINE, écolle de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager,

à me donner l'aide et à me protéger.

À ma mère DOUNIA, celle qui m'a donnée la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite,

Aucune dédicace ne saurait exprimer sa juste valeur le profond amour que je vous porte. Puisse Dieu vous procurer santé, bonheur et longue vie.

A mes très chers frères : Chakib et Mohammed Rassim

À ma grand-mère décédée Benchaib Messaouda

Je sais qu'elle me regarde avec attention et fierté. Je garderai toujours dans mon cœur l'amour qu'elle m'a donné.

Repose en paix mamie

A mes familles KHAZNADJI et BOUAKAZ

Mon binôme Lamia avec qui j'ai eu le plaisir de partager ce modeste travail

Et à tous ceux que je porte dans mon cœur.

Maya





Dédicaces

Par la grâce de dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la persévérance pour achever ce modeste travail, je dédie ma recherche A l'homme de ma vie, mon exemple éternel, mon soutien moral et source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir ;

Mon Père (Ismail)

A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ;

Ma mère (khadidja)

Aux personnes qui m'ont énormément aidée et Pour leur soutien moral et leurs sacrifices le long de ma formation ;

Mes très chers frères (Saïf et Mohamed)

À celui qui fait partie de ma vie, je te remerciant pour ton soutien Sans failles, pour tes encouragements, merci d'avoir supporté mes humeurs, merci pour tes Conseils, pour ta gentillesse.

Mon mari (Zaamouche Chokri)

A ma chère belle-mère (Nedjma)

À ma chère tante Hayat et à ma douce Chaïma, Vous Vous êtes deux étoiles brillantes dans ma vie.

Mes amies (Ines et Khaoula)

À mon binôme Maya,

*Merci pour
ta complicité
et ton soutien !"*

Lamia



Sommaire

المخلص

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction

I. Introduction.....	1
----------------------	---

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes	5
II.1. Matériel	5
II.1.1. Matériel végétal	5
II.1.2 Matériel microbien	6
II.2. Méthodes	6
II.2.1 Echantillonnage	6
II.2.2. Isolement des champignons rhizosphériques	6
II.2.3. Purification et conservation des isolats fongiques rhizosphériques	7
II.2.4. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats rhizosphériques	9
II.2.5. Identification des isolats rhizosphériques.....	10
II.2.6. Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques.....	10
II.2.7. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle.....	11
II.2.8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits	12

Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion.....	13
III.1. Isolement et purification des champignons rhizosphériques	13
III.2. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats rhizosphériques	14
III.3. Identification des isolats rhizosphériques.....	18
III.4. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle	22
III.5. Détermination des CMI	28

Conclusion et perspectives

IV. Conclusion et perspectives	30
Références bibliographiques.....	32

الملخص

الهدف من هذا البحث هو عزل، تحديد، ودراسة النشاط المضاد للميكروبات للفطريات الجذرية المرتبطة بنبات الحرمل (*Peganum harmala* L.) ذو الفصيلة *Zygophyllaceae*، والتي تم جمعها من مناطق الحمادية، الرابطة وبيّاتة (ولاية برج بوعريّيج، الجزائر). باستخدام تقنية التخفيف التسلسلي، تم الحصول على 33 عزلة فطرية. أظهر الفحص الأولي للنشاط المضاد للميكروبات، ضد سلالتين بكتيريتين وخميرة ممرضة، أن 9 عزلات أبدت نشاطاً ملحوظاً ضد كائن حي دقيق واحد على الأقل، حيث تراوحت أقطار تثبيط بين 12 و20 ملم. مكن الفحص المورفولوجي والمجهري لهذه العزلات من تصنيفها ضمن الأجناس الفطرية *Aspergillus*، *Penicillium*، و *Fusarium*. بعد إجراء التخمير في وسط سائل، تم استخلاص المركبات النشطة باستخدام خلاص الإيثيل، وأظهرت نتائج الاختبارات أن أعلى مناطق تثبيط بلغ قطرها 33، 23، 8، 22، 16 و20.8 ملم، وسُجّلت على التوالي بواسطة مستخلصات *Aspergillus sp.1*، *Penicillium sp.1*، *Penicillium sp.2*، *Penicillium sp.3* و *Fusarium sp.* ضد *Micrococcus luteus* NRLL 4375، *Streptococcus pyogenes*. أكدت اختبارات التركيز المثبط الأدنى (MIC) فعالية هذه المستخلصات ضد البكتيريا. وقد أظهر مستخلص *Aspergillus sp.1* فعالية قوية ضد (CMI = 16 ميكروغرام/مل) *Staphylococcus aureus*، بالإضافة إلى نشاط متوسط إلى ضعيف ضد *Micrococcus luteus* NRLL 4375، *Enterococcus faecalis* و ATCC 49452 و *Bacillus cereus* ATCC 10876 في المقابل، أظهر مستخلص *Penicillium sp.1* نشاطاً متوسطاً مع الحفاظ على تأثير مضاد للبكتيريا. تؤكد هذه النتائج الإمكانات الواعدة للفطريات الجذرية كمصادر لمركبات مضادة للميكروبات، وتدعو إلى مزيد من الدراسات المتعمقة للكشف عن نواتجها الأيضية النشطة بيولوجياً.

الكلمات المفتاحية النشاط المضاد للميكروبات، البكتيريا الممرضة، المركبات النشطة بيولوجياً، الفطريات الجذرية، L.

Peganum harmala.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'isoler, identifier et étudier l'activité antimicrobienne des champignons rhizosphériques associés à la plante *Peganum harmala* L. de la famille des *Zygophyllaceae*, collectés à partir des régions de El Hamadia, El Rabta et Bayata-Bordj Bou Arreridj (Algérie). La technique de dilution en série nous a permis d'isoler 33 isolats fongiques. Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des représentants des différents groupes contre deux bactéries et une levure pathogène a montré que 9 isolats étaient actifs sur au minimum un microorganisme pathogène avec des moyennes des zones d'inhibition variant entre 12 et 20 mm. L'identification morphologique et l'observation microscopiques des isolats ayant présentés une activité antimicrobienne marquée nous a permis de les classés parmi les genres fongiques *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Après fermentation en milieu liquide, et une extraction à l'acétate d'éthyle. Les extraits des isolats ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien et ont montré que les zones d'inhibition les plus élevées étaient de 33, 23.8, 22, 16 et 20.8 mm, obtenues respectivement avec les extraits des isolats *Aspergillus* sp.1, *Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.3 et *Fusarium* sp., contre *Streptococcus pyogenes* et *Micrococcus luteus* NRLL 4375. L'analyse des concentrations minimales inhibitrices a confirmé l'activité antibactérienne des extraits des isolats rhizosphériques. L'extrait de *Aspergillus* sp.1 s'est révélé particulièrement efficace contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 16 µg/MI), ainsi qu'une action modérée à faible contre d'autres bactéries (*Micrococcus luteus* NRLL 4375, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 et *Bacillus cereus* ATCC 10876). En revanche, l'extrait de *Penicillium* sp.1 a montré une activité plus modérée, tout en conservant une certaine efficacité antibactérienne. Ces résultats soulignent le potentiel des champignons rhizosphériques comme sources de nouveaux agents antimicrobiens, et encouragent des recherches approfondies sur leurs métabolites bioactifs.

Mots clés : Activité antimicrobienne, Bactéries pathogènes, Molécules bioactives, Champignons rhizosphériques, *Peganum harmala* L.,

Abstract

The objective of this study was to isolate, identify, and evaluate the antimicrobial potential of rhizospheric fungi associated with *Peganum harmala* L. (family *Zygophyllaceae*), collected from the regions of El Hamadia, El Rabta, and Biyata in Bordj Bou Arréridj (Algeria). Using the serial dilution technique, a total of 33 fungal isolates were obtained. Preliminary screening for antimicrobial activity against two bacterial strains and one pathogenic yeast revealed that 9 isolates exhibited inhibitory effects against at least one tested pathogen, with inhibition zones ranging from 12 to 20 mm. Morphological and microscopic analyses of the active isolates enabled their classification into the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*. Following liquid-state fermentation and extraction with ethyl acetate, the crude extracts were further evaluated for antimicrobial activity. The highest inhibition zones 33, 23.8, 22, 16 and 20.8 mm, were recorded for extracts from *Aspergillus* sp.1, *Penicillium* sp.1, *Penicillium* sp.2, *Penicillium* sp.3 and *Fusarium* sp. respectively, against *Streptococcus pyogenes* and *Micrococcus luteus* NRLL 4375. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays confirmed the antibacterial efficacy of these fungal extracts. Notably, the extract of *Aspergillus* sp.1 demonstrated potent activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 16 µg/Ml), and showed moderate to weak effects against *Micrococcus luteus* NRLL 4375, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452 and *Bacillus cereus* ATCC 10876. In contrast, the extract from *Penicillium* sp.1 displayed moderate antimicrobial activity. These findings highlight the promising potential of rhizospheric fungi as sources of novel antimicrobial compounds and warrant further investigation into their bioactive metabolites.

Keywords: Antimicrobial activity, bioactive metabolites, pathogenic bacteria, *Peganum harmala* L., Rhizospheric fungi.

Liste des abréviations

SD : Standard Deviation

°C : Degré Celsius

ATCC : American Type Culture Collection

ATCC : American Type Culture Collection

BN : Bouillon Nutritif

CFI : Concentration Minimale Inhibitrice

DMSO : Diméthylsulfoxyde

GN: Gélose Nutritive

IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration

MH: Mueller-Hinton

NRL: Northern Regional Research Laboratory

PDA: Potato Dextrose Agar

PDB : Potato Dextrose Broth

UFC : Unité Formant Colonie

Liste des figures

Figure 1. <i>P. harmala</i> (A) Plante ; (B) Fleur ; (C) Fruits mûrs ; (D) Graines	02
Figure 2. Structure de la rhizosphère et des tissus racinaire chez les plantes	03
Figure 3. Photo représentative de l'espèce <i>Peganum harmala</i> L.....	05
Figure 4. Sites d'échantillonnage.....	05
Figure 5. Récupération du sol rhizosphériques et préparation des dilutions décimales.....	07
Figure 6. Procédé d'isolement des champignons rhizosphériques.....	08
Figure 7. Conservation des isolats fongiques.....	09
Figure 8. Filtration et décantation des extraits d'acétate d'éthyle.....	11
Figure 9. Quelques photos représentant les isolats fongiques rhizosphériques obtenus après purification.....	14
Figure 10. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne des différents isolats rhizosphériques.....	15
Figure 11. Pourcentage des isolats actifs sur au moins un microorganisme pathogène.....	15
Figure 12. Pourcentages des isolats actifs sur chacun des microorganismes pathogènes.....	16
Figure 13. Quelques photos représentent l'activité antibactérienne obtenue par la méthode des cylindres d'agar.....	16
Figure 14. Aspect macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques les plus actifs.....	21
Figure 15. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat <i>Aspergillus</i> sp. contre les différents microorganismes pathogènes.....	22
Figure 16. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat <i>Penicillium</i> sp.1 contre les différents microorganismes pathogènes.....	23
Figure 17. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat <i>Penicillium</i> sp.2 contre les différents microorganismes pathogènes	24
Figure 18. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat <i>Penicillium</i> sp.3 contre les différents microorganismes pathogènes.....	24
Figure 19. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat <i>Fusarium</i> sp. contre les différents microorganismes pathogènes.....	25
Figure 20. Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les antibiotiques contre les différentes bactéries pathogènes.....	25
Figure 21. Quelques photos représentant l'activité antibactérienne obtenue par les extraits fongiques.....	26

Liste des tableaux

Tableau 1. Description des observations macroscopiques et microscopiques des différents isolats fongiques actifs.....	20
Tableau 2. Les valeurs des CMI ($\mu\text{g}/\text{Ml}$) obtenus par les extraits de <i>Aspergillus</i> sp.1 et <i>Penicillium</i> sp.1 contre les différentes bactéries pathogènes.....	28

Introduction

I. Introduction

Les maladies infectieuses ont toujours constitué une menace majeure pour la santé et le bien-être humain. Les médicaments antimicrobiens jouent un rôle majeur dans la prévention et le traitement des infections. D'après les chiffres et durant les sept dernières décennies depuis l'invention, la production à grande échelle et l'application clinique des antibiotiques, des milliards de patients à travers le monde ont été préservés **(Zhu et al., 2022)**.

Cependant, malgré des avancées continues en médecine, on observe de nos jours la réapparition de certaines maladies infectieuses ainsi que l'augmentation de la résistance des micro-organismes diminuant l'efficacité des antibiotiques et limitant leurs usages cliniques. Il s'avère de plus en plus complexe de gérer les nouvelles pathologies infectieuses. Il est donc pressant de mettre au point de nouveaux antibiotiques afin de modifier la situation. Les produits naturels constituent souvent une source prometteuse car, ils présentent une multitude de propriétés biologiques **(Zhu et al., 2022)**.

L'un des domaines les plus importants en médecine traditionnelle à l'échelle mondiale est la phytothérapie **(Hayet et al., 2010)**. Depuis l'Antiquité et à travers le monde, on utilise les plantes médicinales pour divers traitements. Les plantes renferment une large gamme de composés bioactifs susceptibles de servir au traitement des maladies chroniques et infectieuses **(Arif et al., 2022)**.

Peganum harmala L. (*P. harmala*) (Zygophyllaceae) **(Figure 1)**, aussi connu sous le nom de Harmal en Afrique du Nord, de Esfand en Iran, tandis qu'aux États-Unis, on l'appelle Rue africaine, Rue mexicaine, Rue syrienne ou Rue turque, est considérée comme l'une des plantes médicinales les plus précieuses **(Darabpour et al., 2011, Arif et al., 2022)**.

C'est une plante vivace à fleurs, buissonnante et sauvage possédant une courte racine rampante pouvant atteindre 30 à 100 cm de hauteur. Elle pousse principalement dans des zones semi-arides, des régions steppiques et sur des sols sablonneux. Cette plante se trouve couramment en Afrique du Nord, en Méditerranée, au Moyen-Orient, ainsi qu'au Pakistan, en Inde et en Iran. Elle a également été implantée en Amérique et en Australie **(Darabpour et al., 2011)**. Elle est employée en médecine traditionnelle pour soigner la toux, l'hypertension, le diabète, la jaunisse, les coliques, le lumbago, le paludisme, la maladie d'Alzheimer ainsi que diverses autres affections humaines **(Zhu et al., 2022)**. Par ailleurs, elle a démontré des propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales **(Darabpour et al., 2011)**.



Figure 1. *P. harmala* (A) Plante ; (B) Fleur ; (C) Fruits mûrs ; (D) Graines (Zhu et al., 2022).

On parle de rhizosphère (**Figure 2**) pour désigner la zone microécologique qui entoure les racines des plantes, influencée par les caractéristiques biologiques, chimiques et physiques du sol. Cette région a été initialement décrite par le chercheur allemand Hiltner en 1904. Il l'a définie comme étant la zone du sol entourant les racines et qui est influencée par les exsudats racinaires. Dans cette zones l'activité microbienne est influencée par la présence des plantes et leur croissance. Le sol rhizosphérique est un environnement qui favorise de nombreuses réactions biologiques et chimiques. La quantité et l'activité des micro-organismes peuvent être influencées par la concentration d'acides organiques et d'acides aminés produits par les racines du sol (Al-Abbasi et al., 2021).

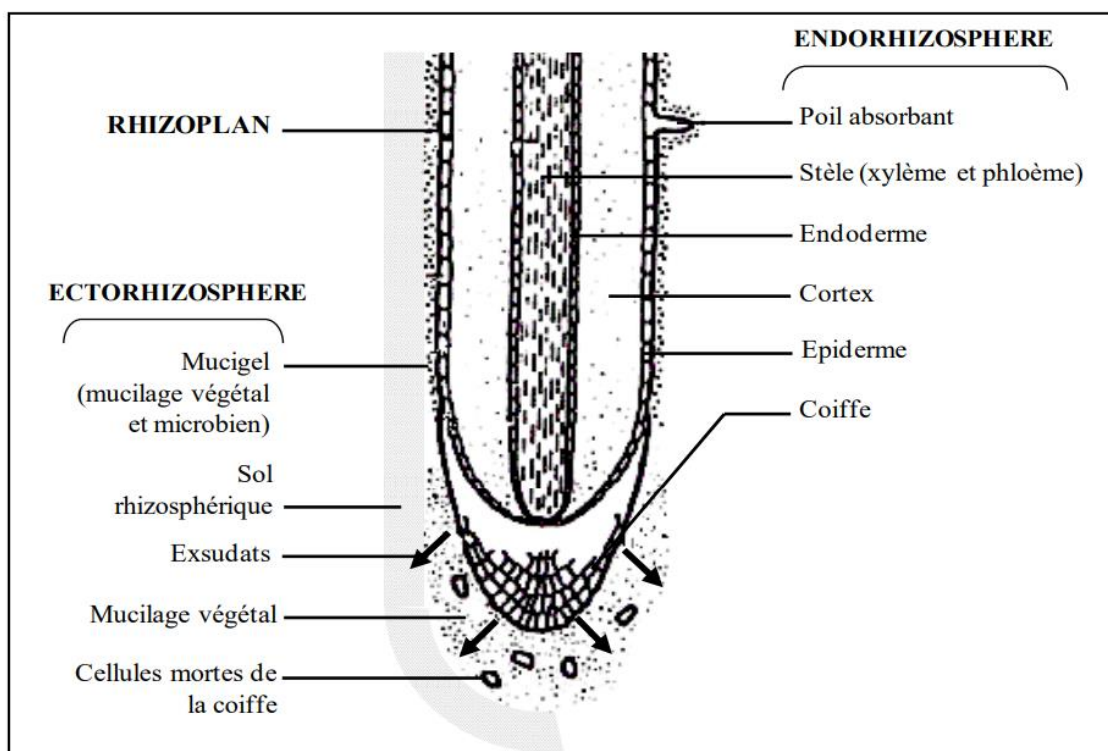


Figure 2. Structure de la rhizosphère et des tissus racinaire chez les plantes (**Lepinay, 2013**).

Les champignons sont des microorganismes hétérotrophes et ubiquistes. Ils constituent l'un des groupes d'organismes les plus significatifs sur notre planète, participant activement dans de nombreux écosystèmes (**Mueller et Schmit, 2007**). Ils sont connus par leur pouvoir de générer une grande variété de produits naturels. Près de 47 % (33 500 sur un total de 70 000) des métabolites secondaires bioactifs dérivés des microorganismes sont produits par des champignons. Particulièrement, les champignons tirés du sol, ils sont perçus comme une ressource prometteuse de composés biologiquement actifs, près d'un tiers des métabolites fongiques proviennent des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (**Niazi et al., 2023**).

Parmi les microorganismes rhizosphériques, Les champignons sont des résidents performants du sol et constituent entre 500 et 5 000 kg de biomasse de l'ensemble des organismes présents, ce qui est considérable. Cela est dû à leur vaste plasticité et leur aptitude à prendre différentes formes en réponse à des conditions défavorables. On retrouve souvent dans le sol des champignons tels que *Amantia*, *Aspergillus*, *Descomyces*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Tricholoma*, *Torrendia*, *Thelephora* et *Verticillium* (**Niazi et al., 2023**).

La majorité des champignons rhizosphériques présents à la surface des racines végétales contribuent à la décomposition de la matière organique, et certains sont même capables de

Introduction

supprimer et d'inhiber les microbes néfastes qui peuvent freiner le développement des plantes. Ils sont connus sous le nom de « Champignons Promoteurs de la Croissance Végétale ». Les communautés fongiques de la rhizosphère ont une influence sur la croissance, l'assimilation des nutriments, la résistance aux maladies et même le décès de la plante hôte, en fonction du degré de parasitisme et de pathogénicité. (Venkateswarlu et al., 2015). On a prouvé que le microbiote fongique de la rhizosphère a un fort potentiel métabolique, ce qui favorise la production d'une vaste gamme de produits métaboliques secondaires (peptaïbols, dicétopipérazines, sesquiterpènes, stéroïdes, etc.). Ces derniers peuvent être utilisés comme agents antimicrobiens, anti-inflammatoires, antitumoraux, antioxydants et même comme stimulateurs de la croissance des plantes (Jayatilake et Munasinghe, 2020).

Ce mémoire vise à isoler, identifier et à évaluer le potentiel antimicrobien des champignons rhizosphériques associés à la plante médicinale *P. harmala*,

Cette étude sera exposée en trois chapitres :

- Le premier chapitre est dédié à une présentation globale qui souligne l'importance des champignons rhizosphériques,
- Le deuxième chapitre, détaille les travaux effectués en commençant par l'isolement des champignons rhizosphériques, le tri et la sélection des isolats potentiellement actifs en fonction de leur capacité antimicrobienne, l'identification morphologique des isolats les plus actifs, la fermentation et l'extraction des substances bioactives, suivi par l'évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits fongiques et la détermination de leurs concentrations minimales inhibitrices.
- Le dernier chapitre est dédié aux résultats obtenus ainsi que leur analyse.

Matériel et Méthodes

II. Matériel et Méthodes

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel végétal

Dans ce travail, la plante *Peganum harmala* L. (**Figure 3**) et son sol rhizosphérique ont été collectés le 19 février 2025 dans les zones de El Hamadia, El Rabta et Bayata-Bordj Bou Arreridj (Algérie) (**Figure 4**).



Figure 3. Photo représentative de l'espèce *Peganum harmala* L. (Personnel, 2025).

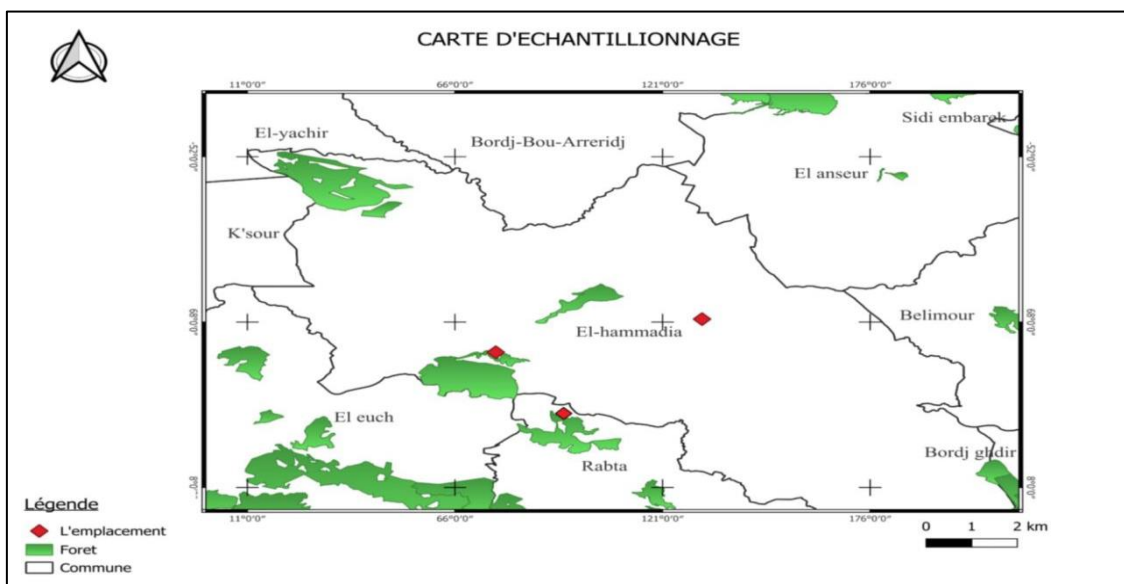


Figure 4. Sites d'échantillonnage.

II.1.2 Matériel microbien

Des tests antimicrobiens ont été effectués sur onze souches microbiennes pathogènes issues de la collection du laboratoire de microbiologie appliquée de l'Université Mohammed El Bachir El Ibrahimi (Bordj Bou Arreridj) :

- **Bactérie à Gram négatif** : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 et *Klebsiella pneumoniae*.
- **Bactérie à Gram positif** : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Micrococcus luteus* NRLL 4375, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Enterococcus faecalis* ATCC 49452, *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes*.
- **Levure** : *Candida albicans* ATCC 1024.

II.2. Méthodes

II.2.1 Echantillonnage

Trois individus sains de *Peganum harmala* L. ont été choisis aléatoirement et un échantillonnage du sol rhizosphérique a été effectué à la base de chacun d'eux en suivant une méthode spécifique pour assurer les meilleures conditions de collecte. Pour cela, après avoir creusé à une profondeur de 15 à 20 cm, les échantillons incluant la plante et son sol rhizosphérique ont été recueillis et conditionnés dans des sacs plastiques identifiés, puis transportés au laboratoire de microbiologie de l'Université Mohamed El Bachir El Ibrahimi pour une utilisation prévue dans les 24 heures suivant la collecte initiale (**Sharma et al., 2016 ; Messaoudi et al., 2020**).

II.2.2. Isolement des champignons rhizosphériques

L'isolement a été effectué en suivant la méthode de dilution-suspension (**Figure 5 et 6**), dont le principe est de diminuer la densité microbienne dans le sol par des dilutions successives. Cette procédure prépare le terrain pour une analyse microbiologique, bien qu'il y ait une chance non négligeable d'éliminer une quantité significative d'espèces microbiennes (**Davet et Rouxel, 1997**).

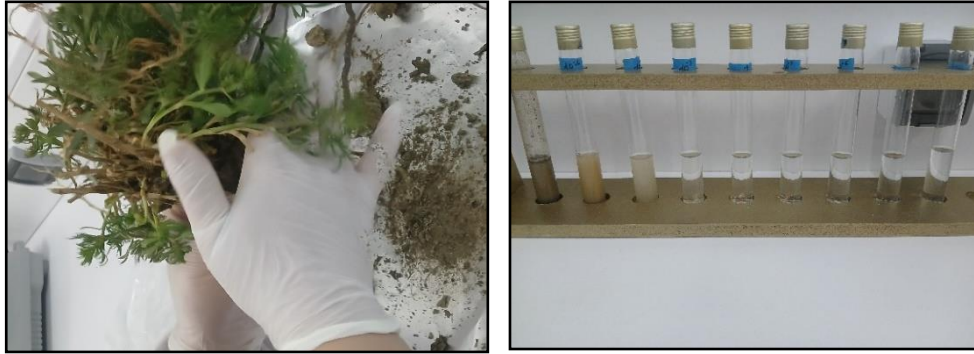


Figure 5. Récupération du sol rhizosphérique et préparation des dilutions décimales.

Le processus de préparation des dilutions débute par la réalisation de la solution mère obtenue en ajoutant 1 g de sol dans 9 ml d'eau physiologique stérile. Par la suite, la solution est agitée avec un vortex pendant quelques secondes, donnant ainsi la première dilution de 10^{-1} . Par la suite, 1 mL de cette solution a été transféré dans un tube contenant 9 mL d'eau physiologique stérile pour obtenir la dilution 10^{-2} . Ce processus a été répété jusqu'à l'obtention de la dilution de 10^{-8} .

Des boîtes de Pétri, contenant du Potato Dextrose Agar (PDA) supplémenté en Gentamicine (30mg/l) et en Pénicilline (30mg/l) ont été utilisées afin d'inhiber la prolifération des bactéries et de favoriser l'isolement des champignons. Un volume de 100 μ L de chaque dilution a été prélevé aseptiquement et réparti uniformément à la surface du milieu de culture en effectuant un mouvement circulaire à l'aide d'un râteau. Il convient de mentionner que chaque dilution est effectuée en triplicata. Les boîtes de Pétri ont été incubées à une température de 28°C pendant une durée de six jours (Ahmed et al., 2022).

II.2.3. Purification et conservation des isolats fongiques rhizosphériques

A partir de chaque colonie fongique poussant à la surface du milieu de culture des boîtes d'isolement, un fragment est prélevé et réensemencé dans une boîte de Petri contenant du PDA. Cette opération est répétée plusieurs fois jusqu'à obtention de culture pure, cette dernière est réencensée une dernière fois sur du PDA (sans antibiotique) et incubée à 30°C pendant 3 à 7 jours (Bilgo et al., 2024).

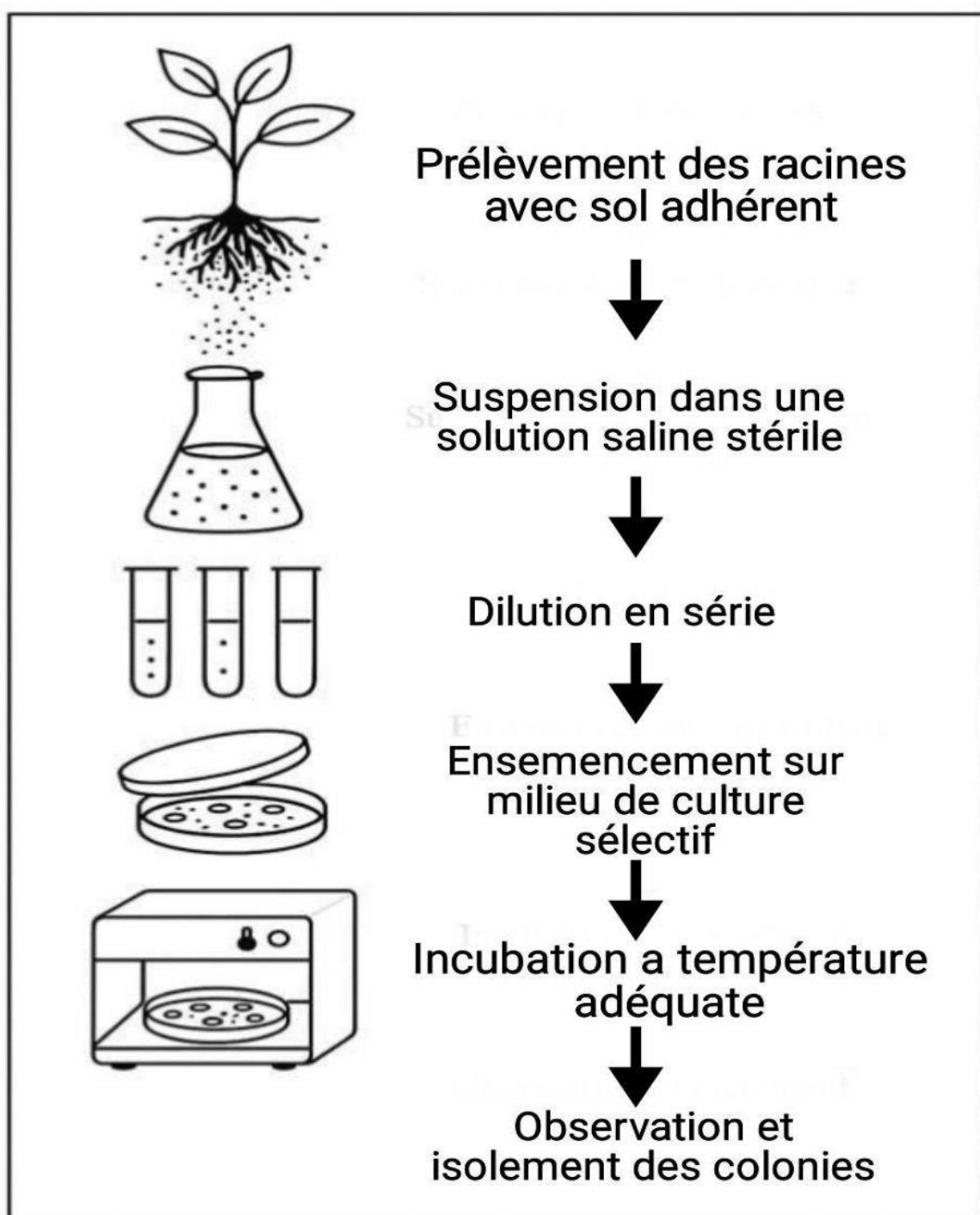


Figure 6. Procédé d'isolement des champignons rhizosphériques.

Les isolats fongiques purifiés ont été ensuite conservés par une méthode économique et facile, consistant à conserver les blocs d'agar dans de l'eau physiologiques stérile (**Figure 7**). Pour cela, des fragments d'agar de 7 à 10 mm² provenant de colonies fongiques pures sont immergés dans de l'eau physiologique stérile. Les tubes sont par la suite agités et conservés à une température comprise entre 1 et 10 °C. Les cultures peuvent être réactivées en transférant

Matériel et Méthodes

un bloc d'agar sur un milieu de culture adapté. Cette technique assure la conservation des propriétés des champignons pour une durée minimale de 7 ans (Boulahrouf et Aouar, 2012).

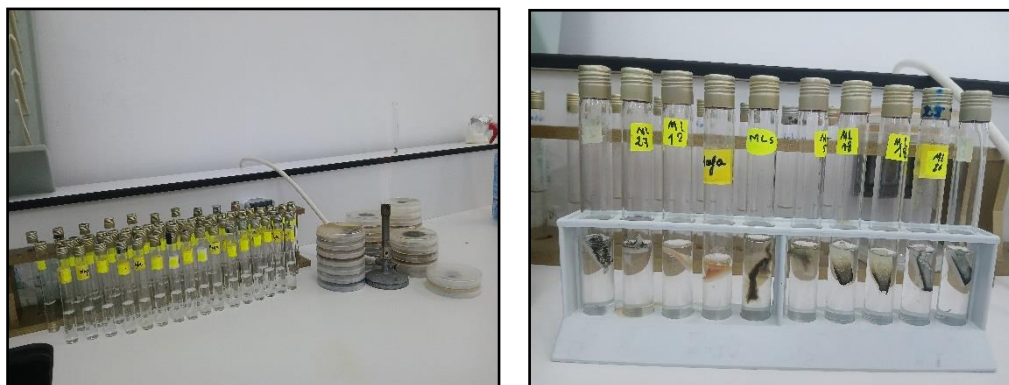


Figure 7. Conservation des isolats fongiques.

II.2.4. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats rhizosphériques

Dans le but de sélectionner les isolats rhizosphériques actifs, la méthode de la double culture de diffusion sur gélose a été utilisée. Ce test repose sur la méthode de diffusion des composés bioactifs produits par les champignons sur des milieux ensemencés avec les souches microbiennes cibles (Mandeel *et al.*, 1998 ; Devaraju et Satish, 2011; Ouzid, 2018).

II.2.4.1. Préparation des champignons rhizosphériques

Les isolats rhizosphériques purifiés ont été aseptiquement transférés entre deux bec Bunsen dans des boîtes de Pétri contenant du PDA sans antibiotiques. Ces boîtes ont ensuite été incubés à une température 28 C° pendant une durée de 15 jours.

II.2.4.2. Réactivation et préparation des inoculums microbiens pathogènes

Les souches microbiennes utilisées à savoir *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 et *C. albicans* ATCC 1024 ont été réactivées par ensemencement sur des boîtes de Petri contenant de la Gélose nutritif (GN) pour les bactéries et du PDA pour la levure. Après incubation à 37 °C pendant 24 heures, des suspensions microbiennes ont été préparées en prélevant quelques colonies bien isolées de chaque culture microbienne. Celles-ci ont été ensuite été suspendues dans 9 ml d'eau physiologique stérile, puis homogénéisées. Les suspensions obtenues ont été calibrées selon la norme 0,5 McFarland en utilisant le spectrophotomètre (densité optique comprise entre 0,08 et 0,1 nm à 625 pour les bactéries et entre 0,12 et 0,17 à 525 nm pour la levure. Les inoculums sont à utilisés dans les 15 minutes suivant leur préparation.

II.2.4.3. Test de la double culture de diffusion sur gélose

Dans ce test, la première étape consistait à ensemencer à l'aide d'un écouvillon trompé dans les suspensions microbiennes préalablement préparées des boîtes de Pétri contenant du

Matériel et Méthodes

GN pour les bactéries et du PDA pour la levure tout en s'assurant que toute la surface est couverte. Par la suite, des cylindres de 6 mm de diamètre provenant des cultures de champignons rhizosphériques âgés de 15 jours ont été disposés à la surface de ces milieux.

Les boîtes ont été placées à 4°C pendant six heures pour favoriser la diffusion des molécules bioactives depuis les cylindres fongiques, et ont par la suite été incubées à une température de 37°C pour une durée de 24 heures pour les bactéries et de 48 heures pour la levure. Les zones d'inhibition formées autour des cylindres fongiques, liées à l'activité antimicrobienne ont été mesurées et enregistrées.

II.2.5. Identification des isolats rhizosphériques

Les isolats fongiques ayant présentés une activité antimicrobienne marquée contre les microorganismes pathogènes ont été sélectionnés pour être identifiés. Pour cela, des boîtes de Pétri contenant du PDA ont été ensemencées avec nos isolats fongiques. Après une incubation à 28°C pendant 5 jours, des observations macroscopiques et microscopiques ont été réalisées (Sadrati, 2021).

II.2.5.1. Observation macroscopique

Cette approche se base sur l'examen des caractéristiques morphologiques des hyphes, tels que la texture, la forme et la dimension des colonies, l'apparence de leurs surfaces, leur odeur, leur couleur et leur rythme de croissance (Dufresne, 2021).

II.2.5.2. Observation microscopique

Pour l'identification au microscope, des frottis sont préparés et colorés avec du bleu de méthylène, les caractéristiques suivantes ont été observées :

- ✓ Détails des hyphes : Couleur, présence ou absence de cloisons (hyphes septés ou coenocytiques).
- ✓ Structures de reproduction.
- ✓ Caractéristiques des spores : Couleur, taille, forme et disposition des spores (Sadrati, 2021).

II.2.6. Fermentation et extraction des métabolites secondaires fongiques

II.2.6.1. Fermentation liquide

A la suite du dépistage préliminaire, les isolats rhizosphériques ayant une activité antimicrobienne modérée à élevée ont été sélectionnés pour la phase de fermentation. Des Erlenmeyers de 1000 ml contenant 100 ml de Potato Dextrose Broth (PDB) ont été inoculés avec des cylindres mycéliens provenant des cultures fongiques rhizosphériques (Sadrati et al., 2013). Les Erlenmeyers ont par la suite été incubés à 28°C pendant 15 à 20 jours, avec une agitation régulière (Ouzid, 2018).

II.2.6.2. Extraction des métabolites secondaires

A la suite de la période de fermentation, les contenus des Erlenmeyers ont été filtrés à travers du papier filtre pour séparer le mycélium du filtrat contenant les métabolites secondaires produites par les champignons rhizosphériques. Par la suite et à chaque filtrat, un volume égal d'acétate d'éthyle a été ajouté. Après une agitation pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur, les phases aqueuses et organiques ont été séparées à l'aide des ampoules à décanter et les phases organiques récupérées puis concentrées par évaporation du solvant (**Figure 8**). Chaque extrait fongique a été dissous dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les extraits ont été conservés à 4°C jusqu'à leur utilisations ultérieurs (**Ouzid, 2018**).

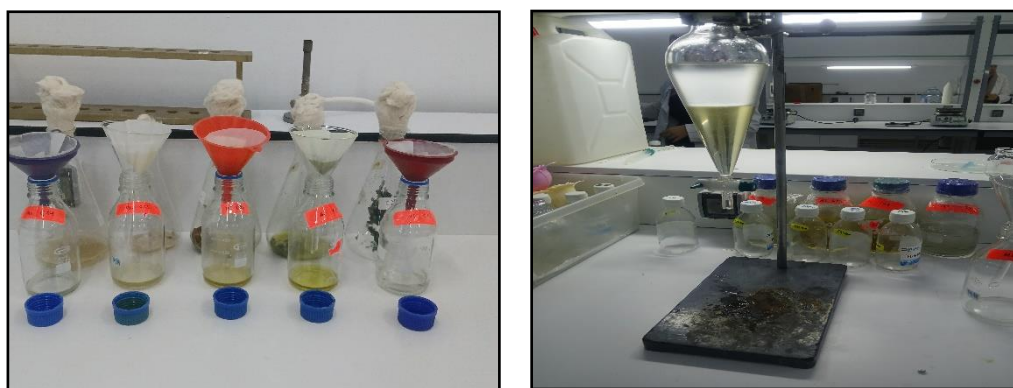


Figure 8. Filtration et décanter des extraits d'acétate d'éthyle.

II.2.7. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos extraits fongiques a été réalisée en suivant la technique des Puits sur gélose, en utilisant les microorganismes pathogènes suivants: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. typhimurium* ATCC 13311, *K. pneumoniae*, *S. aureus* ATCC 25923, *M. luteus* NRLL 4375, *B. cereus* ATCC 10876, *E. faecalis* ATCC 49452, *S. pyogenes*, *L. monocytogenes* et *C. albicans* ATCC 1024.

À l'aide d'un emporte-pièce stérile, des puits de 6 mm de diamètre ont été créés dans des boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton (MH), préalablement ensemencées avec les suspensions microbiennes, dont la turbidité a été ajustées de la même manière qu'accourt du dépistage préliminaire. Chaque puits sont ensuite remplis premièrement avec 70 μ L de gélose mole, après solidification de cette dernière, 35 μ L de chaque extrait ont été ajoutés par-dessus dans le puits. Après la mise au froid des boîtes à 4°C pendant 6 heures afin de favoriser la diffusion des extraits, les boîtes ont ensuite été incubées à une température de 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure. La mesure des zones d'inhibition a ensuite été réalisée (**Zerroug, 2021**). Le test a été réalisé en duplicata. Le DMSO

Matériel et Méthodes

a été utilisé comme témoins négatif alors que trois antibiotiques à savoir : Ciprofloxacine (5 µg), Gentamicine (10 µg) et Ceftazidime (30 µg) ont été utilisés comme témoins positifs.

II.2.8. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des extraits

La CMI correspond à la concentration minimale d'un agent antibactérien, dans des conditions *in vitro* rigoureusement contrôlées, qui empêche totalement la croissance visible de la souche microbienne testée (Kowalska-Krochmal et Dudek-Wicher, 2021).

La détermination des CMI a été réalisée par la méthode de micro-dilution en bouillon de culture dans des plaques de microtitration à 96 puits selon le protocole de **Rodríguez-Melcón et al. (2021)**, avec quelques modifications. Pour ce faire, tous les puits ont été remplis avec 90 µL de bouillon nutritif (BN). Dans le premier puits (A1), 90 µL de la solution mère de l'extrait fongique, préparée dans du BN à une concentration de 2×32768 µg/mL, ont été ajoutés afin d'obtenir une concentration initiale de 32768 µg/mL. Des dilutions en cascade ont ensuite été réalisées à partir de ce puits jusqu'au puits A10 contenant la plus faible concentration, soit 32 µg/mL.

Après calibration de l'inoculum bactérien à 0,5 sur l'échelle de McFarland, (correspondant à environ 10^8 UFC/mL) à l'aide du spectrophotomètre, une dilution au 1/20 dans du BN a été effectuée pour obtenir une concentration de 5×10^6 UFC/mL. Ensuite, 10 µL de cette suspension bactérienne ont été inoculés dans les puits A1-A11, de manière à obtenir une concentration finale d'environ 2×10^5 UFC/mL dans chaque puits. Le puits A11, contenant du BN et les bactéries testées, a servi de contrôle de croissance. Le puits A12, contenant uniquement du BN, a servi de contrôle de stérilité.

Après incubation des plaques à 37°C pendant 24 heures, les résultats ont été interprétés en fonction de la turbidité observée dans les puits, signe de croissance bactérienne. La CMI est définie comme la plus faible concentration de l'extrait fongique pour laquelle aucune croissance bactérienne visible n'est observée.

Résultats et Discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Isolement et purification des champignons rhizosphériques

L'isolement des champignons à partir de la rhizosphère de *P. harmala*, collectée dans les régions de El Hamadia, Biyata et Rabta (wilaya de Bordj Bou Arreridj), a permis d'obtenir un total de 33 isolats fongiques distincts (**Figure 9**).

Cette abondance d'isolats fongiques reflète une diversité fongique élevée au sein du microbiote rhizosphérique de *P. harmala*. Une telle richesse pourrait être attribuée à la composition chimique particulière du sol rhizosphérique, fortement influencée par les exsudats racinaires. En effet, *P. harmala* est reconnue pour sa capacité à produire une large gamme de composés bioactifs, notamment des alcaloïdes (comme l'harmine et l'harmaline), ayant des propriétés allélopathiques et antimicrobiennes (**Rabie et al., 2005; Bouamama et al., 2006**). Ces substances peuvent moduler la communauté microbienne du sol en inhibant certains microorganismes tout en favorisant la sélection de champignons spécifiques, adaptés à ces conditions chimiques particulières (**Bais et al., 2006 ; Mendes et al., 2013**). Ainsi, la rhizosphère de *P. harmala* constitue un environnement microbien unique, propice à la diversification fongique et à l'émergence de niches écologiques spécialisées.

Nos résultats sont en accord avec ce qui a été découvert par **Akram et ses collègues en 2022** qui ont été isolés 24 souches fongiques à partir de la rhizosphère de *P. harmala*, prélevée dans les régions arides du sud du Sinaï. Les genres principalement identifiés étaient *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

Des résultats comparables ont été observés par **Panda et ses collaborateurs en 2009**, portant sur les champignons rhizosphériques associés à 31 espèces de plantes médicinales. Les genres prédominants étaient *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* spp.

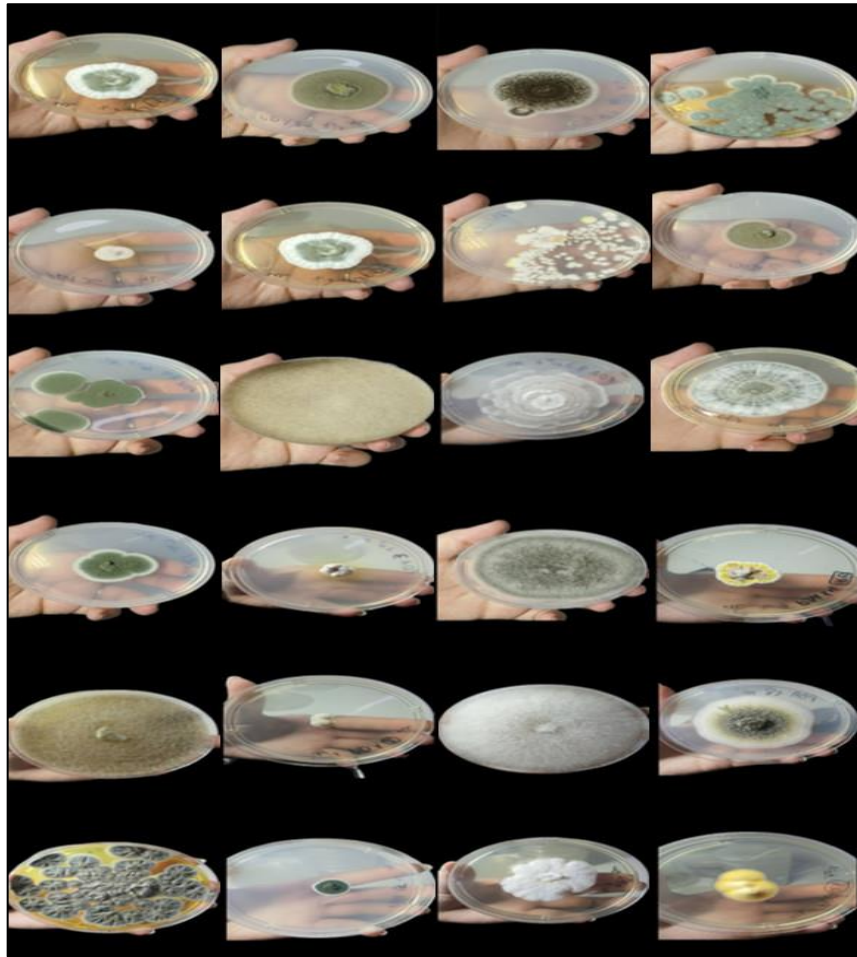


Figure 9. Quelques photos représentant les isolats fongiques rhizosphériques obtenus après purification

III.2. Criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des isolats rhizosphériques

Après l'isolement et la purification des champignons rhizosphériques, un dépistage préliminaire de leur activité antimicrobienne a été effectué contre trois microorganismes pathogènes : *E. coli*, *S. aureus* et *C. albicans*. Parmi les 33 isolats fongiques obtenus, 9 ont présenté une activité antimicrobienne contre au moins l'un des microorganismes pathogènes testés. Tous les isolats actifs ont montré une inhibition de la croissance de *S. aureus* avec des moyennes des zones d'inhibition comprises entre 12 et 20 mm. Un seul isolat CH27 était actif contre *E. coli* avec une moyenne des zones d'inhibition de 13 mm. En revanche, aucun isolat n'a montré d'activité antifongique contre *C. albicans* (**Figure 10**).

Résultats et discussion

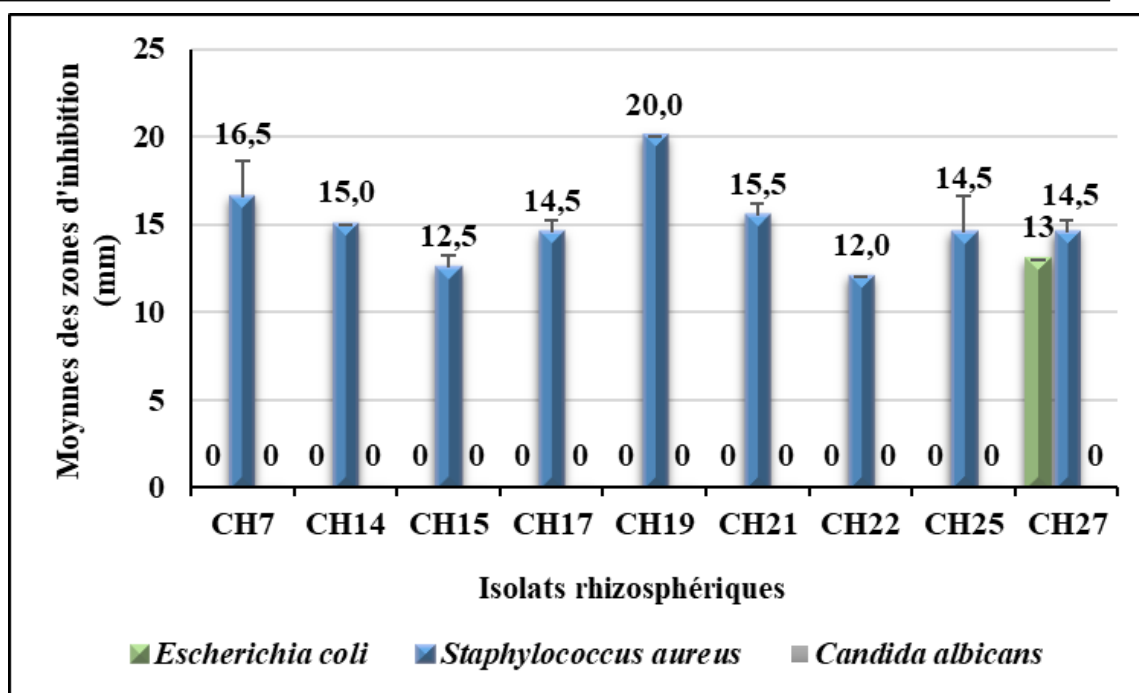


Figure 10. Dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne des différents isolats rhizosphériques. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

Selon les résultats illustrés dans la **figure 11**, 73.73% des isolats fongiques rhizosphériques se sont révélés inactifs, alors que 27.27% d'entre eux présentaient une activité antimicrobienne. Parmi ces derniers, 11.11% étaient actifs contre *E. coli*, 100% ont inhiber la croissance de *S. aureus*. Tandis qu'aucun isolat n'a inhiber *C. albicans* (**Figure 12**).

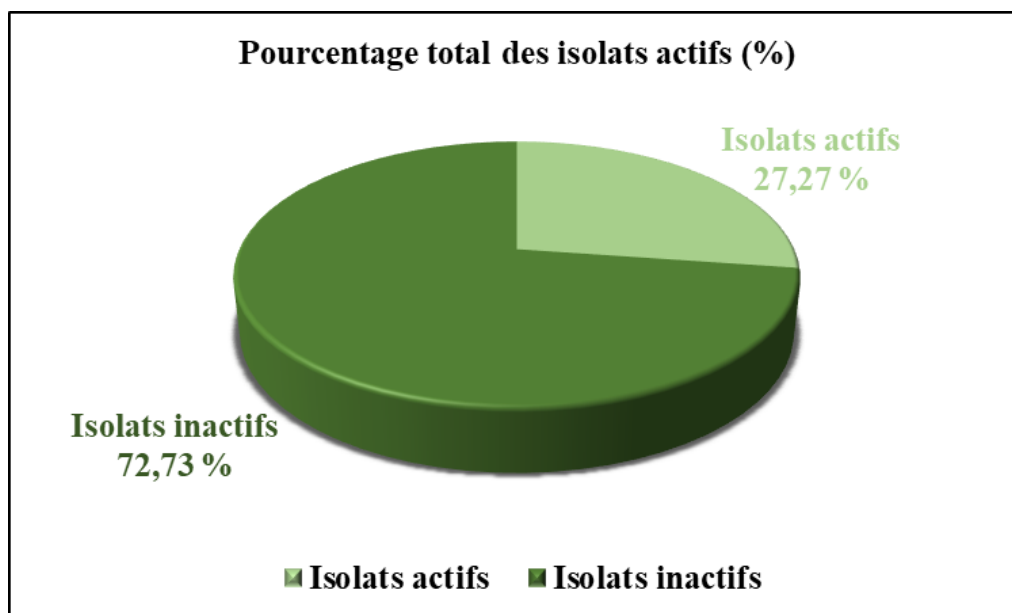


Figure 11. Pourcentage des isolats actifs sur au moins un microorganisme pathogène.

Résultats et discussion

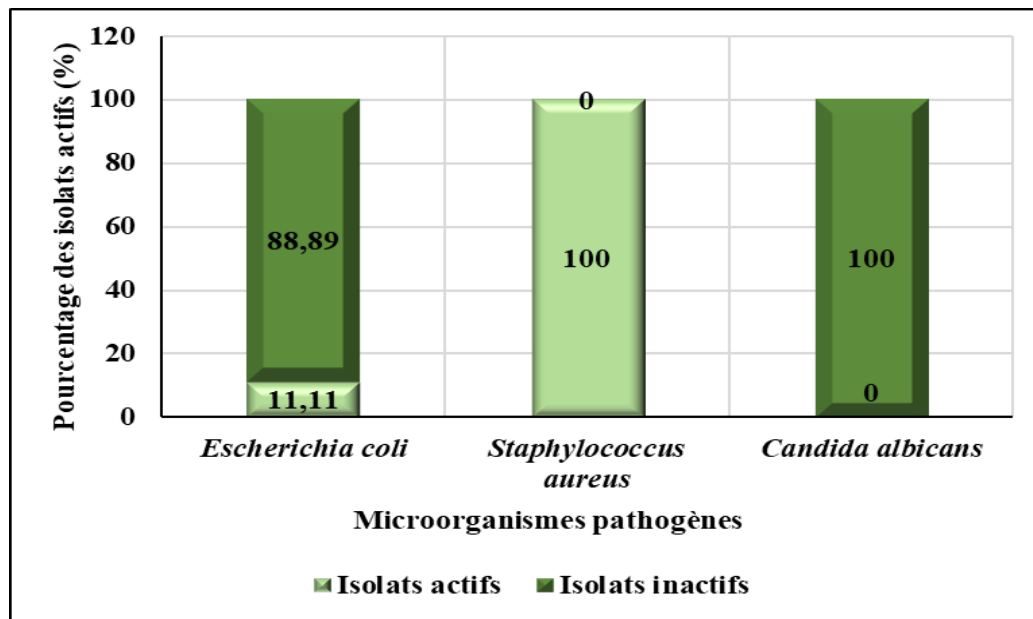


Figure 12. Pourcentages des isolats actifs sur chacun des microorganismes pathogènes.

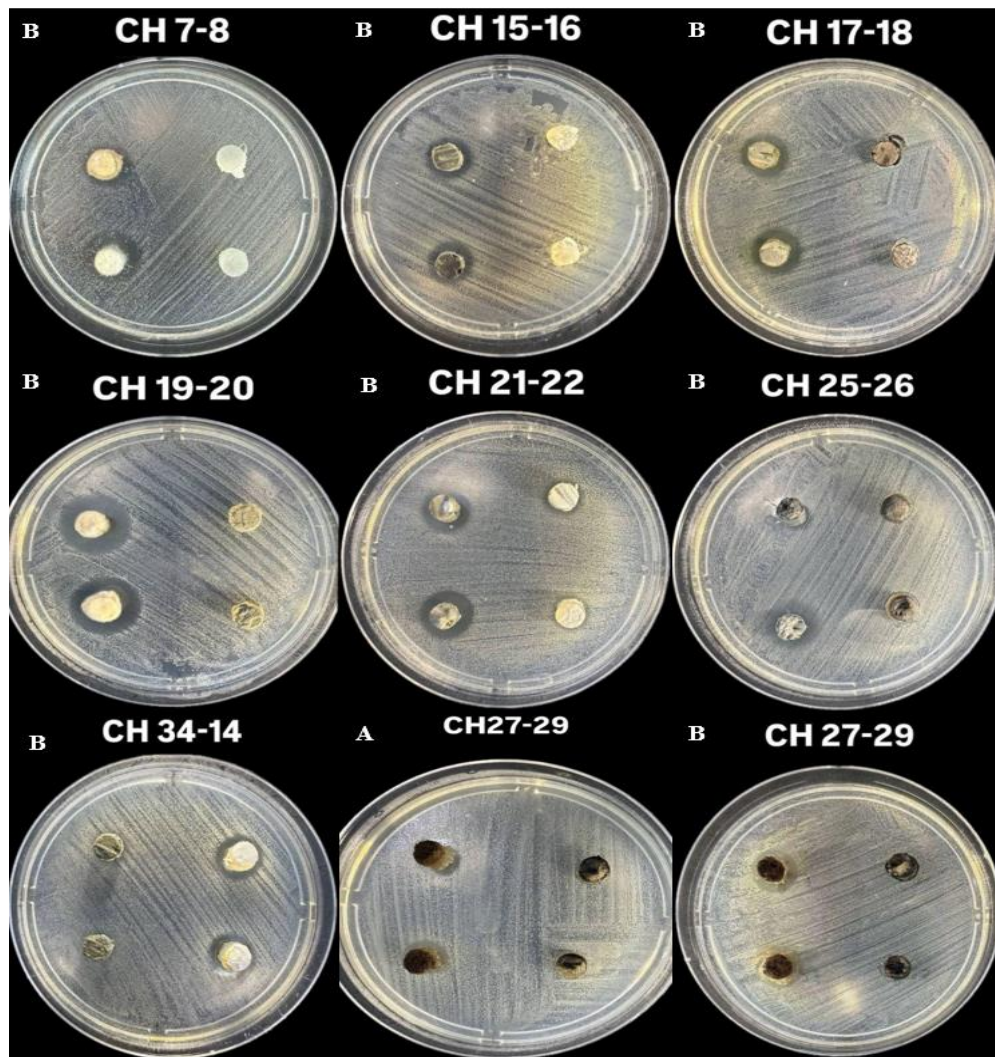


Figure 13. Quelques photos représentent l'activité antibactérienne obtenue par la méthode des cylindres d'agar. **A** : *Escherichia coli*, **B** : *Staphylococcus aureus*.

Résultats et discussion

Les champignons rhizosphériques constituent une abondante source de métabolites bioactifs. Inhibant une vaste diversité de microorganismes pathogènes. Plus de 30 % des substances bioactives identifiées jusqu'à présent chez les micro-organismes sont produites par des champignons (**Arenas et al., 2022**).

L'évaluation de l'activité biologique des souches fongiques obtenues à l'encontre de ces bactéries pathogènes est ce que l'on appelle le test d'antagonisme. Ce test est effectué en suivant la méthode du cylindre d'agar (**Sharma et Prasad, 2011**). Cette méthode a été employée pour établir si l'action antimicrobienne des isolats fongiques provenait de l'extérieur de la cellule (à savoir, un agent antibactérien sous forme de filtrat ou libéré dans le milieu). L'antagonisme aux microorganismes se manifeste par la propagation de molécules bioactives secrétées précédemment par les champignons rhizosphériques dans les cylindres d'agar et leur diffusion dans l'agar inoculé avec les microorganismes tests, créant ainsi des zones d'inhibition (**Prasad et al., 2024**).

L'explication de la résistance de *E. coli* face à une grande partie de nos extraits fongiques réside dans le fait que les bactéries à Gram négatif possèdent une enveloppe cellulaire qui renferme de nombreux mécanismes de résistance à différents antibiotiques (**Gupta et al., 2011**). Ceci peut être expliqué également du fait que les bactéries à Gram négatif possèdent une membrane externe de polysaccharide qui renferme des éléments structuraux lipopolysaccharidiques. Ceci rend la membrane cellulaire non perméable aux composés lipophiles. Toutefois, les bactéries à Gram positif possèdent seulement une couche de peptidoglycane externe, ce qui ne représente pas un obstacle de perméabilité efficace (**Zerroug, 2011**).

C. albicans démontre également une résistance notable aux extraits fongiques ceci s'explique par le fait qu'elle emploie divers mécanismes d'adaptation, comme l'activation des systèmes d'efflux qui rejettent les éléments antifongiques hors de la cellule. La formation de biofilms et les changements structuraux de la paroi cellulaire participent aussi à restreindre l'infiltration et l'efficacité de ces extraits. De plus, l'activation des systèmes enzymatiques de détoxification permet à la levure de contrebalancer les effets oxydants provoqués par les agents antifongiques naturels (**Chemmam et al., 2024**).

Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Arenas et al. (2022)**, qui ont isolé des champignons endophytes et rhizosphériques associés à la fougère molle (*Christella* sp.) et à *Synedrella nodiflora*, toutes deux vivant dans une source chaude à Los Baños, Laguna, aux Philippines. Les auteurs ont identifié que les genres *Penicillium* et *Aspergillus* produisaient des

Résultats et discussion

métabolites secondaires présentant une activité antimicrobienne significative contre la bactérie à Gram positif *S. aureus*.

En 2024, des conclusions similaires ont été obtenues par **Prasad et ses collègues 2024**, ainsi que par **Chemmam et son équipe 2024**, qui ont montré que le genre *Penicillium* possède une activité antibactérienne contre la souche pathogène *S. aureus*, mise en évidence par la formation de zones d'inhibition de tailles variées autour des cylindres mycéliens.

III.3. Identification des isolats rhizosphériques

Les champignons rhizosphériques sélectionnés précédemment après criblage préliminaire de leur activité antimicrobienne ont subi une identification morphologique aboutissant à une description de leur caractéristiques macroscopiques et microscopiques résumée dans le **tableau 1** et la **figure 13**.

Les genres *Aspergillus*, *Fusarium* et *Penicillium* regroupent des champignons filamenteux largement répandus dans l'environnement. Ils sont connus pour leur rôle écologique et industriel, notamment en tant que producteurs de métabolites secondaires bioactifs à fort potentiel antimicrobien ou biotechnologique (**Samson et al., 2014 ; Visagie et al., 2014**). Le genre *Aspergillus* comprend plus de 300 espèces, dont certaines *A. niger* et *A. oryzae* sont utilisées dans la production industrielle d'enzymes et de produits fermentés. Certaines espèces produisent également des mycotoxines dangereuses telles que les aflatoxines (*A. flavus*) (**Samson et al., 2014**). Concernant le genre *Fusarium* est un genre riche en espèces phytopathogènes, affectant des cultures agricoles majeures comme le maïs, le blé et le riz. Certaines espèces produisent des toxines (trichothécènes, fumonisines) dangereuses pour la santé humaine et animale. Le genre présente une grande diversité génétique et une capacité d'adaptation environnementale remarquable (**Al-Hatmi et al., 2016**).

Le genre *Penicillium* est surtout connu pour la découverte de la pénicilline (*P. notatum*), premier antibiotique commercialisé. Certaines espèces sont utilisées en agroalimentaire (*P. roqueforti*, *P. camemberti*), tandis que d'autres produisent des mycotoxines comme la patuline. Il joue également un rôle important en biotechnologie pour la production d'enzymes et la bioremédiation (**Visagie et al., 2014**).

Une étude menée en Corée du Sud par **Park et ses collègues (2020)** a permis d'examiner la diversité des espèces de *Penicillium* isolées à partir des sols rhizosphériques associés à six plantes, réparties entre des environnements terrestres (forêts) et côtiers (dunes de sable). En combinant une analyse morphologique avec une phylogénie moléculaire basée sur les gènes

Résultats et discussion

BenA et CaM, 64 souches ont été identifiées, représentant 26 espèces distinctes. Parmi celles-ci, huit sont nouvellement signalées en Corée, tandis que quatre pourraient être nouvelles pour la science. Les résultats révèlent également que la composition spécifique varie selon la plante hôte, et que le type d'habitat influence significativement la distribution des espèces. Une autre étude réalisée par **Abouamama et ses collaborateurs en 2023**, a permis l'isolement et l'identification différents isolats appartenant aux 3 genres *Aspergillus* (3 isolats), *Penicillium* (1 isolat) et *Fusarium* (2 isolats) à partir des sols rhizosphériques associé à différentes plantes cultivées dans la région de Tamanrasset.

Les deux genre *Aspergillus* et *Fusarium* faisaient également partie des 15 genres fongiques isolés et identifiés à partir des 104 champignons isolés à partir des sols rhizosphériques associés aux plantes *Ocimum basilicum*, *Mentha piperita*, et *Aloe vera* par **Zohair et al., 2018**.

Résultats et discussion

Tableau 1. Description des observations macroscopiques et microscopiques des différents isolats fongiques actifs.

Isolat	Genre supposé	Caractéristiques macroscopiques	Caractéristiques microscopiques	Observations spécifiques
CH14	<i>Aspergillus</i> sp.1	- Après 5 jours d'incubation le diamètre était de 14 mm - Colonies circulaires, blanches - Surface veloutée - Revers incolore à beige clair.	- Présence de conidiophores terminés par des têtes conidiennes rayonnées typiques d'<i>Aspergillus</i>. - Mycélium composé d'hyphes fins et septés (cloisonné)	- Conidies sphériques en chaînes. - Conidiophores bien individualisés.
CH15	<i>Penicillium</i> sp.2	- Après 5 jours d'incubation le diamètre était de 14 mm - Colonies compactes, gris-vert foncé, - Revers incolore.	- Conidiophores ramifiés en forme de pinceaux (pénicilles), avec chaînes de conidies. - Mycélium composé d'hyphes septés (cloisonné) et ramifiés	- Morphologie caractéristique du genre <i>Penicillium</i>.
CH17	<i>Penicillium</i> sp.1	- Après 5 jours d'incubation le diamètre était de 17 mm - Colonies à centre blanc et marge verdâtre - Revers jaune vif.	- Conidiophores bien visibles en forme de brosses (structure pénicillée). - Conidies rondes et en chaînes. - Mycélium composé d'hyphes septés (cloisonné) et ramifiés	- Apparence classique du genre, mais avec une pigmentation jaune intense au revers.
CH19	<i>Fusarium</i> sp.	- Après 5 jours d'incubation le diamètre était de 40 mm - Colonies cotonneuses, blanches à crème - Revers beige.	- Présence de chlamydospores (structures arrondies de survie) - Hyphes septés (cloisonné), multicellulaires	- Typique du genre <i>Fusarium</i>, spores multicellulaires non représentées ici.
CH21	<i>Penicillium</i> sp.3	- Après 5 jours d'incubation le diamètre était de 15 mm - Colonies blanches avec centre légèrement en relief - Revers brun-roux.	- Pénicilles bien formés - Conidies rondes. - Mycélium composé d'hyphes septés (cloisonné) et ramifiés avec conidiophores en forme de brosses (structure pénicillée)	- Différence de coloration au revers qui suggère une espèce différente des deux autres isolats de <i>Penicillium</i>.

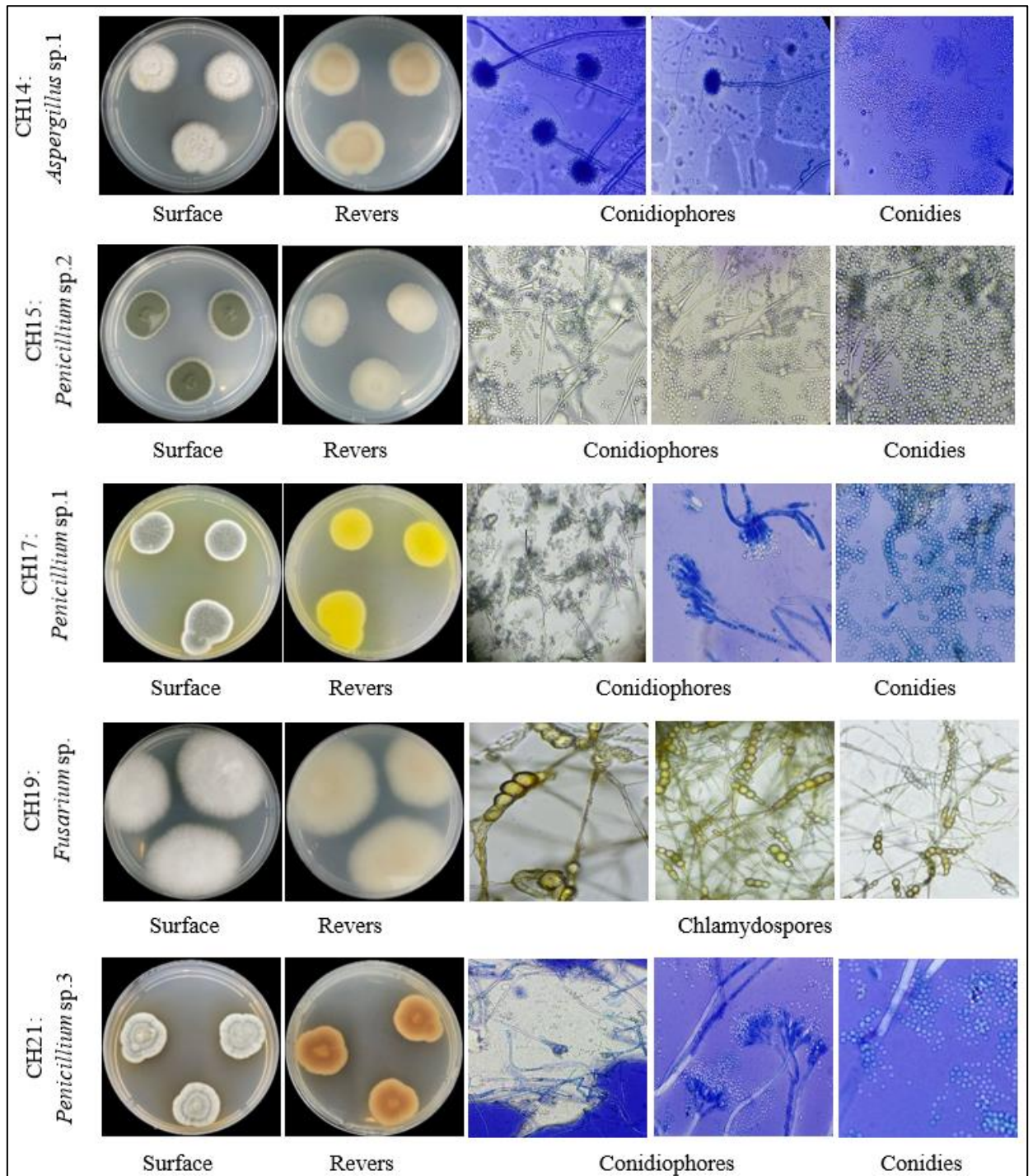


Figure 14. Aspect macroscopiques et microscopiques des isolats fongiques les plus actifs.

III.4. Activité antimicrobienne des extraits d'acétate d'éthyle

Suite à la sélection des isolats fongiques au cours du dépistage préliminaire, une fermentation et une extraction de leurs métabolites secondaire a été réalisé en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant d'extraction. L'activité antimicrobienne des extraits a ensuite été évaluée à l'aide de la méthode des puits contre 11 souches microbiennes pathogènes.

Selon la **figure 15**, l'extrait de l'isolat *Aspergillus* sp. a présenté une activité inhibitrice significative contre la majorité des bactéries à Gram positif à savoir : *S. aureus*, *B. cereus*, *M. luteus*, *S. pyogenes* et *E. faecalis* avec des moyennes des zones d'inhibition atteignant les 33 mm observés contre *M. luteus*. En revanche, aucune activité n'a été observée contre le reste de bactéries ainsi que contre *C. albicans*.

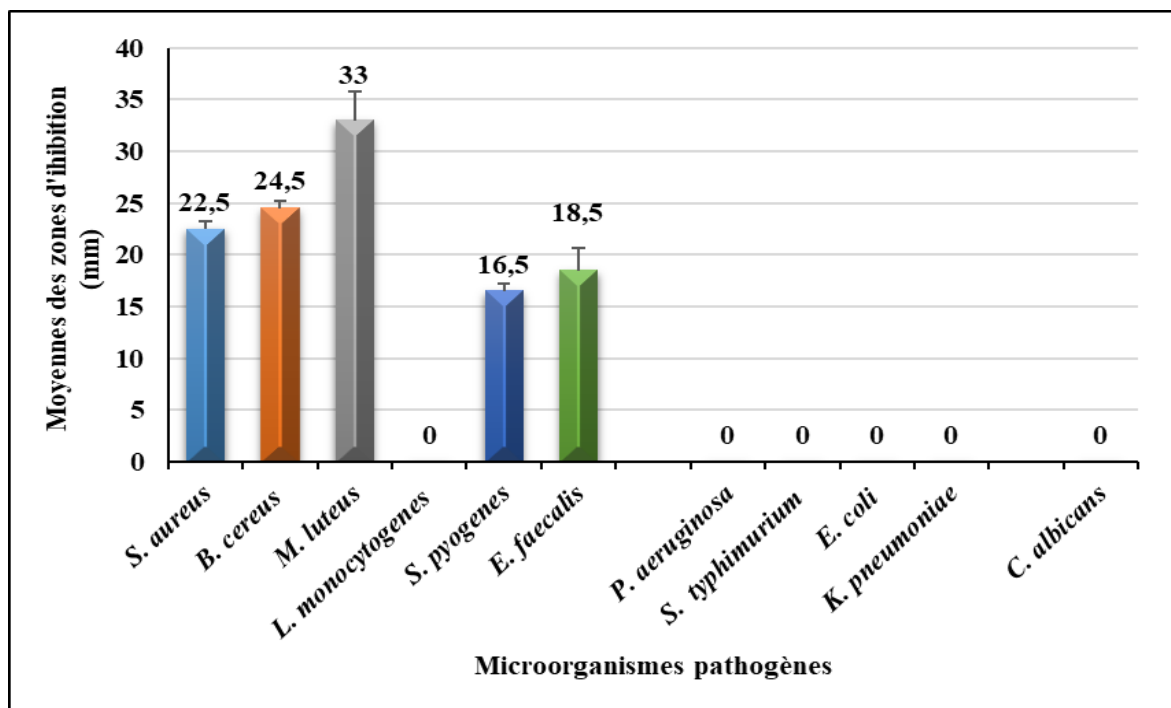


Figure 15. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat *Aspergillus* sp. contre les différents microorganismes pathogènes. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

Concernant l'extrait de l'isolat *Penicillium* sp.1, 4 bactéries à Gram positif sur 6 ont été inhibé, a savoir *S. pyogenes* (16.5 mm), *S. aureus* (18.5 mm), *B. cereus* (21.5 mm) et *M. luteus* (23.8 mm). Le reste des bactéries ainsi que *C. albicans* étaient résistantes (**Figure 16**).

Résultats et discussion

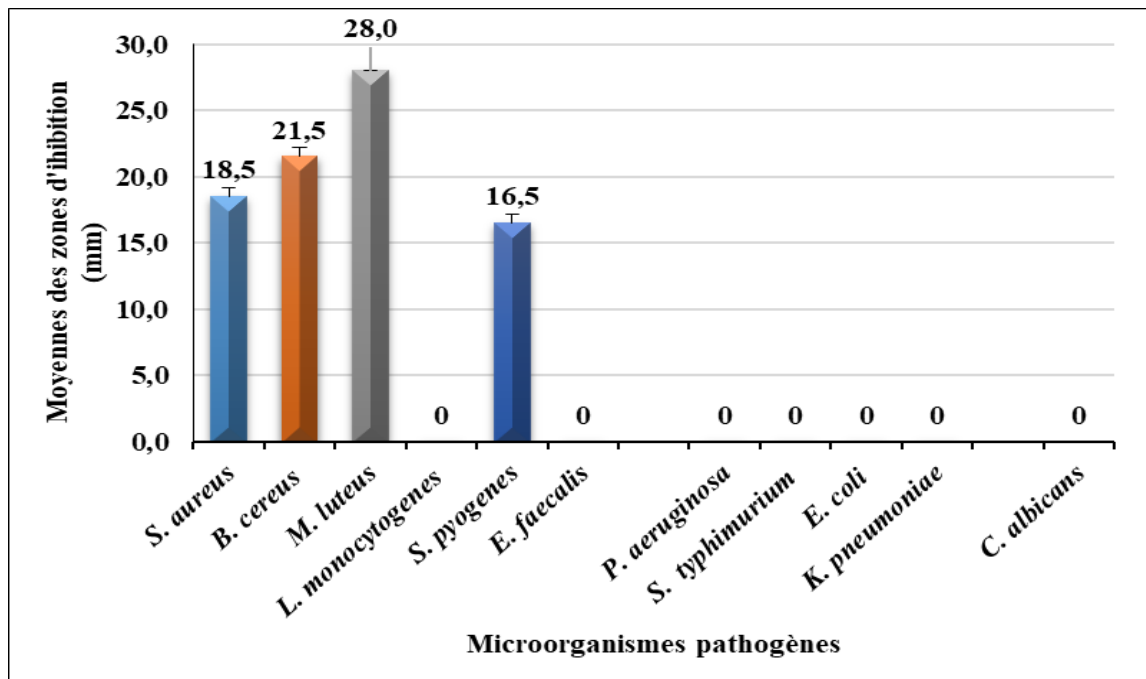


Figure 16. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat *Penicillium* sp.1 contre les différents microorganismes pathogènes. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

Les extraits des isolats *Penicillium* sp.2 (**Figure 17**), *Penicillium* sp.3 (**Figure 18**) et *Fusarium* sp. (**Figure 19**) ont montré une activité inhibitrice ciblé contre les bactéries à Gram positif, avec respectivement des moyennes des zones d'inhibition de 13, 16 et 15 mm observées contre *S. pyogenes*. Cependant, l'extrait de *Penicillium* sp.3 n'a été actif sur aucun autre microorganisme pathogène, contrairement aux extraits de *Penicillium* sp.2 et *Fusarium* sp. qui ont inhibé la croissance de *B. cereus* (15.3 et 14.5 mm) et *M. luteus* (22 et 20.8 mm) respectivement. On remarque également que ces trois extraits ont perdu leurs pouvoir inhibiteur observé lors du dépistage préliminaire contre *S. aureus*.

Résultats et discussion

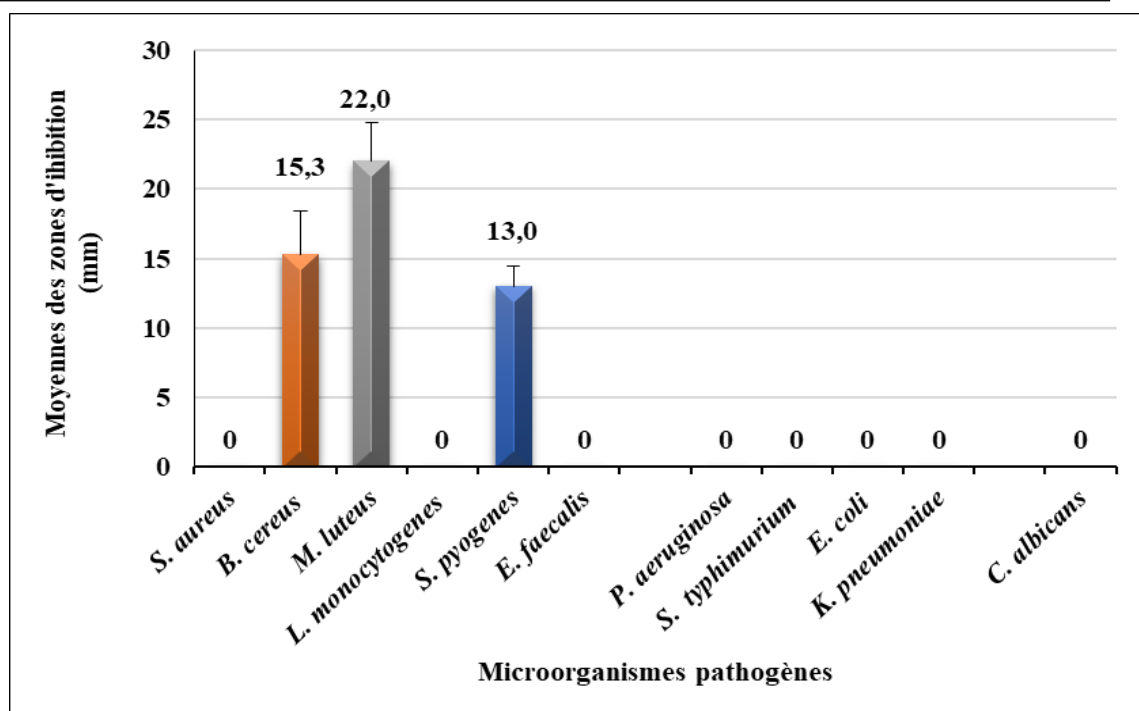


Figure 17. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat *Penicillium* sp.2 contre les différents microorganismes pathogènes. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

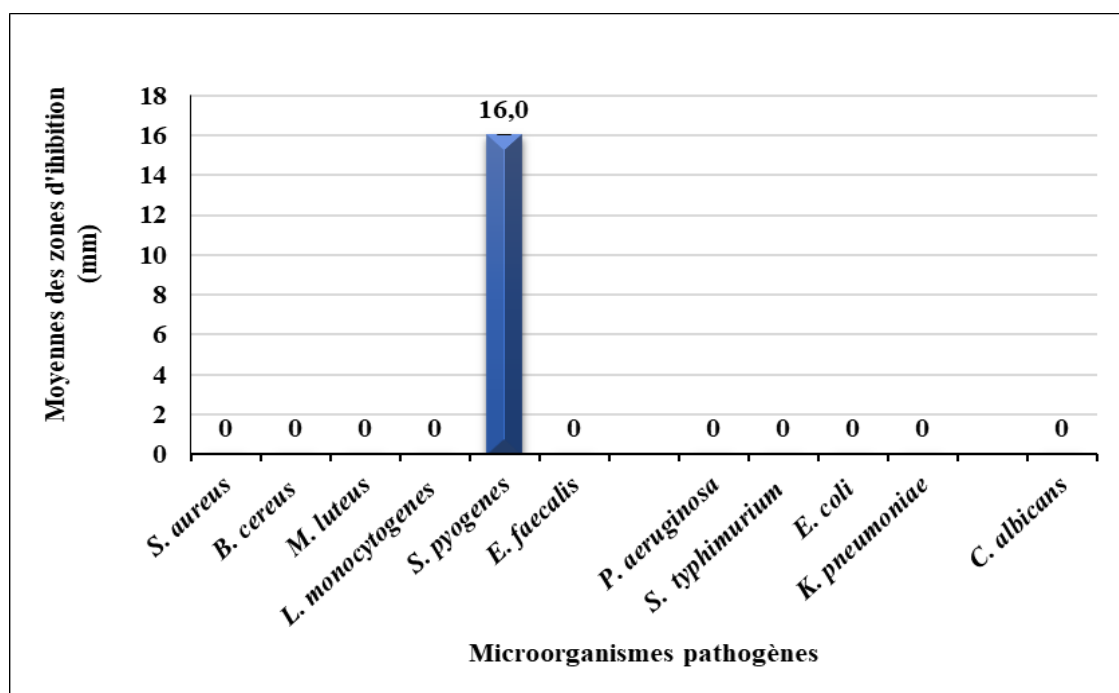


Figure 18. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat *Penicillium* sp.3 contre les différents microorganismes pathogènes. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

Résultats et discussion

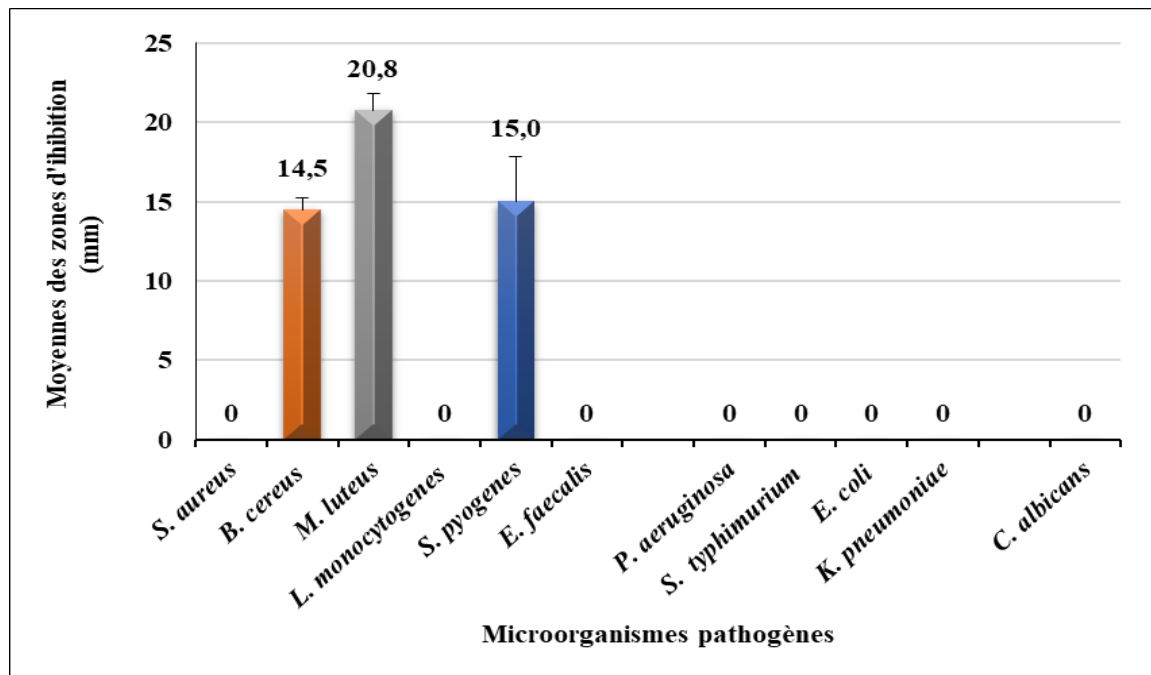


Figure 19. Activité antimicrobienne de l'extraits d'acétate d'éthyle de l'isolat *Fusarium* sp. contre les différents microorganismes pathogènes. Chaque valeur représente la moyenne des deux essais $\pm$ SD.

La comparaison des résultats obtenus avec les extraits fongiques et ceux des trois antibiotiques de référence utilisés montre que contre *B. cereus* et *M. luteus*, tous les extraits à l'exception de l'extrait de *Penicillium* sp. 3 présentaient une activité supérieure à celle de la Ceftazidime. En plus, les extraits de *Aspergillus* sp. et *Penicillium* sp.1 montraient une bonne activité proche de la Gentamicine contre *B. cereus*, alors que contre *M. luteus*, l'activité de ces deux extraits était proche et même meilleure que celle des trois antibiotiques (**Figure 20**).

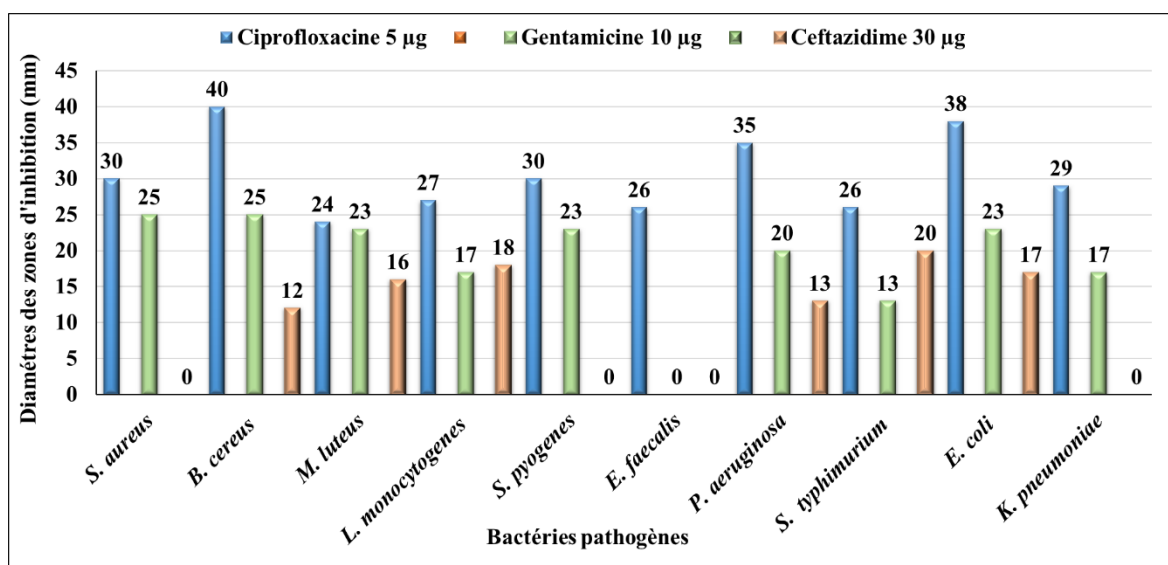


Figure 20. Diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les antibiotiques contre les différentes bactéries pathogènes.

Résultats et discussion

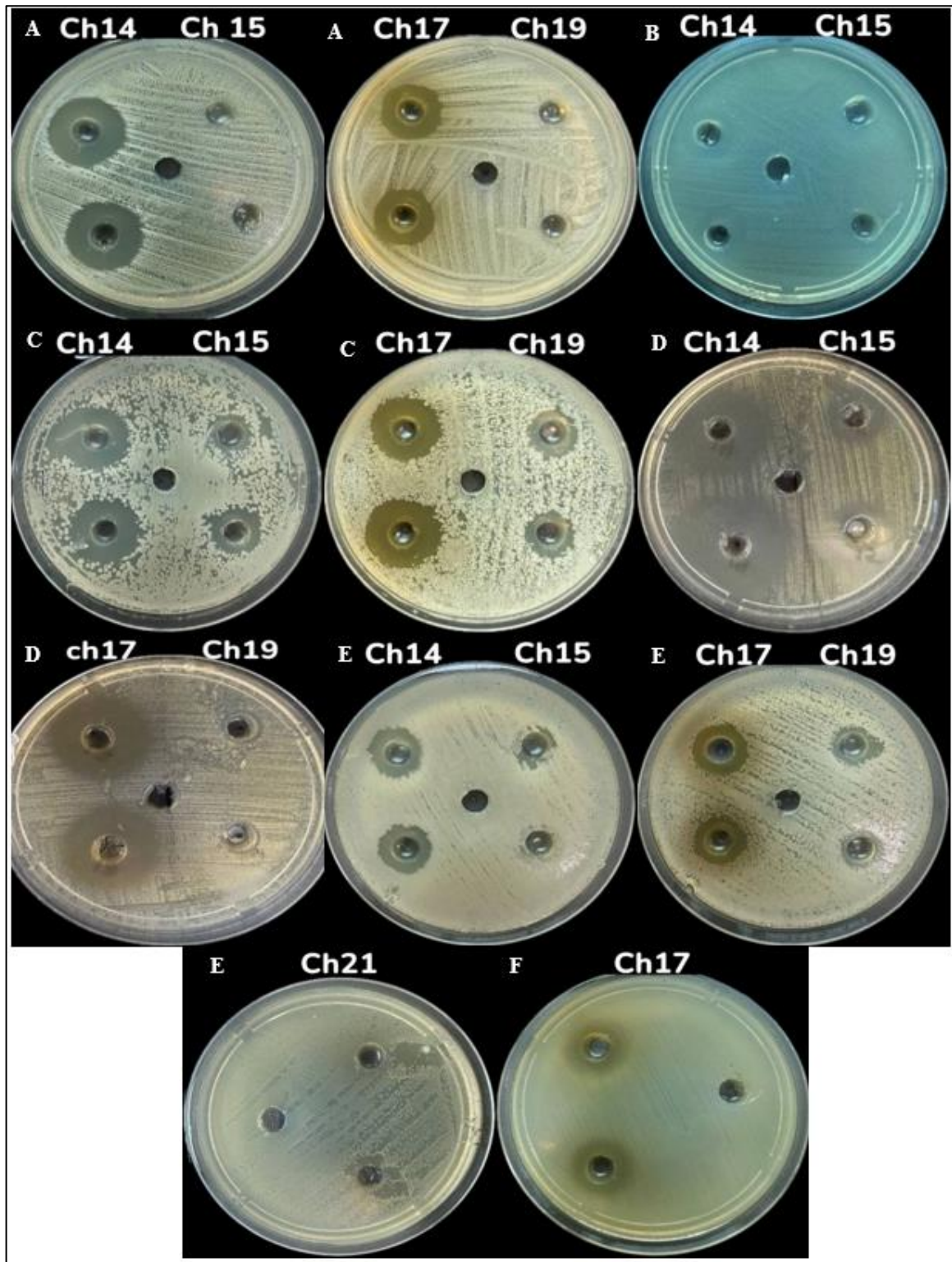


Figure 21. Quelques photos représentant l'activité antibactérienne obtenue par les extraits fongiques. **A :** *S. aureus* ; **B :** *E. faecalis* ; **C :** *B. cereus* ; **D :** *M. luteus* ; **E :** *S. pyogenes* ; **F :** *S. typhimurium*

Nos résultats corroborent ceux de **Baz et al. (2024)**, qui ont souligné un effet inhibiteur notable des extraits de *Aspergillus niger* et *Aspergillus terreus* avec des zones d'inhibition de 10,5 mm et 14,7 mm contre *S. aureus* et de 18 mm et 20 mm contre *Streptococcus pneumoniae* respectivement. Une zone d'inhibition de 34 mm a également été observée avec l'extrait de *Fusarium circinatum* contre *S. pneumoniae*.

Les résultats de **Shehabeldine et al. (2024)** ont mis en évidence les caractéristiques antimicrobiennes de l'extrait d'acétate d'éthyle de *A. terreus*, isolé des feuilles de *Psidium guajava*. L'extrait a démontré une activité antibactérienne significative contre les quatre souches testées, avec une efficacité particulièrement marquée contre *Bacillus sphaericus* et *S. aureus*, présentant des zones d'inhibition de 26 mm et 21 mm, respectivement.

Selon **Prasad et al. (2024)**, la souche de *Penicillium herquei* isolée à partir des feuilles de la plante *Phyllanthus niruri* présente un certain potentiel antimicrobien. L'extrait d'acétate d'éthyle obtenu à partir de cette souche a montré une activité antibactérienne modérée, avec des zones d'inhibition de 5 mm contre *B. cereus* et de 3 mm contre *S. aureus*. Ces résultats indiquent que *P. herquei* produit des métabolites secondaires capables d'inhiber la croissance bactérienne, bien que cette activité demeure relativement faible comparée à d'autres espèces fongiques étudiées. Une autre étude menée par **Ashoka et Shivanna (2023)**, a montré que l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Penicillium citrinum*, isolé comme endophyte de *Jatropha heynei*, a présenté une activité antibactérienne notable contre *S. aureus*, avec une zone d'inhibition mesurée à 16,32 mm. Ces résultats témoignent du potentiel de *P. citrinum* en tant que source de composés bioactifs présentant une efficacité antimicrobienne significative.

Les recherches menées par **Hoque et collaborateurs, 2023** ont permis d'isoler des champignons endophytes, notamment du genre *Fusarium*, à partir de trois plantes médicinales : *Thysanolaena maxima*, *Dracaena spicata* et *Aglaonema hookerianum*. Les souches de *Fusarium* ont présenté une activité antibactérienne significative, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 15,5 mm contre *Bacillus subtilis*, comprises entre 8,8 et 13,5 mm contre *B. cereus*, et atteignant 14,6 mm contre *S. aureus*.

Selon **Badji et al. (2005)**, **Gogoi et al. (2008)** et **Qin et al. (2009)**, l'acétate d'éthyle est le solvant d'extraction le plus efficace permettant d'extraire les métabolites secondaires fongiques.

Résultats et discussion

III.5. Détermination des CMI

Les valeurs des CMI des deux extraits fongiques les plus actifs ont été déterminées en utilisant la technique de micro dilution en bouillon. Les résultats obtenus sont mentionnés dans le **tableau 2**.

Tableau 2. Les valeurs des CMI ($\mu\text{g/mL}$) obtenus par les extraits de *Aspergillus* sp.1 et *Penicillium* sp.1 contre les différentes bactéries pathogènes.

	Extrait de <i>Aspergillus</i> sp.1	Extrait de <i>Penicillium</i> sp.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	16 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$
<i>Bacillus cereus</i>	512 $\mu\text{g/mL}$	1024 $\mu\text{g/mL}$
<i>Micrococcus luteus</i>	128 $\mu\text{g/mL}$	256 $\mu\text{g/mL}$
<i>Enterococcus faecalis</i>	256 $\mu\text{g/mL}$	nt

nt : Non testé

L'extrait de *Aspergillus* sp.1 a montré une bonne activité antibactérienne contre l'ensemble des bactéries testées, avec des valeurs des CMI relativement basses atteignant 16 $\mu\text{g/mL}$ contre *S. aureus*. Des valeurs de 128, 256 et 512 $\mu\text{g/mL}$ ont été respectivement enregistrées contre *M. luteus*, *E. faecalis* et *B. cereus*. En ce qui concerne l'extrait de *Penicillium* sp.1, les valeurs des CMI obtenus étaient un peu plus élevées que celles obtenues par l'extrait de *Aspergillus* sp.1 mais révèlent une certaine activité. Une CMI de 256 $\mu\text{g/mL}$ a été observée à la fois contre *S. aureus* et *M. luteus*, alors que *B. cereus* était plus résistante avec une valeur de CMI de 1024 $\mu\text{g/mL}$.

D'une part les travaux de **Toghueo et al. (2016)** ont démontré que les extraits d'acétate d'éthyle issus des champignons endophytes isolés de *Terminalia catappa*, *Terminalia mantaly* et *Cananga odorata* présentent une activité antimicrobienne significative, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) variant entre 0,019 mg/mL et 5 mg/mL, selon les souches microbiennes testées. Parmi les isolats les plus actifs, les extraits de *Penicillium chermesinum*, *Fusarium* sp. et *Aspergillus* sp. ont montré une efficacité marquée contre une diversité de bactéries et de levures pathogènes. Par ailleurs, les auteurs soulignent que la variabilité de l'activité antimicrobienne observée entre les différents extraits pourrait être attribuée à la diversité structurale des métabolites secondaires produits, à la composition chimique propre à chaque souche fongique, ainsi qu'à la multiplicité de leurs mécanismes d'action. Ces résultats confirment le rôle prometteur des champignons comme réservoirs de

Résultats et discussion

composés bioactifs, en particulier dans le contexte préoccupant de l'augmentation de la résistance aux antibiotiques.

D'autre part, une étude plus récente menée par **Shady et al. (2023)** a mis en évidence le potentiel anti-infectieux des extraits d'acétate d'éthyle obtenus à partir des champignons du genre *Aspergillus* (souches SA1, SA2 et SA3), isolés des graines de *Nigella sativa*. Ces extraits ont montré une activité antimicrobienne marquée contre plusieurs micro-organismes pathogènes, notamment *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, ainsi que *C. albicans*. Parmi les isolats testés, *Aspergillus* sp. SA3 s'est particulièrement distinguée par sa puissance biologique, affichant une valeur d'IC₅₀ de 2,5 µg/mL contre MRSA. L'analyse métabolomique par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse a permis l'identification de 26 composés bioactifs, appartenant à des classes chimiques variées telles que les polykétides, alcaloïdes, phénols et quinones, contribuant potentiellement à l'activité observée.

Conclusion et perspectives

V. Conclusion et perspectives

Cette étude a porté sur l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité antimicrobienne des champignons rhizosphériques associés à la plante médicinale *P. harmala* L. Une plante reconnue pour ses propriétés pharmacologiques collectés dans les régions d'El Hamadia, Biyata et Rabta (wilaya de Bordj Bou Arreridj). Le dépistage préliminaire de l'activité antimicrobienne des 33 isolats fongiques obtenus, réalisé par la méthode des cylindres d'agar a montré que parmi ces isolats, neuf étaient actifs contre au moins un des agents pathogènes testés (*S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*), à savoir, CH7, CH14, CH15, CH17, CH19, CH21, CH22, CH25 et CH27. Parmi ces derniers, 5 isolats (CH14, CH15, CH17, CH19 et CH21) ont été sélectionnés sur la base de leur pouvoir antimicrobien et leurs caractéristiques morphologiques.

Les extraits obtenus après fermentation en milieu liquide et extraction à l'acétate d'éthyle ont révélé une efficacité contre plusieurs bactéries à Gram positif, notamment *S. aureus*, *B. cereus*, *M. luteus*, *S. pyogenes* et *E. faecalis*. Ces isolats ont été identifiés morphologiquement comme appartenant aux genres *Aspergillus* (CH4), *Penicillium* (CH15, CH17 et CH21) et *Fusarium* (CH19).

L'analyse des CMI a confirmé les résultats du dépistage préliminaire. L'extrait de *Aspergillus* sp.1 s'est distingué par une CMI très faible (16 µg/mL) contre *S. aureus*, traduisant une activité antibactérienne puissante. Il a également montré une efficacité modérée contre d'autres bactéries. L'extrait de *Penicillium* sp.1, bien que présentant des CMI plus élevées, a tout de même démontré une activité intéressante contre certaines souches.

Ces résultats confirment le rôle potentiel des champignons rhizosphériques comme source naturelle de composés antimicrobiens. Ils soutiennent ainsi l'intérêt d'approfondir la recherche sur ces micro-organismes dans le cadre de la lutte contre la résistance aux antibiotiques. Pour valoriser ce potentiel et approfondir la compréhension des champignons rhizosphériques de *P. harmala* L., plusieurs pistes de recherche sont proposées :

- **Approfondissement de la diversité fongique et identification moléculaire** des isolats pour une classification plus précise, au niveau de l'espèce par des techniques moléculaires avancées (PCR, séquençage, etc.) ;
- **Isolement, purification et caractérisation** des métabolites secondaires responsables de l'activité antimicrobienne ;

Conclusion et perspectives

- **Évaluation de la production d'autres métabolites bioactifs**, notamment des enzymes ou des composés antifongiques ;
- **Tests ciblés sur les molécules extraites** afin d'évaluer leur spectre et leur mécanisme d'action antimicrobien ;
- **Analyse des relations entre la diversité microbienne et les propriétés physico-chimiques du sol**, afin de mieux comprendre les interactions écologiques et fonctionnelles.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abouamama, S., Anis, B., Abir, S., Maroua, H., & Sirine, B. (2023). Amylolytic and antibacterial activity of filamentous fungi isolated from the rhizosphere of different plants grown in the Tamanghasset region. *Heliyon*, 9(3).

Ahmed S., Chowdhury A. N., Dey A. K., Moniruzzaman M., & Kowser A. (2022). Isolation and identification of rhizosphere soil fungi from Papaya (*Carica papaya* L.) and eggplant (*Solanum melongena* L.) at BCSIR Campus in Rajshahi, Bangladesh. *International Journal of Scientific and Research Publication*, 12(4), 21-26.

Al-Abbasi, S. H. A., Al-Majmaei, A. A. M., Al-Naqib, A. T. H., Hameed, A. M., Al-Samarraie, M. Q., & H Altaef, A. (2021). Isolation and identification of some fungi from rhizospheric soils of some wild plants at Samarra University, Iraq. *Caspian Journal of Environmental Sciences*, 19(5), 829-839.

Al-Hatmi, A. M. S., Meis, J. F., & de Hoog, G. S. (2016). *Fusarium*: Molecular diversity and intrinsic drug resistance. *PLoS Pathogens*, 12(4), e1005464.

Arif, M., Wang, X., Kazi, M. S. K., Ullah Khan, S., Saeed, S., Khan, A. M., ... & Fiaz, S. (2022). Antimicrobial activities of different solvent extracts from stem and seeds of *Peganum Harmala* L. *PloS one*, 17(4), e0265206.

Arenas, R. J. B., Villanueva, R. M. D., Simbahan, J. F., & Obusan, M. C. M. (2022). Antimicrobial activity of endophytic and rhizospheric fungi associated with soft Fern (*Christella* sp.) and cinderella weed (*Synedrella nodiflora*) inhabiting a hot spring in Los Baños, Laguna, Philippines. *Acta Medica Philippina*, 56(10).

Bilgo, E., Lamy, D. L., Sawadogo, W. A., & Diabate, A. (2024). Optimisation de l'isolement des champignons entomopathogènes *Metarhizium* spp. Inféodés à la rhizosphère et aux insectes dans l'Ouest du Burkina Faso dans le cadre de la lutte contre le paludisme. *Sciences Naturelles et Appliquées*, 43(2 (1), 177-197.

Boulahrouf, A., & Aouar, L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes (Thèse de doctorat).

Chemmam, D. A., Bourzama, G., Sadrati, N., Zerroug, A., Alliouch-Kerboua, C., Bensouici, C., & Houhamdi, M. (2024). First Report of Bioactive Secondary Metabolites from *Penicillium hordei* PA2 Isolated from Sea Sand in Eastern Algeria. *Biology Bulletin*, 51(Suppl 1), S75-S89.

Darabpour, E., Bavi, A. P., Motamedi, H., & Nejad, S. M. S. (2011). Antibacterial activity of different parts of *Peganum harmala* L. growing in Iran against multi-drug resistant bacteria. *EXCLI journal*, 10, 252.

Davet P., & Rouxel F. (1997). Détection et isolation des champignons du sol. *INRA Paris*.

Devaraju R., & Satish S. (2011). Endophytic Mycoflora of *Mirabilis jalapa* L. and Studies on Antimicrobial Activity of its Endophytic *Fusarium* sp. *Asian Journal of Biological Sciences*, 2(1), 75-79.

Références bibliographiques

Dufresne P. & Guy S. G. (2021). Identification des champignons d'importance médicale. Rapport de stage, INSPQ, Québec, Canada, 1-64.

Ekwomadu, T. I., & Mwanza, M. (2023). *Fusarium* Fungi Pathogens, Identification, Adverse Effects, Disease Management, and Global Food Security: A Review of the Latest Research. *Agriculture*, 13(9), 1810.

Hayet, E., Maha, M., Mata, M., Mighri, Z., Laurent, G., & Mahjoub, A. (2010). Biological activities of *Peganum harmala* leaves. *African Journal of Biotechnology*, 9(48), 8199-8205.

Jayatilake, P. L., & Munasinghe, H. (2020). Antimicrobial Activity of Cultivable Endophytic and Rhizosphere Fungi Associated with “Mile-a-Minute,” *Mikania cordata* (Asteraceae). *BioMed Research International*, 2020, 5292571.

Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The minimum inhibitory concentration of antibiotics: methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2), 165.

Lepinay, C. (2013). Etude des interactions plantes-microbes et microbes-microbes au sein de la rhizosphère, sous un aspect coûts-bénéfices, dans un contexte de variation environnementale (Thèse de doctorat, Université de Bourgogne).

Mandeel, Q., Al-Laith, A., & Mohsen, L. (1999). Survey of *Fusarium* species in an arid environment of Bahrain. V. Antimicrobial activity of some local and international *Fusarium* species. *Pharmaceutical biology*, 37(3), 181-187.

Messaoudi, O., Wink, J., & Bendahou, M. (2020). Diversity of actinobacteria isolated from date palms rhizosphere and saline environments: Isolation, identification and biological activity evaluation. *Microorganisms*, 8(12), 1853.

Mueller, G. M., & Schmit, J. P. (2007). Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? *Biodiversity and Conservation*, 16, 1–5.

Niazi, S. K., Basavarajappa, D. S., Kumaraswamy, S. H., Bepari, A., Hiremath, H., Nagaraja, S. K., ... & Nayaka, S. (2023). GC-MS based characterization, antibacterial, antifungal and anti-oncogenic activity of ethyl acetate extract of *Aspergillus niger* strain AK-6 isolated from rhizospheric soil. *Current Issues in Molecular Biology*, 45(5), 3733-3756.

Ouzid, Y. (2018). Activités biologique et diversité en mycoendophytes des feuilles de *Peganum harmala* L. de la region de laghouat, Thèse de doctorat, Université Mouloud Mammeri.

Prasad, S., Valiyaparambil, S., Benson, S. T., & Krishnamoorthy, B. (2024). Isolation and Identification of *Penicillium herquei*: Antibacterial, Antioxidant and Cytotoxic Properties of *Penicillium herquei* Ethyl Acetate Extract. *Journal of Current Pharma Science and Research*, 1(1), 35-41.

Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J., & Capita, R. (2021). Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) for twelve antimicrobials (biocides and antibiotics) in eight strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(1), 46.

Références bibliographiques

Sadrati, N. (2021). Isolement, identification et culture des champignons endophytes isolés à partir des plantes médicinales algériennes pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs (Thèse de doctorat).

Sadrati, N., Daoud, H., Zerroug, A., Dahamna, S., & Bouharati, S. (2013). Screening of antimicrobial and antioxidant secondary metabolites from endophytic fungi isolated from wheat (*Triticum durum*). *Journal of plant protection research*, 53(2)

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., ... & Frisvad, J. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in mycology*, 78(1), 141-173.

Sharma, D., Pramanik, A., & Agrawal, P. K. (2016). Evaluation of bioactive secondary metabolites from endophytic fungus *Pestalotiopsis neglecta* BAB-5510 isolated from leaves of *Cupressus torulosa* D. Don. *3 Biotech*, 6(2), 210.

Sharma, M., & Prasad, R. (2011). L'interrogation-Quantification et la formation de biofilm chez *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*, 11(2), 125–137.

Tsang, C. C., Tang, J. Y., Lau, S. K., & Woo, P. C. (2018). Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era—Past, present and future. *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 197-210.

Venkateswarlu, N., Sireesha, O., Aishwayra, S., Vijaya, T., & Sriramulu, A. (2015). Isolation, screening of rhizosphere fungi antagonistic to rice stem rot disease pathogen *Sclerotium oryzae* catt. *Asian Journal of Pharmaceutical and clinical research*, 54-57.

Visagie, C. M., Houbbraken, J., Frisvad, J. C., Hong, S. B., Klaassen, C. H. W., Perrone, G., ... & Samson, R. A. (2014). Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in mycology*, 78(1), 343-371.

Zerroug, A. (2011). Métabolites secondaire bioactifs des champignons endophytes isolés de *Retama raetam* (Forssk.). Bioactive secondary metabolites of endophytic fungi isolated from *Retama raetam* (Forssk.) (doctoral dissertation, PhD Thesis. Univesity Ferhat Abbas Setif.

Zerroug, A. (2021). Champignons endophytes des plantes médicinales de la région de Sétif : isolement, identification et activités biologiques (Thèse de doctorat).

Zhu, Z., Zhao, S., & Wang, C. (2022). Antibacterial, antifungal, antiviral, and antiparasitic activities of *Peganum harmala* and its ingredients: A review. *Molecules*, 27(13), 4161.

الملخص

الهدف من هذا البحث هو عزل، تحديد، ودراسة النشاط المضاد للميكروبات للفطريات الجذرية المرتبطة بنبات الحرمل (*Peganum harmala* L.) ذو الفصيلة Zygophyllaceae، والتي تم جمعها من مناطق الحمادية، الرابطة وبيّانة (ولاية برج بوعريّيج، الجزائر). باستخدام تقنية التخفيف التسلسلي، تم الحصول على 33 عزلة فطرية. أظهر الفحص الأولي للنشاط المضاد للميكروبات، ضد سلالتين بكتيريتين وخميرة ممرضة، أن 9 عزلات أبدت نشاطاً ملحوظاً ضد كائن حي دقيق واحد على الأقل، حيث تراوحت أقطار تثبيط بين 12 و20 ملم. مكن الفحص المورفولوجي والمجهري لهذه العزلات من تصنيفها ضمن الأجناس الفطرية *Aspergillus*، *Penicillium*، و *Fusarium*. بعد إجراء التخمر في وسط سائل، تم استخلاص المركبات النشطة باستخدام خلاص الإيثيل، وأظهرت نتائج الاختبارات أن أعلى مناطق تثبيط بلغ قطرها 33، 23.8، 22، 16 و20.8 ملم، وسُجّلت على التوالي بواسطة مستخلصات *Aspergillus sp.1*، *Penicillium sp.1*، *Penicillium sp.2*، *Penicillium sp.3* و *Fusarium sp.* ضد *Streptococcus pyogenes*، *Micrococcus luteus*. أكدت اختبارات التركيز المثبط الأدنى (MIC) فعالية هذه المستخلصات ضد البكتيريا. وقد أظهر مستخلص *Aspergillus sp.1* فعالية قوية ضد (CMI = 16 ميكروغرام/مل) المقابل، أظهر مستخلص *Penicillium sp.1* نشاطاً متوسطاً مع الحفاظ على تأثير مضاد للبكتيريا. تؤكد هذه النتائج الإمكانات الواعدة للفطريات الجذرية كمصادر لمركبات مضادة للميكروبات، وتدعو إلى مزيد من الدراسات المتعمقة للكشف عن نواتجها الأيضية النشطة بيولوجياً.

الكلمات المفتاحية: الفطريات الجذرية، النشاط المضاد للميكروبات، *Peganum harmala* L.، البكتيريا الممرضة، المركبات النشطة بيولوجياً.

Résumé

L'objectif de cette étude est d'isoler, identifier et étudier l'activité antimicrobienne des champignons rhizosphériques associés à la plante *Peganum harmala* L. de la famille des Zygophyllaceae, collectés à partir des régions de El Hamadia, El Rabta et Bayata-Bordj Bou Arreridj (Algérie). La technique de dilution en série nous a permis d'isoler 33 isolats fongiques. Le criblage préliminaire de l'activité antimicrobienne des représentants des différents groupes contre deux bactéries et une levure pathogène a montré que 9 isolats étaient actifs sur au minimum un microorganisme pathogène avec des moyennes des zones d'inhibition variant entre 12 et 20 mm. L'identification morphologique et l'observation microscopiques des isolats ayant présentés une activité antimicrobienne marquée nous a permis de les classés parmi les genres fongiques *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. Après fermentation en milieu liquide, et une extraction à l'acétate d'éthyle. Les extraits des isolats ont été testés pour leur pouvoir antimicrobien et ont montré que les moyennes des zones d'inhibition les plus élevées étaient de 33, 23.8, 22, 16 et 20.8 mm, obtenues respectivement avec les extraits des isolats *Aspergillus sp.1*, *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*, *Penicillium sp.3* et *Fusarium sp.*, contre *Streptococcus pyogenes* et *Micrococcus luteus*. L'analyse des concentrations minimales inhibitrices a confirmé l'activité antibactérienne des extraits des isolats rhizosphériques. L'extrait de *Aspergillus sp.1* s'est révélé particulièrement efficace contre *Staphylococcus aureus* (CMI = 16 µg/ML), ainsi qu'une action modérée à faible contre d'autres bactéries (*Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* et *Bacillus cereus*). En revanche, l'extrait de *Penicillium sp.1* a montré une activité plus modérée, tout en conservant une certaine efficacité antibactérienne. Ces résultats soulignent le potentiel des champignons rhizosphériques comme sources de nouveaux agents antimicrobiens, et encouragent des recherches approfondies sur leurs métabolites bioactifs.

Mots clés : Champignons rhizosphériques, activité antimicrobienne, *Peganum harmala* L., bactéries pathogènes.

Abstract

The objective of this study was to isolate, identify, and evaluate the antimicrobial potential of rhizospheric fungi associated with *Peganum harmala* L. (family Zygophyllaceae), collected from the regions of El Hamadia, El Rabta, and Biyata in Bordj Bou Arreridj (Algeria). Using the serial dilution technique, a total of 33 fungal isolates were obtained. Preliminary screening for antimicrobial activity against two bacterial strains and one pathogenic yeast revealed that 9 isolates exhibited inhibitory effects against at least one tested pathogen, with inhibition zones ranging from 12 to 20 mm. Morphological and microscopic analyses of the active isolates enabled their classification into the genera *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Fusarium*. Following liquid-state fermentation and extraction with ethyl acetate, the crude extracts were further evaluated for antimicrobial activity. The highest inhibition zones 33, 23.8, 22, 16 and 20.8 mm, were recorded for extracts from *Aspergillus sp.1*, *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*, *Penicillium sp.3* and *Fusarium sp.* respectively, against *Streptococcus pyogenes* and *Micrococcus luteus*. Minimum inhibitory concentration (MIC) assays confirmed the antibacterial efficacy of these fungal extracts. Notably, the extract of *Aspergillus sp.1* demonstrated potent activity against *Staphylococcus aureus* (MIC = 16 µg/ML), and showed moderate to weak effects against *Micrococcus luteus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus*. In contrast, the extract from *Penicillium sp.1* displayed moderate antimicrobial activity. These findings highlight the promising potential of rhizospheric fungi as sources of novel antimicrobial compounds and warrant further investigation into their bioactive metabolites.

Keywords: Rhizospheric fungi, antimicrobial activity, *Peganum harmala* L., pathogenic bacteria, bioactive metabolites.