

DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BAALI Halima & NOURINE Hayat

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER ENSCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

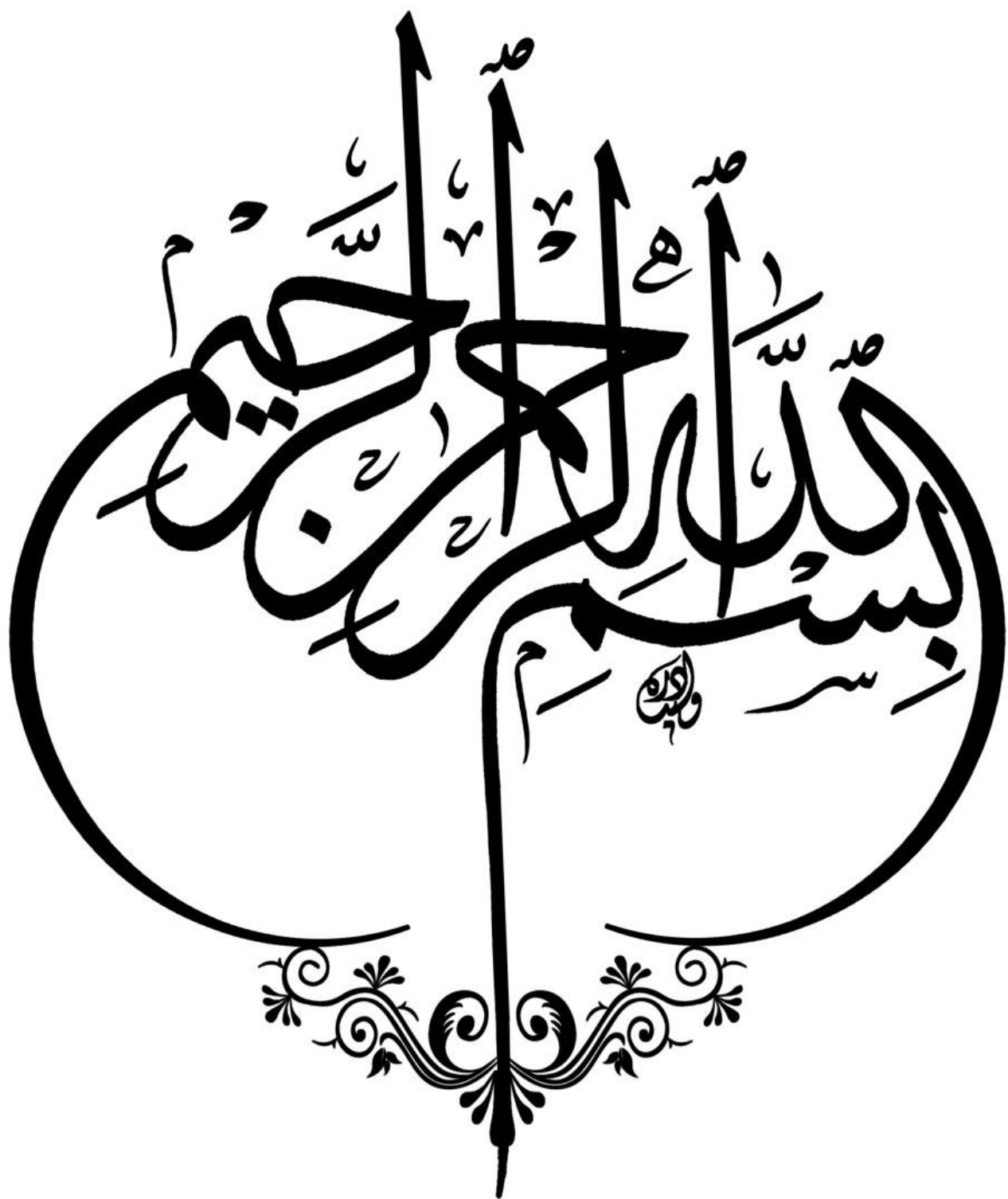
**Etude de l'effet antagoniste de quelques champignons
marins sur Staphylococcus
epidermidis**

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE :

Président	Arabi Abed	MCA	U. Mostaganem
Encadrant	DJIBAOUI Rachid	Pr	U. Mostaganem
Examinatrice	BENGUENAB Asma	MCB	U. Mostaganem

Laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale, Université Abdelhamid Ibn
Badis (Mostaganem)

Année universitaire 2024/2025





Remerciement

Nous remercions «ALLAH», le tout puissant, de nous avoir donné la force, le courage et la volonté et la santé pour réaliser ce modeste travail.

*Tout d'abord nous tenons surtout à adresser nous plus vifs remerciements à notre encadreur, Monsieur le **Pr. DJIBAOUI Rachid**, pour sa confiance, ses encouragements, sa patience, Ses compétences, ses précieux conseils, sa gentillesse et sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire.*

Nous avons eu un grand honneur de travailler sous votre direction, bénéficié de vos remarques et compétences, Merci

*Notre gratitude va aussi à les membres du jury **Mr. ARABI Abed** et **M^{me} BENGUENAB Asma** qui, ont accepté de porter un jugement à ce mémoire.*

Particulièrement ,mes sincères remerciements vont aussi à Mr. Arabi Abed merci pour ta précieuse aide, tes conseils éclairés ont été d'une grande valeur pour nous.

*Je tiens à remercier vivement **M^{me} Tahlaïti AMINA** responsable du laboratoire de Microbiologie et biologie végétale de l'université de Mostaganem où nous avons réalisé ce travail pour l'aide qu'ils nous avons apportée et ses conseils .*

Nous tenant à remercier sincèrement tous nos enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Nous tenant à remercier

Enfin, un grand merci aussi tous qui m'ont aidé de loin ou de près à la réalisation de ce mémoire

Merci a tous...

Dédicace

En ce moment particulier dans ma vie, Je tiens à dédier ce modeste travail

A mes chers parents Belkacem et Fatima

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, et de le respect que j'ai toujours eu pour vous, rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. vous représentez pour moi la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. vos encourage, les sacrifices et la confiance, ont été ma force tout au long de mes études. Que dieu tout puissant vous garde et vous procure, bonheur et longue vie santé pour que vous demerier le flambeau illuminant mon chemin. Tout mon succès pour vous.

A ma soeur Zineb et mes frères Mohammed Amin, Yassine et Khireddine

Je vous exprime à travers ce travail mes sentiments de remerciement et d'amour et de fierté d'avoir des bons frères comme vous. Merci d' être toujours à mes côtés.

Merci pour tous les moments joyeux partagés même dans les périodes de travail intense.

A tous mes adorables amis

Ikram, yousra, hayat, rahma, rachida, malika, fayroz, fayza, karima, chaimaa, zineb

Qui j'ai reconnaisse depuis ma première année premières jusqu'au aujourd'hui merci pour les bons moments qu'on a passé ensembles. Merci pour vos encouragements et vos conseils, Je vous souhaitez que de réussite dans votre vie.

A mes cousines : Yasmin, Djihan, Naziha, Ouafaa, hanan, ahlam, mimi, nawal

A tous ceux qui s'intéressent à ma réussite

A tous mes Enseignants de mon cursus à l'université

A tous mes Collègues de promotion Master 2

A toute les members de ma famille BAALI et CHERIF

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

A toute personne qui me connais

Halima

Dédicace

Avant tout je remercie Allah pour les touts. Je dédie ce modeste travail :

À mes parents,

PaPa , MaMa Pour leur amour inconditionnel, leur soutien moral et leurs innombrables sacrifices, Vous êtes ma source de motivation et de persévérance.

À mes frères et sœurs,

Pour leur encouragement et leur présence bienveillante tout au long de mon parcours.

Ibrahim

ABDAlkader

Amina

Kheira

À mes amis,

Halima,

Ikram,

Hafida

À mes enseignants,

Qui ont su éveiller en moi le goût du savoir et de la recherche.

Pr. Djibaoui Rachid , Mr. Arabi Abed, Mme. BenguenabAsma

À tous ceux qui ont cru en moi,

Cette réussite est aussi la vôtre.

Hayat



Résumé

Résumé :

Staphylococcus epidermidis est une bactérie naturellement présente sur la peau, jouant un rôle protecteur contre les microbes pathogènes. Elle contribue à l'équilibre du microbiote et à la régulation du système immunitaire. Cette espèce peut devenir pathogène chez les personnes immunodéprimées ou porteuses de dispositifs médicaux. Elle est reconnue comme un agent opportuniste en raison de sa capacité à former des biofilms et sa résistance aux antibiotiques, ce qui renforce sa virulence.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'utilisation de métabolites extraits des champignons marins pour lutter contre la croissance et la formation de biofilms chez *Staphylococcus epidermidis*.

Cette étude a tout d'abord consisté à isoler et à identifier des *Staphylococcus epidermidis* des cavités nasales, à évaluer leur sensibilité aux antibiotiques, ainsi que leur capacité à former des biofilms, en utilisant les méthodes de cristal violet en tube et du rouge Congo. Une seconde approche a porté sur l'évaluation *in vitro* de l'activité antistaphylococcique (inhibition de la croissance et du biofilm) par des métabolites extraits des champignons isolés du sable de mer de la plage de Salamandre à Mostaganem.

Les résultats obtenus révèlent l'obtention de quatre isolats de *Staphylococcus epidermidis*. Ces derniers ont montré une résistance à l'oxacilline et à l'azithromycine, et une formation de biofilms.

L'analyse microbiologique des échantillons du sable marin a permis l'isolement de 25 isolats fongiques.. Ces isolats ont été testés pour leur activité antagoniste vis-à-vis des *Staphylococcus epidermidis* testés par la technique du croisement, à l'aide de stries verticales sur milieu MuellerHinton (MH). Seuls six isolats fongiques (S2, S7, S10, S11, S12 et S32) ont montré une activité antagoniste positive contre *S. epidermidis*.

Parmi ces isolats fongiques, tous identifiés comme appartenant au genre *Aspergillus*, l'isolat le plus actif a été caractérisé morphologiquement comme *Aspergillus niger*. Les métabolites secondaires produits par cet isolat ont été extraits à l'aide d'acétate d'éthyle, puis leur activité antistaphylococcique a été évaluée *in vitro* par la méthode de diffusion sur disque. Les résultats ont révélé un effet inhibiteur contre les *Staphylococcus epidermidis*, avec des zones d'inhibition variant de 8,9 à 19,35 mm.

Enfin, l'activité antibiofilm de l'extrait d'*Aspergillus niger* a été évaluée par la méthode de coloration au cristal violet en tube, révélant un effet inhibiteur avec des pourcentages d'inhibition compris entre 38 % et 59 %.

Mots clés : Champignons marins - *Staphylococcus epidermidis*- Antibiofilm – formation de biofilm - Métabolites secondaires - Antagonisme – activité antimicrobienne.

Abstract:

Staphylococcus epidermidis a bacterium naturally present on the skin, playing a protective role against pathogenic microbes. It contributes to the balance of the microbiota and the regulation of the immune system. This species can become pathogenic in immunocompromised individuals or those with medical devices. It is recognized as an opportunistic agent due to its ability to form biofilms and its resistance to antibiotics, which increases its virulence.

This work is part of the use of metabolites extracted from marine fungi to combat the growth and formation of biofilms in *Staphylococcus epidermidis*

This study first involved isolating and identifying *Staphylococcus epidermidis* from the nasal cavities, assessing their sensitivity to antibiotics, and their ability to form biofilms, using crystal violet tube and Congo red methods. A second approach focused on the in vitro evaluation of antistaphylococcal activity (inhibition of growth and biofilm) by metabolites extracted from fungi isolated from sea sand at Salamandre beach in Mostaganem.

The results obtained reveal the isolation of four *Staphylococcus epidermidis* isolates. These isolates showed resistance to oxacillin and azithromycin, and biofilm formation.

Microbiological analysis of the marine sand samples led to the isolation of 25 fungal isolates. These isolates were tested for their antagonistic activity against *Staphylococcus epidermidis* using the cross-inhibition technique, with vertical streaks on Mueller-Hinton (MH) medium. Only six fungal isolates (S2, S7, S10, S11, S12, and S32) showed positive antagonistic activity against *S. epidermidis*.

Among these fungal isolates, all identified as belonging to the genus *Aspergillus*, the most active isolate was morphologically characterized as *Aspergillus niger*. The secondary metabolites produced by this isolate were extracted using ethyl acetate, and their antistaphylococcal activity was evaluated in vitro using the disk diffusion method.

The results revealed an inhibitory effect against *Staphylococcus epidermidis*, with inhibition zones ranging from 8.9 to 19.35 mm.

Finally, the antibiofilm activity of the *Aspergillus niger* extract was evaluated using the crystal violet tube staining method, revealing an inhibitory effect with inhibition percentages ranging from 38% to 59%.

Keywords: Marine fungi - Staphylococcus epidermidis - Antibiogram - Biofilm formation - Secondary metabolites - Antagonism - Antimicrobial activity.

الملخص:

المكورات العنقودية البشرية هي بكتيريا موجودة بشكل طبيعي على الجلد، وتلعب دورًا وقائيًا ضد الميكروبات المسببة للأمراض. تساهم في توازن الميكروبيوتا وتنظيم جهاز المناعة. يمكن أن تصبح هذه الفصيلة مسببة للأمراض لدى الأشخاص الذين يعانون من نقص المناعة أو الذين يحملون أجهزة طبية. وهي معروفة بكونها عاملاً انتهازيًا بسبب قدرتها على تكوين أغشية حيوية ومقاومتها للمضادات الحيوية، مما يعزز ضراوتها .

يندرج هذا العمل في إطار استخدام المستقلبات المستخرجة من الفطريات البحرية لمكافحة نمو وتكوين الأغشية الحيوية في المكورات العنقودية البشرية

تضمنت هذه الدراسة أولاً عزل وتحديد المكورات العنقودية البشرية من التجاويف الأنفية، وتقييم حساسيتها للمضادات الحيوية، وكذلك قدرتها على تكوين بيوفيلم، باستخدام طرق الكريستال البنفسجي في الأنبوب والأحمر الكونغو. ركزت المقاربة الثانية على التقييم المختبري للنشاط المضاد للمكورات العنقودية (تثبيط النمو و الأغشية الحيوية) بواسطة المستقلبات المستخرجة من الفطريات المعزولة من رمال شاطئ صلامندر في مستغانم .

أظهرت النتائج الحصول على أربعة عزلات من المكورات العنقودية البشرية. أظهرت هذه العزلات مقاومة للأوكساسيلين والأزيتروميسين، وتشكيل الأغشية الحيوية.

سمح التحليل الميكروبيولوجي لعينات الرمال البحرية بعزل 25 عينة فطرية. تم اختبار هذه العينات من أجل نشاطها المضاد للمكورات العنقودية البشرية باستخدام تقنية التقاطع، بمساعدة خطوط عمودية على وسط (MH) أظهرت ست عزلات فطرية فقط (S2 S7, S10, S11, S12, S32) نشاطًا مضادًا إيجابيًا ضد المكورات العنقودية البشرية .

من بين هذه العزلات الفطرية، التي تم تحديدها جميعًا على أنها تنتمي إلى جنس *Aspergillus* ، تم توصيف العزلة الأكثر نشاطًا من الناحية المورفولوجية على أنها *Aspergillus niger*. تم استخراج المستقلبات الثانوية التي تنتجها هذه العزلة باستخدام أسيتات الإيثيل، ثم تم تقييم نشاطها المضاد للمكورات العنقودية في المختبر باستخدام طريقة الانتشار على القرص. أظهرت النتائج تأثيرًا مثبتًا ضد المكورات العنقودية البشرية ، مع مناطق تثبيط تتراوح من 8.9 إلى 19.35 ملم .

وأخيرًا، تم تقييم النشاط المضاد للبيوفيلم لمستخلص *Aspergillus niger* باستخدام طريقة التلوين بالكريستال البنفسجي في أنبوب، مما كشف عن تأثير مثبت بنسب تراوحت بين 38% و 59% .

الكلمات المفتاحية: الفطريات البحرية - المكورات العنقودية البشرية - مخطط الحساسية للمضادات الحيوية - تكوين الأغشية الحيوية - المستقلبات الثانوية - التنافس - النشاط المضاد للميكروبات.

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des bréviations

Introduction générale : 1

Chapitre I : Généralités sur les Champignons Marins

I. Généralité sur les champignons marins 3

I.1 Description morphologique et taxonomie 3

I.1.1 Morphologie des champignons 3

I.1.2 Taxonomie..... 5

I.2 Distribution écologique 8

I.2.1 Mode de vie des champignons..... 10

I.3 Intérêt économique 11

Chapitre II : Généralité sur Staphylococcus epidermidis

II Généralité sur *staphylococcus epidermidis* 13

II.1 Classification 13

II.2 Rôles de *Staphylococcus epidermidis* dans la peau saine 14

II.3 Spécificités génétiques et phénotypiques 15

II.3.1 Caractères Génétiques 15

II.3.2 Caractères phénotypiques 15

II.4 Infections causées par *Staphylococcus epidermidis* 17

II.5	Le biofilm de <i>S. epidermidis</i> et colonisation de la surface du biomatériau	19
II.6	Moyens de lutte contre <i>S. epidermidis</i> pathogène	21
✓	<i>Nouvelles approches prophylactiques</i>	23

Chapitre III : Matériels et Méthodes

1.	Introduction	24
2.	Caractérisations des milieux de culture utilisés.....	24
3.	Etude bactériologique	26
3.1.	Isolement et purification de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	26
3.1.1.	prélèvement des staphylocoques au niveau des narines	26
3.2.	Identification des souches bactériennes	26
3.2.1.	Etude des caractères morphologiques	27
3.2.1.1	Examen macroscopique	27
3.2.1.2	Examen microscopique	27
3.2.2.	Etude des caractères biochimiques	28
3.2.2.1	Test de catalase.....	28
3.2.2.2	Test de coagulase libre.....	29
3.3.	Conservation des souches de <i>Staphylococcus epidermidis</i>	29
4.	Etude de la sensibilité des souches de <i>Staphylococcus epidermidis</i> aux antibiotiques	29
5.	Formation du biofilm	31
5.1.	Etude de la formation du biofilm par la méthode de coloration au cristal violet	31
5.2.	Etude de la formation du biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)	33
6.	Etude des champignons marins.....	34
6.1.	Echantillonnage	34
6.2	Technique de prélèvement	35
6.3.	Isolement des champignons marins :	35
6.4.	Purification des isolats fongique :	36
7.	Test d'Antagonisme sur Milieu MH :	36

8.	Identification des isolats sélectionnés	37
8.1.	Identification macroscopique :	37
8.2.	Identification microscopique	38
9.	Extraction des métabolites secondaires à partir d'une souche fongique marine isolée	38
10.	Évaluation de l'activité antistaphylococciques des extraits fongiques	39
10.1.	Effet antistaphylococciques par la méthode de diffusion par disque	39
10.2.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	40
10.3.	Effet de l'extrait fongique sur la formation de biofilm par <i>S.epidermidis</i>	41

Chapitre IV: Résultats et discussion

I	Etude bactériologique	43
1.	Identification des isolats de <i>staphylocoques epidermidis</i>	43
1.1	Etude macroscopique	43
1.2	Etude microscopique.....	44
1.3	Test catalase	45
1.4	Test de coagulase libre	45
2.	Étude de la sensibilité des souches de <i>Staphylococcus epidermidis</i> aux antibiotiques	46
3.	Formation de biofilm	48
3.1.	Etude de la formation du biofilm par la méthode de gélose Rouge Congo	48
3.2.	Etude de la formation du bio film par la méthode de coloration au cristal violet	49
II	Etude des champignons marins	51
1.	solement et purification des isolats fongiques	51
2.	Résultats du test d'Antagonisme sur Milieu MH	52
3.	Identification des isolats sélectionnés	54
3.1.	Etude macro et microscopique	54
III	Extraction des métabolites secondaires à partir d' <i>Aspergillus niger</i> marin isolé	56
1.	Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait d' <i>A. niger</i>	57
1.1.	Effet antistaphylococcique par la méthode de diffusion sur disque	57
1.2.	Détermination de la concentration minimale inhibitrice(CMI)	59

1.3 Effet de l'extrait d' <i>A.niger</i> sur la formation de biofilm dans des tubes en verre	59
Discussion	60

Conclusion Générale

Conclusion	65
------------------	----

Références

Annexes

Liste des figures:

Figure 1: les structures de thalles filamenteux (Meradji, 2024)	4
Figure 2 : Classification des Eumycètes (Meradji, 2024)	6
Figure 3: image de Staphylococcus epidermidis au microscope.	16
Figure 4: infections les plus courantes dues à S. epidermidis (Valentina siciliano et al, 2023)	17
Figure 5: Structure du biofilm mature. EPS, substances extrapolymeres (McCann et al., 2008) ..	20
Figure 6: Schéma de la formation de biofilm sur un matériel, d'après (Valour, 2014)	21
Figure 7: purification des staphylocoques épidermidis.....	26
Figure 8: Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram.	27
Figure 9: Technique de l'antibiogramme (Zaika, 1989)	31
Figure 10: carte de la plage de Salamandre (Google Earth ,2025).	34
Figure 11: Site de prélèvement	34
Figure 12: Prélèvement et transporter des échantillons de sable.	35
Figure 13: Les étapes de l'isolement des champignons marins.	36
Figure 14: Processus de diffusion par disque	40
Figure 15: Aspect macroscopique des colonies de S.epidermidis sur milieu Chapman	43
Figure 16: Aspect macroscopique des colonies de S. epidermidis sur gélose nutritive	44
Figure 17: Observation microscopique de S. epidermidis après coloration de Gram (x1000)	44
Figure 18: Résultat positif de test de la catalase des S. epidermidis	45
Figure 19: Résultat du test de coagulase libre négatif Chez S epidermidis	46
Figure 20: Résultat du test de coagulase libre positif chez S.aureus	46
Figure 21: Résultats de l'anti biogramme obtenus	46
Figure 22: Représentation graphique du taux de sensibilités de S. epidermidis	47
Figure 23: Résultats (recto et verso) de la production de bio film par la méthode RCA.	49
Figure 24: résultats de formation de biofilm	50
Figure 25: mesure de la DO	50
Figure 26: Isolats fongiques obtenus sur milieu Sabouraud + chloramphénicol.	52
Figure 27: Purification des champignons	52
Figure 28: pourcentages d'inhibition des activités antagonistes des champignons vis-à-vis de Staphylococcus epidermidis	53
Figure 29 : Activité antagoniste du 2 souches les plus effet	53

Figure 30: masse totale de l'extrait brute.	56
Figure 31: concentrations 100% de la Solution de l'extrait fongique.	56
Figure 32: Activité antistaphylococciques de l'extrait d'A.niger	57
Figure 33: Zones d'inhibition exercées par l'extrait d'A.niger à l'encontre des souches de S. epidermidis	58
Figure 34:solution du test de CMI d'extrait d'A.niger	59
Figure 35: test de CMI d'extrait d'A.niger.....	59

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des Staphylococcus epidermidis	13
Tableau 2: Susceptibilité des isolats de S.epidermidis vers les antibiotiques testés	47
Tableau 3: Classification de la formation de biofilms selon Stepanovic et al. 2007	50
Tableau 4: les valeurs moyenne d'absorbance des isolats (DO 595 nm).....	51
Tableau 5:résultats de production de biofilm	51
Tableau 6:Aspect macroscopique d'Aspergillus niger	54
Tableau 7:Aspect microscopique d'Aspergillus niger	55
Tableau 8:résultatsdel'inhibitiondu biofilm.	60
Tableau 9: valeur critiques des diamètres des zones d'inhibition pour Staphylocoques (CASFM, 2024)	83

Liste des bréviations

µl : microlitre.

% : Pourcentage

°C : degré Celsius

A.niger : *Aspergillusniger*

ATB : Antibiotique.

ATCC: American Type Culture Collection

BHIB: Bouillon coeurcerveau

BN : bouillon nutritif

CASFM: comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie

CLSI: Clinical And Laboratory Standards Institute

Cm : Centimètre.

CMI : la concentration minimale inhibitrice

CV: Cristal Violet

DMSO : diméthylsulfoxyde

DO : Densité Optique

G+C: Guanine+ Cytosine.

g : Gramme

GN : Gélose Nutritive

h : heure

Km : kilomètre

MH : Mueller- Hinton

Min : minute.

mg: milligramme **µg**: microgramme **mm**: millimètre

ml : Millilitre

nm : nanomètre

UFC : unitéformant colonie

R: Résistante

RCA: Rouge Congo Agar

S : Souche

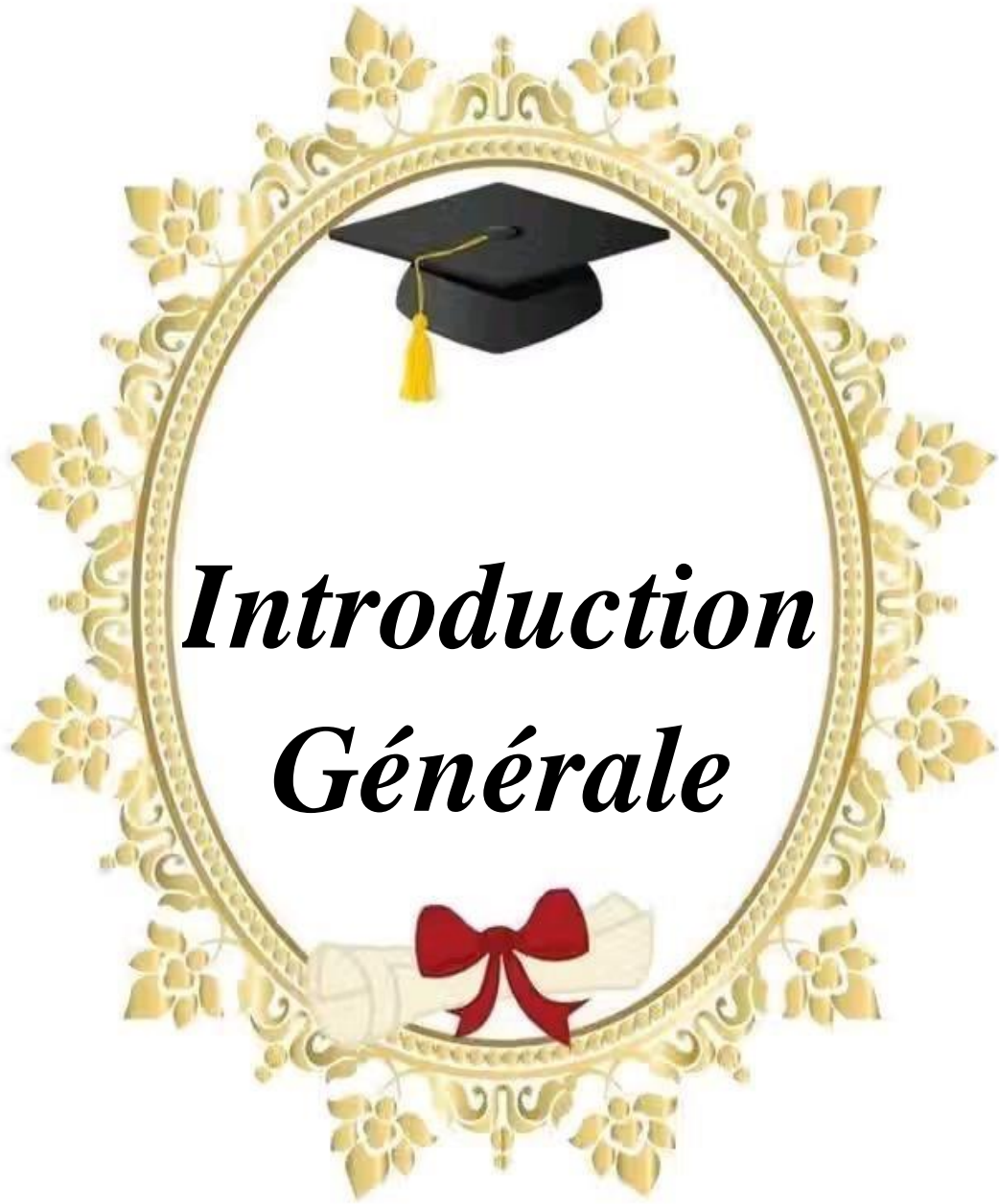
S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

SCN: *Staphylocoques à coagulase négative*

TM : méthode du tube

TSB : Bouillon Tryptone Soja



***Introduction
Générale***

Introduction générale :

Staphylococcus epidermidis est une bactérie commensale cutanée et une cause majeure d'infections associées aux biomatériaux : ce germe adhère aux dispositifs médicaux, puis constitue des biofilms protégés par une matrice polysaccharidique, ce qui rend leur élimination particulièrement difficile tant pour les antibiotiques que pour le système immunitaire (Zatout *et al.*, 2020). Ces infections s'installent souvent dans la durée, nécessitent des interventions chirurgicales complexes comme le retrait ou le remplacement de l'implant, et génèrent des coûts de santé élevés. En effet, les infections de dispositifs, en particulier celles liées à *S. epidermidis*, sont l'une des principales causes de réadmissions et de prolongation d'hospitalisation, pesant lourd dans les bilans économiques hospitaliers (Braem *et al.*, 2023).

Face à cette problématique la recherche de nouvelles alternatives thérapeutiques est devenue une priorité de santé publique . De nombreux groupes de recherche se sont tournés vers l'exploration des environnements terrestres et marins pour y découvrir de nouveaux composés aux propriétés antibactériennes et antibiofilms. (Abdulkawi et Wael Qasem, 2019).

Parmi les pistes explorées, les sources naturelles peu exploitées, telles que les champignons marins suscitent un intérêt croissant. Ces organismes présentent une grande diversité métabolique, et sont capables de produire des composés bioactifs originaux, souvent absents chez les microorganismes terrestres. Plusieurs études ont ainsi mis en évidence le potentiel des actinobactéries marines, comme celles du genre *Streptomyces*, pour la production de nouveaux agents antimicrobiens efficaces contre des pathogènes multirésistants (Ghosh *et al.*, 2021). Les champignons marins, organismes eucaryotes présents dans les sédiments, les algues, les coraux ou les éponges marines, sont une source émergente de composés bioactifs à potentiel antimicrobien. Plusieurs études ont démontré leur activité antagoniste contre des bactéries pathogènes, y compris *Staphylococcus epidermidis* (Abdelmohsen et Al, 2017).

Introduction générale

Cette étude a pour objectif principal d'identifier des substances bioactives produites par des champignons isolés de l'environnement marin, en vue d'évaluer leur potentiel antimicrobien contre des isolats de *Staphylococcus epidermidis*. En explorant la biodiversité marine, notamment les champignons marins, cette recherche vise à découvrir de nouvelles molécules susceptibles de

constituer des alternatives thérapeutiques face à la résistance croissante de ce pathogène opportuniste aux antibiotiques conventionnels.

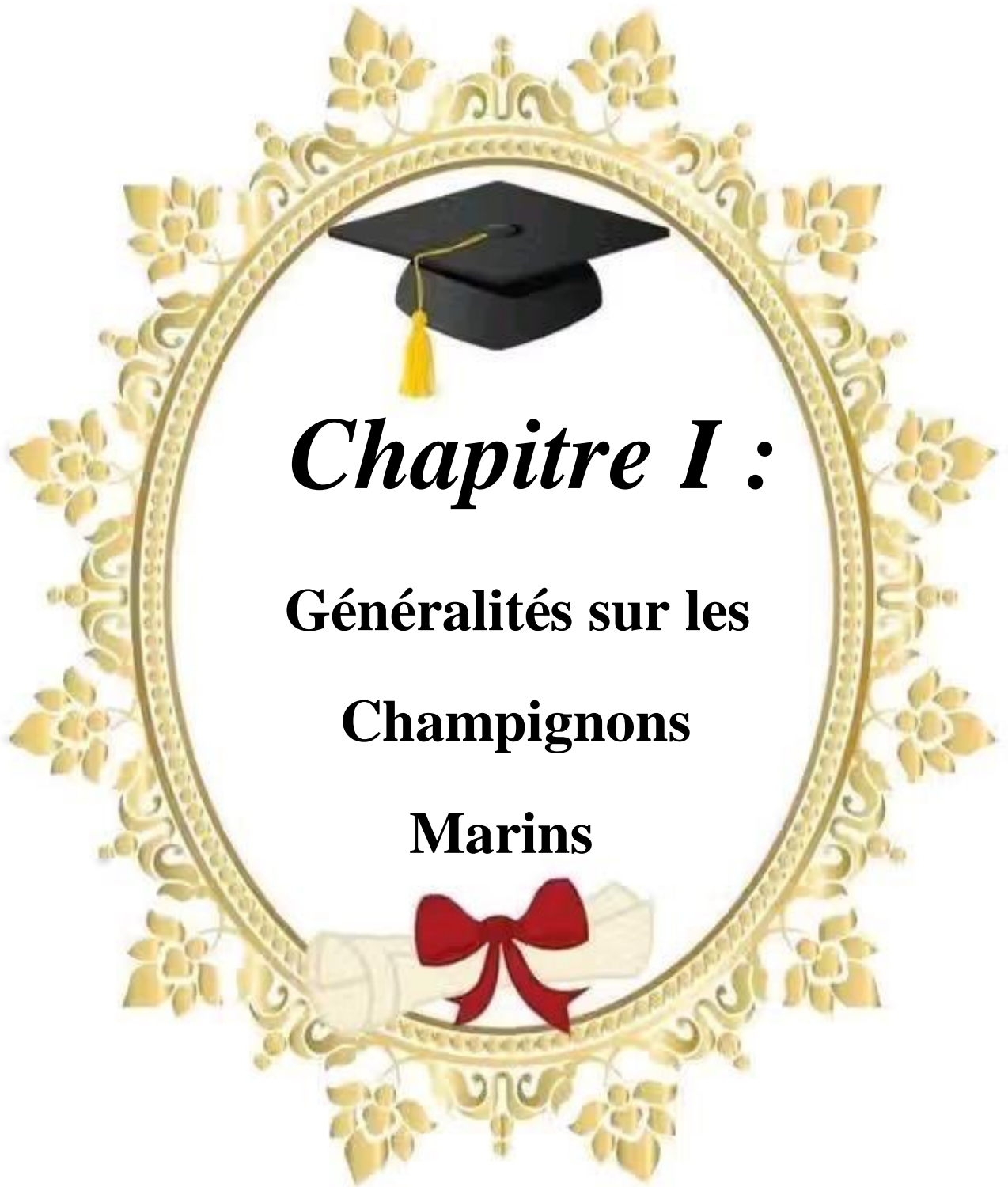
Le présent manuscrit se divise en deux grandes parties. La première est une partie bibliographique, composée d'un premier chapitre consacré aux rappels sur les champignons marins, suivi d'un deuxième portant sur la bactérie étudiée, *Staphylococcus epidermidis*.

La deuxième partie est expérimentale. Elle comprend un chapitre décrivant le matériel et les méthodes utilisés, suivi d'un chapitre présentant et discutant les résultats obtenus. Enfin, une conclusion générale synthétisera les principaux résultats de cette étude et proposera quelques perspectives susceptibles d'enrichir nos connaissances sur la problématique abordée dans ce travail.

Partie I :

Synthèse

Bibliographique



Chapitre I :

Généralités sur les

Champignons

Marins

Généralité sur les champignons marins

Les champignons sont des organismes eucaryotes de différentes formes appelés aussi "fungi " ou " mycètes "(Houis, 2011 ;Thibault *et al.*, 2016), ils sont connus pour être présents dans l'environnement marin, où ils jouent un rôle important dans la dégradation des composés organiques (Eriksson, 1997).

La notion d'espèces en mycologie est un sujet qui suscite de vives discussions. Il existe plusieurs méthodes pour distinguer ces espèces ; historiquement, les champignons étaient identifiés en fonction de leur morphologie selon la notion morphologique d'espèce. On peut également caractériser les champignons en fonction de leurs habitats, de leurs répartitions géographiques et du concept écologique de l'espèce (Taylor, 2000).

Les champignons associés aux environnements marins sont traditionnellement catégorisés en deux groupes écologiques : les champignons marins obligatoires et les champignons marins facultatifs. Les premiers sont définis comme des organismes fongiques capables de croître et de sporuler exclusivement dans des habitats marins ou estuariens, tandis que les seconds proviennent d'habitats terrestres ou dulçaquicoles, mais possèdent la capacité de se développer, et éventuellement de sporuler, dans des conditions marines (Kohlmeyer et Volkmann-Kohlmeyer, 2003; Li et Wang, 2009).

I.1 Description morphologique et taxonomie

I.1.1 Morphologie des champignons

Les champignons marins comme tous les micromycètes sont les microbes les plus importants dans la chaîne trophique. Ils se distinguent par leur nature non photosynthétique, et présentent des noyaux, habituellement composés d'hyphes filiformes (Lodge, 1996a).

Selon Genevès (1990 ; 1992), les champignons appartiennent au groupe des Eucaryotes. Ils possèdent des parois cellulaires qui sont composées de chitine. La principale forme de stockage des glucides est le polysaccharide glycogène (Indge, 2004).

Les champignons filamenteux sont hétérotrophes et dépourvus de chlorophylle. Ils n'ont pas de tissus (Nasraoui, 2015). Ce sont des Thallophytes. C'est à dire, elle n'a ni racines, ni tiges, ni feuilles. Ils se caractérisent par la formation de filaments ou hyphes libres ou entrelacés (Bouchet *et Al.*, 1999 et Boiron, 2005). L'ensemble de ces hyphes forme un réseau appelé mycélium (Ghorri, 2015). Chez la plupart des mycètes, les hyphes sont divisés par des cloisons appelées septa, formant des unités qui sont similaires à de cellules distinctes avec un seul noyau, et on les appelle hyphes segmentés ou septés. Dans certaines classes de mycètes, les hyphes ne contiennent pas de cloisons et ont l'aspect de longues cellules continues à noyau multiples, ces structures sont qualifiées de cénocytes (Tortora *et al.*, 2003). (**figure1**)

Par ailleurs, les hyphes se caractérisent par leurs aspect diffus, tubulaires et fins avec un diamètre généralement compris entre 2 et 15 μm et sont plus ou moins ramifiés (BartnickiGarcia, 2002).

Les caractéristiques morphologiques de ces microorganismes fongiques sont liées à la nature de leur substrat nutritif. Leur développement au sein de ce substrat est réalisée par l'extension et la ramification progressive des hyphes, mécanisme essentiel à leur colonisation (Aurélié, 2013).

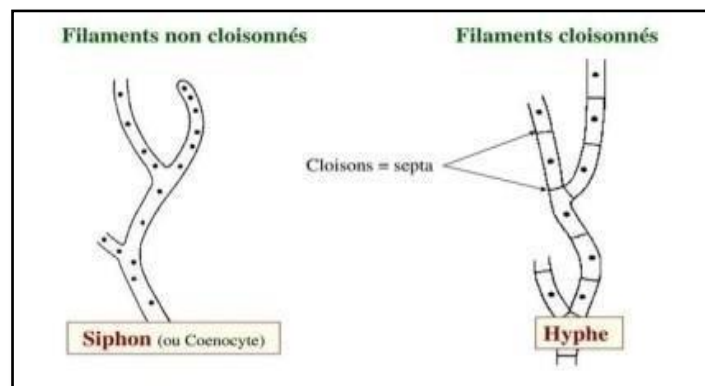


Figure 1: les structures de thalles filamenteux (Meradji, 2024)

I.1.1.1 Mode de reproduction des champignons

L'identification des champignons est fondée principalement sur des critères morphologiques liés aux modes de reproduction. (Chabasse, 2008). Classiquement, les champignons filamenteux se reproduisent par deux phases (Nageleisen *et al.*, 2010) :

➤ **Phase asexuée** (stade anamorphe) la cellule fongique se divise par simple mitose. (Chabasse, 2008). Dans ce mécanisme la cellule fongique est basée sur la production des spores asexués soit à l'intérieur des sporocystes (sporange) de manière endogène. Ou de manière exogène (conidies), à l'extrémité de filaments spécialisés appelés phialides portés sur un conidiospore. Les spores exogènes peuvent être des arthrospores résultant de la fragmentation d'un filament mycélien (Diongue, 2019).

➤ **Phase sexuée** (stade téléomorphe)

Elle est assurée par des gamètes ou des spores formées à la suite d'une méiose (Lopez, 1998), La fécondation peut s'effectuer en deux formes d'accouplement : hétérothallique (la reproduction sexuée est produite par deux thalles distinctes) ou homothallique (lorsque sa reproduction sexuée est produite par le même thalle). Ils existent différentes modes de fécondation selon les groupes des champignons.(strullu, 1999 ; Diongue, 2019).

I.1.2Taxonomie

Le règne des champignons se divise en sous-groupes connus sous le nom de divisions ou de phylums. Chaque division porte un nom qui se termine par Mycotina, les phylums sont subdivisés en classes dont le nom se termine par Mycètes. Ensuite, le suffixe << ale >> désigne les ordres tandis que <<<aceae>>> est utilisé pour les familles. Chaque famille comprend les genres et les espèces qui constituent la base de la classification. Chaque champignon est ainsi désigné par un nom binomial qui commence par le genre et se termine par l'espèce comme tout autre élément vivant (Chabasse, 2008).

La classification des champignons évolue sans cesse. Elle est longtemps basée sur les travaux de Hawksworth, Sutton et Ainsworth (Hawksworth *et al.*, 1995).

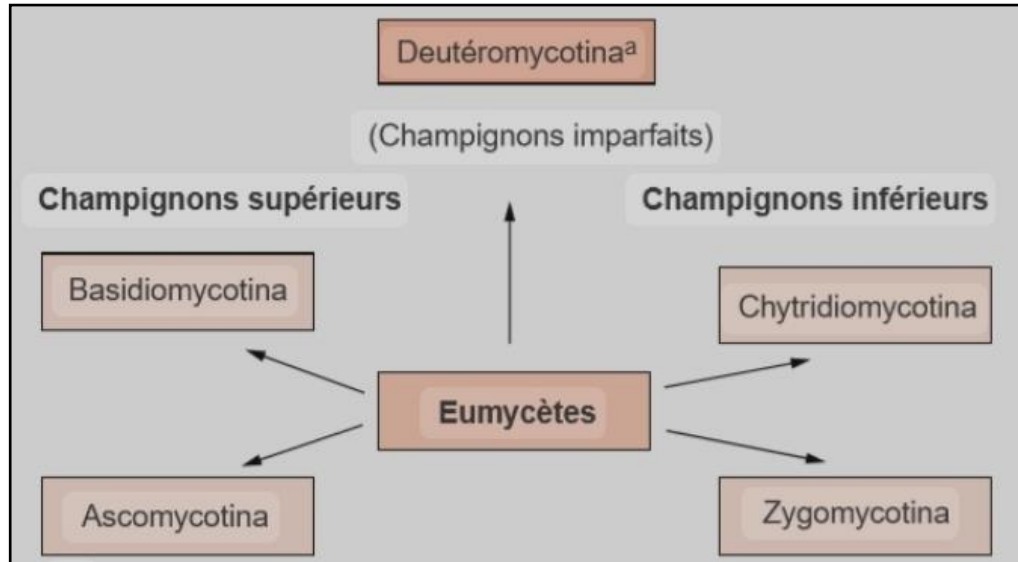


Figure 2 : Classification des Eumycètes (Meradji, 2024)

1.1.2.1 Zygomycètes

Ce groupe formé d'organismes microscopiques hétérogènes est polyphylétique (JAMES *et al.*, 2006), comme tous les vrais champignons, produit des parois cellulaires contenant de la chitine. Les zygomycètes sont des champignons microscopiques à mycélium siphonné (Bouchet *et al.*, 1999). Ils se caractérisent par la formation des zygospores d'où le nom « zygomycètes » dans la reproduction sexuée et par des endospore(sporangiospores ou sporocystospores) dans le cas de la reproduction asexuée. Les endospores sont des spores immobiles produits à l'intérieur d'un sac fermé (sporocyste) porté par l'extrémité des filaments (Dugat, 2014).

Avec 1060 espèces décrites, la plupart des Zygomycota forment des hyphes qui sont généralement coenocytaires (RAVEN *et al.*, 2007). Elles sont des champignons ubiquistes, omniprésents dans diverses interactions dans le milieu naturel (WHITE *et al.*, 2006).

I.1.2.2 Ascomycètes

Ils constituent le plus grand groupe de champignons microscopiques (Kirk *et al.*, 2008). Ce sont des champignons à filaments cloisonnés, présentant une structure caractéristique appelée asque (Botton *et al.*, 1990). Ces champignons produisent des ascospores à l'intérieur des asques et dans la multiplication asexuée aboutit à des conidies au sommet d'un conidiophore (Simon, 2020). L'asque contient généralement un nombre déterminé de spores ou d'ascospores, produites suite à la fusion de deux noyaux, suivie d'une méiose (Botton *et al.*, 1990)

Les ascomycètes sont des champignons qui ne possèdent pas de cellules flagellées, avec un mycélium septé et dont le cycle reproductif sexué comporte la formation de cellules spécifiques appelées les asques (Lanier *et al.*, 1978). Pour la plupart des espèces de ce phylum, la reproduction asexuée se fait généralement par des conidies plurinucléées. (Raven *et al.*, 2007).

Selon Encyclopaedia Britannica (2025), le phylum Ascomycota comprend actuellement plus de 64000 espèces décrites.

I.1.2.3 Basidiomycètes

Les organismes appartenant au phylum Basidiomycota comprennent plus de 40000 espèces qui ont été décrites, avec une projection de plus de 54000 espèces d'ici 2030 (He *et al.*, 2022). Leur mode de vie est essentiellement saprophyte : ce sont en effet les organismes fongiques possédant des aptitudes les plus avancées en matière de décomposition de matériaux lignocellulosiques. On observe aussi des organismes qui à la fois sont symbiotiques pour les plantes et parasites pour les animaux (Calvez, 2009). Ces champignons se caractérisent par la production des spores sexuelles, appelées basidiospores, formées par bourgeonnement à l'extrémité de cellules allongées (Marilyne, 2014).

Les Basidiomycètes présentent un mycélium cloisonné avec présence de « boucles » au niveau des cloisons (CHABASSE *et al.*, 2002). Même si la plupart de ces microorganismes se

trouvent dans des milieux terrestres, certaines espèces, notamment des levures, sont identifiées en milieu marin (Bass *et al.*, 2007).

I.1.2.4 Chytridiomycètes

Ces champignons unicellulaires, qui habitent dans des milieux aquatiques et se multiplient via de des spores asexuées dispersées par un flagelle(Quero, 2018). Ils constituent un groupe principalement aquatique, comprenant environ 790 espèces (Raven *et al.*, 2008).

Les chytrides présentent une morphologie simple, qui sont définis par la présence de zoospores, munies d'un unique flagelle dirigé vers l'arrière ; ils constituent la lignée évolutive la plus ancienne parmi les champignons (James *et al.*, 2006), qui représente un clade polyphylétique (James *et al.*, 2006 ; Bar-Hen *et al.*, 2008).

Les organismes de ce phylum sont généralement microscopiques, la plupart sont saprotrophes, aérobies ou anaérobies ; ils ont la capacité de décomposer un grand nombre de substrats (Powell, 1993 ; Shearer *et al.*, 2007). Environ 1000 espèces au sein de ce phylum, représentant environ 1% des espèces fongiques décrites (Taylor *et al.*, 2004).

I.1.2.5 Deuteromycètes

Ce groupe englobe tous les champignons qui ne génèrent ni ascospores, ni basidiospore et qui se reproduisent au moyen de conidies. Ils sont unicellulaire comme les levures ou présentent un thalle filamenteux septé. Taxonomiquement, ils constituent un groupe artificiel en attente de classification définitif parmi les ascomycètes et les basidiomycètes (BENMESSAOUD, 2010).

I.2 Distribution écologique

Les champignons marins présentent une large distribution dans les environnements océaniques, où ils occupent diverses niches écologiques. Ils ont été identifiés en association avec une grande variété d'organismes appartenant à l'ensemble des niveaux trophiques, adoptant des

modes de vie saprotrophe, symbiotique ou parasitaire (Raghukumar, 2017). On estime à ce jour que 2182 espèces ont à été isolées de milieu océanique (Jones, 2025). Parmi le faible nombre de travaux publiés, la majorité d'entre elles se sont concentrées sur la zone littorale (Kohlmeyer & Kohlmeyer 1979 ; Hawksworth, 2001 ; Shearer *et al.*, 2007).

En 1979, Kohlmeyer et Kohlmeyer avaient observé que des champignons pouvaient se développer dans des environnements marins profonds et s'adapter ainsi à de fortes pressions mais très peu de données relatives aux champignons des grands fonds sont disponibles à l'heure actuelle. Des recherches pendant (2023–2024) confirment que *Aspergillus sydowii*, *Cladosporium* et *Alternaria*, isolés jusqu'à 10 900 m dans la fosse des Mariannes, tolèrent des pressions de 20 à 40 Mpa, avec germination et croissance conservées, ainsi qu'une modulation de la production de métabolites secondaires (pigments, antimicrobiens).

Les habitats marins sont caractérisés par une multitude de variables environnementales. Ces niches écologiques particulières sont généralement caractérisées par des paramètres tels que la salinité, la température et la pression hydrostatique. Si la salinité moyenne de l'environnement marin est entre 3 et 3,5%. Certains habitats atypiques peuvent avoir une faible salinité (Alexander *et al.*, 2009; Stock *et al.*, 2012). En ce qui concerne la température et la pression hydrostatique, les gradients sont également extrêmes avec des variations significatives qui permettent à diverses communautés microbiennes, aux caractéristiques physiologiques contrastées, de se développer.

L'étude de la distribution des champignons dans le milieu marin n'a pas été bien étudiée comparativement aux recherches sur les champignons d'eau douce et des écosystèmes terrestres. Ils sont peu représentés dans la mer, car les champignons marins ne constituent que 5% de la flore fongique totale. Ils présentent une distribution cosmopolite et peuvent donc être retrouvés dans des régions tempérées et tropicales, y compris les estuaires (Kirk, 1969).

Des décennies de recherche en mycologie marine ont clairement prouvé que les champignons marins diffèrent de leurs homologues terrestres et d'eau douce, tant sur leur taxonomie, morphologie que leur adaptation à un environnement aquatique (Barghoom et Linder, 1944; Johnston et Sparrow, 1961; Jones, 1976; Kohlmeyer et Kohlmeyer, 1979; Meyers, 1996).

I.2.1 Mode de vie des champignons

Tous les champignons étant hétérotrophes, ils sont classés en trois principales catégories selon leur mode de vie (Raven et Mason, 2014)

a. Saprophytisme:

Les champignons saprotrophes se nourrissent de matière organique morte et peuvent pénétrer les matériaux organiques et inorganiques par l'intermédiaire d'hyphe, de rhizoïdes ou de réseaux ectoplasmiques. Ils contribuent largement au recyclage des nutriments dans les environnements terrestres et marins. La lignocellulose et la chitine sont des substrats naturels abondants, dont la régénération est influencée par le type de bois, le climat et la faune (Bovio, 2019).

b. Parasitisme

Les parasites et agents pathogènes fongiques sont essentiels au fonctionnement des écosystèmes, au maintien de leur équilibre et à la reconstitution de la matière organique par les saprotrophes. Des facteurs environnementaux tels que la hausse de la température de l'eau et l'acidification des océans peuvent transformer des champignons commensaux ou mutualistes en agents pathogènes, comme *Aspergillus sidowii*, responsable des maladies des gorgones.

Les changements climatiques et les facteurs de stress, comme la surpopulation animale, peuvent rendre les organismes vulnérables aux maladies, rendant les champignons parasites faibles plus virulents. Les études en aquaculture fournissent les connaissances les plus complètes sur les agents pathogènes fongiques chez les animaux marins (Bovio, 2019).

c. Symbiosis

Les deux principales symbioses mutualistes en milieu terrestre sont les mycorhizes (association plante-champignon) et les lichens (association algue/cyanobactérie-champignon). Les lichens marins, principalement les Ascomycota, se rencontrent dans les zones supralittorales et intertidales, exposées à un fort ensoleillement et à une forte couverture marine. Les

mycorhizes, présentes dans les plantes des marais salants et les herbiers marins, sont également présentes dans les racines (Bovio, 2019)

I.3 Intérêt économique

Les champignons représentent une source précieuse de métabolites secondaires et de structures chimiques innovantes, offrant des perspectives prometteuses en pharmacologie et dans divers secteurs industriels. Parmi eux, les champignons marins se distinguent par leur capacité à produire une diversité biosynthétique unique, élargissant ainsi le répertoire des composés bioactifs disponibles.

Par ailleurs, certaines espèces fongiques ont une importance majeure dans la biorémédiation grâce à leur aptitude à décomposer des substances complexes telles que la lignine, facilitée par des enzymes spécifiques comme les lignine peroxydases et les manganèse peroxydases. Des recherches récentes explorent également leur potentiel à dégrader des hydrocarbures, suggérant leur utilisation possible dans le traitement des pollutions pétrolières accidentelles (Mahé, 2012).

Les champignons de l'environnement marin présente une multitude d'activités, telles que les activités antibactériennes, antidiabétiques, antifongiques, anti-inflammatoires, antiprotozoaires, antituberculeuses, antivirales, antitumorales et cytotoxiques. Nombre de ces activités peuvent être rattachées à des enzymes spécifiques (Mayer *et al.*, 2013).



Chapitre II:

Généralité sur

Staphylococcus

épidermidis

CHAPITRE II : Généralité sur staphylococcus epidermidis

II Généralité sur staphylococcus epidermidis

Les SCN sont des microorganismes omniprésents (Grosjean *et al.*, 2016). L'espèce de *Staphylococcus epidermidis* est un cocci Gram positif à coagulase négative, présent en amas. C'est également une bactérie anaérobie facultative à catalase positive . C'est l'espèce de staphylocoque à coagulase négative la plus fréquente sur la peau humaine. Dans son environnement naturel, par exemple les muqueuses ou la peau humaine, il est inoffensif. Les espèces de staphylocoques à coagulase négative pénètrent dans le corps humain via des prothèses, permettant ainsi à quelques microbes de migrer vers le système circulatoire . Les bactéries développent alors des biofilms qui les protègent du système immunitaire de l'hôte ou des antimicrobiens. *Staphylococcus epidermidis* est considéré comme l'une des causes les plus fréquentes d'infections nosocomiales, avec des fréquences dépassant même celles de *Staphylococcus aureus* (Lee et Anjum, 2023).

II.1 Classification

Le genre *Staphylococcus* fait partie de la famille des Staphylococcaceae, classe des Bacilli, ordre des Bacillales.

➤ Les *Staphylococcus epidermidis* ont été classés comme suit :

Tableau 1 : Classification des Staphylococcus epidermidis

Domaine	bacteria
Phylum	firmicute
Classe	bacilli
Ordre	bacillales
Famille	Staphylococcaceae
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus epidermidis</i>(Ayom et Antohony, 2013).

II.2 Rôles de *Staphylococcus epidermidis* dans la peau saine

De nombreuses espèces de staphylocoques peuvent être présentes en tant que bactéries résidentes ou bien transitoires. Les bactéries résidentes sont des bactéries autochtones à l'hôte, tandis que les bactéries transitoires sont dérivées de sources exogènes. Ces bactéries transitoires sont généralement éliminées en quelques heures ou quelques jours, à moins que les obstacles normaux de défense de l'hôte soient compromis (Sistek, 2010)

Les staphylocoques d'origine humaine sont présents en relation commensale sur la peau et les muqueuses, et dans certaines conditions, peuvent provoquer des lésions locales et systémiques. La peau présente une structure anatomique complexe permettant la colonisation, en surface ou en profondeur, par une grande variété d'espèces microbiennes.

Elle se présente comme une fonction de territoires variés présentant d'importantes différences structurelles et fonctionnelles, corrélées aux différences de qualité des microorganismes présents. Les zones chaudes et humides, riches en nutriments et en lipides, dont le pH est proche de la neutralité, favorisent la croissance bactérienne (FLEURETTE, 1990)

La peau abrite à sa surface une population de micro-organismes bactériens et fongiques qui constituent le microbiome cutané. Il est désormais clairement établi que le microbiome joue un rôle important dans l'équilibre et l'intégrité de la peau (FLEURETTE, 1990). Parmi les espèces retrouvées sur la peau, *Staphylococcus epidermidis*. Cette espèce est considérée comme le membre dominant du microbiote de la peau saine (Landemaine L. *et al.*, 2023).

Les recherches indiquent que les bactéries cutanées , et plus particulièrement le *Staphylococcus epidermidis* commensal cutané , jouent un rôle bénéfique en favorisant la tolérance immunitaire des muqueuses, en influençant les voies immunologiques et en s'associant à d'autres microbes pour moduler l'inflammation, et en inhibant la prolifération des microbes pathogènes en stimulant les défenses immunitaires innées de l'hôte ou en intervenant directement sur les bactéries pathogènes.

CHAPITRE II : Généralité sur staphylococcus epidermidis

Pour ces raisons, *S. epidermidis* et d'autres bactéries commensales cutanées similaires sont de plus en plus recommandés pour un éventuel traitement topique sous forme de probiotiques afin de favoriser un microbiome cutané sain et de stimuler la cicatrisation des affections cutanées (Zheng *et al.*, 2022)

II.3 Spécificités génétiques et phénotypiques

II.3.1 Caractères Génétiques

D'après des études génomiques comparatives, le genre *Staphylococcus* appartient aux bactéries Gram positives à faible teneur en G+C d'ADN.

En 2001, Garrity et Holt ont proposé l'établissement de la famille des Staphylococcaceae dans laquelle se trouvent les genres *Staphylococcus*, *Gemella*, *Micrococcus* et *Salinicoccus*. Les informations génétiques (études d'ARNr 16S et d'hybridation ADNADN) suggèrent que le genre *Staphylococcus* n'est pas monophylétique et qu'il est possible de différencier des groupes d'espèces de ce type. Mais la composition de ces groupes varie selon les méthodes employées et selon les auteurs (Sistek, 2010)

Récemment, le génome entier de *S. epidermidis* (souche RP62A) a été séquencé en utilisant une technique de shotgun aléatoire qui contient 6 opérons d'ARNr, 32 % de contenu (C+G) et une taille de chromosome de 2 616 530 pb.

Parmi les divers plasmides trouvés contenant divers gènes de résistance, vSe1 et vSe2 dans les souches RP62A et ATCC12228 sont les plus remarquables en codant pour le cadmium et les protéines d'adhésion de surface. D'autre part, l'un des déterminants de la virulence, l'opéron CAP, chez *Bacillus anthracis* a également été étudié chez *S. epidermidis* (Namvar *et al.*, 2014).

II.3.2 Caractères phénotypiques

Les staphylocoques sont des bactéries Gram-positives, catalase-positives, non mobiles, asporulés, généralement non encapsulés et halotolérants. Pratiquement toutes les espèces sont aéro-anaérobies facultatives, à l'exception de *S. Saccharolyticus* et *S. Aureus subsp. Anaerobius* qui sont des anaérobies obligatoires. Le caractère aéro-anaérobie facultatif, la production de

catalase, l'absence d'oxydase, l'acidification anaérobie du glycérol et la résistance à la bacitracine et au lysozyme sont des tests simples, suffisants pour différencier le genre *Staphylococcus* des autres cocci Gram positifs (Amine, 2017). Les *Staphylococcus epidermidis* sont des bactéries de forme **cocci** qui **mesurent** entre 0,5 et 1,5 μm de diamètre. On les **observe sovent** en **grappes semblables** à des raisins secs et plus **rarement**, isolées ou **par** paires (diploques), en tétrades, ou **regroupées** en **petites chaînes** (3 à 4 cellules).

Les amas sont particulièrement visibles dans des préparations effectuées avec des cultures sur des milieux solides, présentant des colonies de couleur blanche (Sistek, 2010)

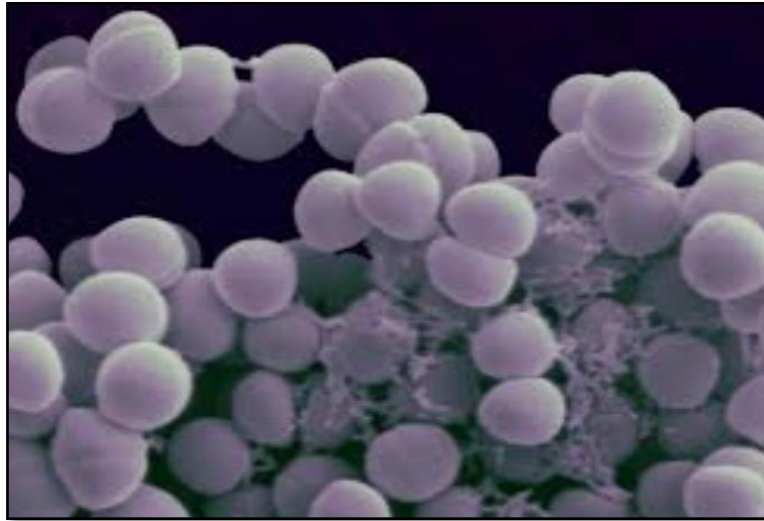


Figure 3: image de Staphylococcus epidermidis au microscope.

<https://lejournaldumedecin.pmg.be/fr/actualite/s-epidermidis-redoutable-mais-connu/article-normal-35591.html>

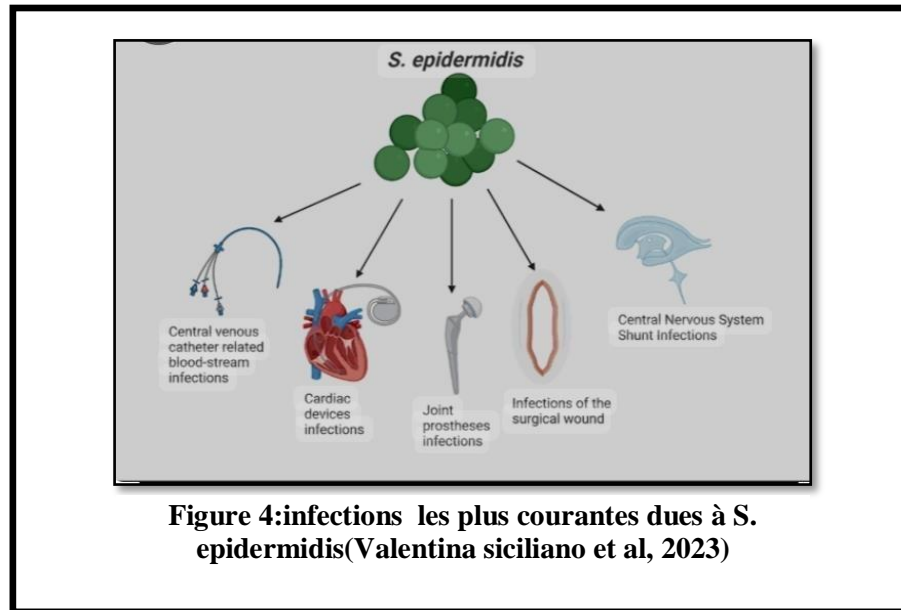
II.4 Infections causées par *Staphylococcus epidermidis*

Figure 4:infections les plus courantes dues à *S. epidermidis*(Valentina siciliano et al, 2023)

S. epidermidis est largement reconnu comme un agent pathogène. Cependant, il nécessite un hôte prédisposé pour devenir un agent infectieux à partir d'un résident cutané humain normal. Il doit donc être clairement qualifié d'opportuniste (vuong, 2002).

Les SCN, tout comme le *S. aureus*, sont fréquemment isolés dans deux types d'infections nosocomiales ou associées aux soins (Barbier, 2015).

S. epidermidis est identifiée comme la principale cause des infections des dispositifs d'implants médicaux tels que les cathéters intraveineux périphériques ou centraux. Elle peut être une cause importante d'infection des shunts, des prothèses articulaires, des greffons vasculaires et du site chirurgical. La kératite et l'endophtalmie des lentilles de contact infectées, les infections des cathéters urinaires, la bactériémie, la médiastinite et d'autres infections sont associées à *S. epidermidis*.

La prévalence de *S. epidermidis*, sa fréquence élevée sur la microflore cutanée humaine, sa colonisation généralisée sur les cellules épithéliales et également plusieurs facteurs de virulence peuvent être considérés comme les raisons directes de ces infections (Namvar *et al*, 2014)

Cette bactérie devient alors le principal agent infectieux chez les patients fragilisés, tels que les toxicomanes et les patients immunodéprimés (patients sous traitement immunosuppresseur, patients atteints du SIDA et nouveau-nés prématurés). La porte d'entrée dans le corps humain dans toutes ces infections est généralement un cathéter intravasculaire. Le groupe le plus notable d'infections causées par *S. epidermidis* sont les infections sur corps étrangers (Vuong et Otto, 2002).

Les infections liées aux port-a-cath et autres cathéters à long terme chez les patients oncologiques constituent un enjeu en pleine évolution. Les SCN sont souvent responsables des infections postopératoires en chirurgie cardiaque (médiastinites après une sternotomie), en chirurgie orthopédique (infections liées aux prothèses ou au matériel d'ostéo-synthèse) et en neurochirurgie (meningites postopératoires, notamment celles liées à un cathéter de dérivation ventriculaire) (Barbier, 2015). Bien que *S. epidermidis* ait été identifié comme agent pathogène dans les infections des voies urinaires, des plaies chirurgicales et des os hématogènes, son rôle pathogène dans les infections des prothèses est unique (Lowy et Hammer, 1983).

Jusqu'à 20 % des patients porteurs d'un dispositif cardiaque peuvent être infectés et présenter de l'érythème, de la douleur, une purulence au point d'infection et une septicémie. Dans le cas d'une infection articulaire prothétique, ils peuvent avoir des douleurs et de la purulence au site d'insertion de la prothèse.

L'infection par shunt peut se produire dans les infections asymptomatiques, mais présente également des maux de tête, des étourdissements, des nausées, des vomissements et un état mental altéré (Lee et Anjum, 2023).

Les infections à *S. epidermidis* sur ces dispositifs sont aggravées par la formation de biofilms. Dans la plupart des cas, le retrait et la réinsertion du dispositif sont nécessaires (Vuong et Otto, 2002).

II.5 Le biofilm de *S. epidermidis* et colonisation de la surface du biomatériau

La plupart des bactéries naturelles sont organisées en biofilms. Une étude majeure a permis de découvrir que les bactéries créent de telles communautés multicellulaires sacrificielles et que les biofilms bactériens sessiles (immobilisés sur une surface) constituent la majeure partie de la biomasse bactérienne mondiale. La formation d'un biofilm se produit lorsque les cellules bactériennes se fixent à une surface et commencent à créer des composés visqueux et adhésifs, dont le but est de les immobiliser (O'gara et Humphreys, 2001).

Le biofilm possède une configuration tridimensionnelle représentant une communauté de bactéries en capsulées dans une matrice organique polymère qui s'accroche à une surface. Cette matrice est constituée *in vivo* de matériaux provenant de l'hôte (fibronectine, fibrinogène, vitronectine) et d'autres molécules bactériennes, y comprenant de l'ADN de bactéries non vivantes (ADN extracellulaire). Chaque espèce bactérienne possède ses propres voies de signalisation au sein du biofilm (Aubry, 2019)

À l'étape de toutes les formes de vie communautaire, les biofilms bactériens offrent des bénéfices biologiques significatifs aux organismes qui les composent, tels que la réorganisation stratégique des bactéries face aux conditions de stress environnemental (Medeiros, 2016).

Les biofilms sont des agrégats multicellulaires de micro-organismes, présents à la surface de la peau. Leur physiologie et leur structure caractéristiques sous-tendent leur résistance à la plupart des antibiotiques et aux mécanismes de défense de l'hôte. Conformément à ce concept général, *S. epidermidis* présente une adaptation étendue, à l'échelle du génome, au mode de croissance du biofilm, incluant une régulation négative des processus cellulaires fondamentaux comme la biosynthèse des acides nucléiques, des protéines et de la paroi cellulaire. Ces modifications de la régulation génique peuvent expliquer la faible efficacité de la plupart des antibiotiques ciblant les cellules proliférantes (par exemple, les pénicillines, les aminosides et les quinolones) contre les biofilms de *S. epidermidis* (Otto, 2009).

Le développement d'un biofilm est le mécanisme le plus important impliqué dans l'infection à *S. epidermidis*. De plus, la colonisation de la peau humaine par *S. Epidermidis* implique apparemment également un état de type biofilm. La formation d'un biofilm débute par

l'adhésion cellulaire à une surface, par exemple un tissu humain ou la surface plastique d'un dispositif médical à demeure (Otto, 2013).

Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments et O_2 et en déchets définissant des niches physiques et chimiques. Il peut se disperser et libérer des bactéries mobiles ou des agrégats bactériens entourés de matrice (Filloux et Vallet, 2003).

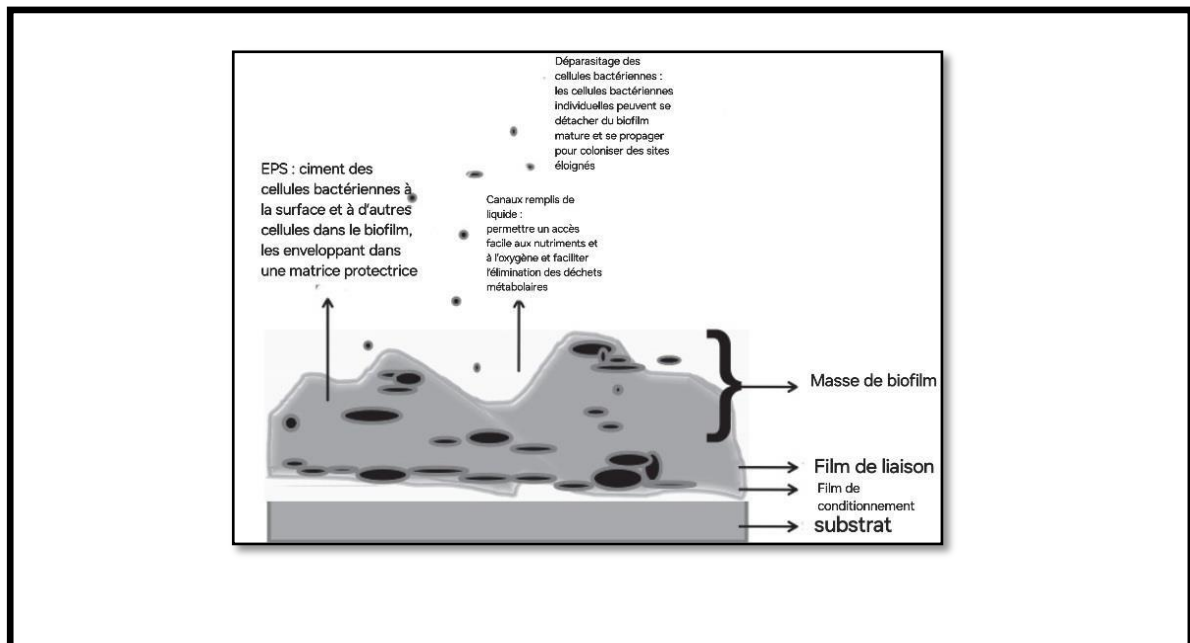


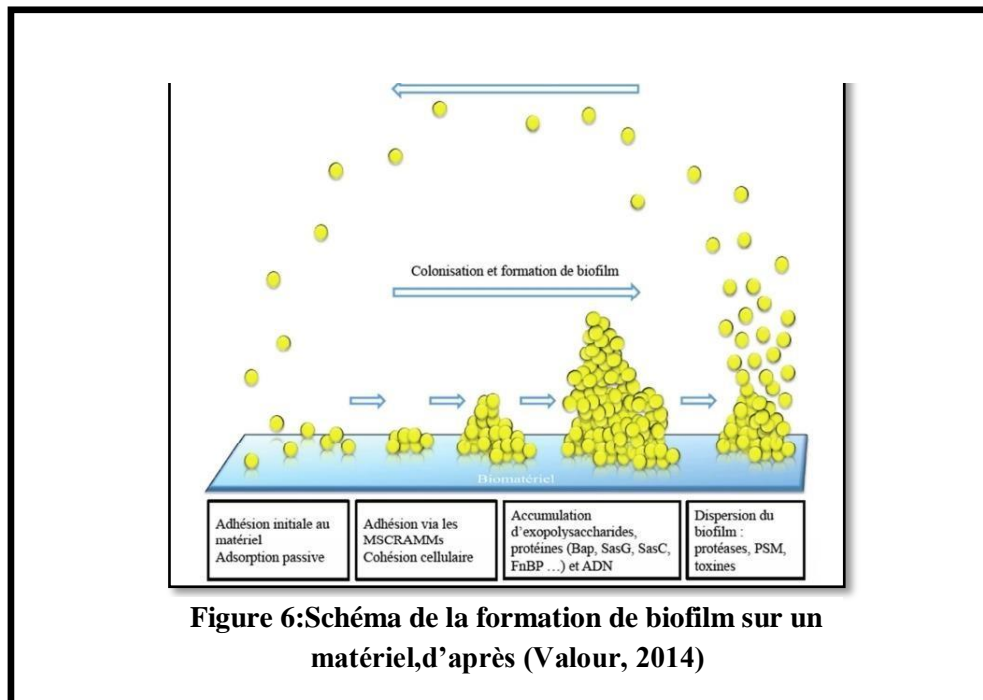
Figure 5: Structure du biofilm mature. EPS, substances extrapolymeres (McCann et al., 2008)

❖ Formation de biofilm

Au cours de l'étape initiale, les premières interactions entre les bactéries et la surface du matériau sont de nature non spécifique et sont contrôlées par différentes forces : forces hydrophobes, électrostatiques et de Lifshitz-Van der Waals, entre autres. Les bactéries sont donc passivement adsorbées sur les surfaces du matériau au cours de cette étape. Bien que de nombreux modèles théoriques aient tenté de décrire l'adhésion bactérienne, l'hydrophobicité de la surface des cellules staphylococciques et celle de la surface du biomatériau respectif sont généralement considérées comme très importantes pour la fixation initiale.

CHAPITRE II : Généralité sur staphylococcus epidermidis

La deuxième étape, l'accumulation en plusieurs couches bactériennes, est un processus facilité par les composants de surface microbiens reconnaissant les molécules de matrice adhésives et par l'adhésion intercellulaire. Au cours de cette étape, le biofilm se développe lentement sur la surface colonisée. Cependant, c'est à l'étape suivante que le biofilm mûrit et que les caractéristiques structurales du biofilm, typiques de l'espèce bactérienne, s'établissent. Au cours de la quatrième étape, les bactéries, auparavant recouvertes et protégées par la structure du biofilm, réapparaissent dans leur vie planctonique naturelle, prêtes pour un nouveau cycle invasif. La dispersion et le détachement des bactéries caractérisent donc cette étape finale du cycle de vie bactérien (Arciola *et al.*, 2012).



II.6 Moyens de lutte contre *S. epidermidis* pathogène

Une fois qu'un isolat de *S. epidermidis* est pathogène, la prise en charge thérapeutique repose sur deux considérations importantes : le choix du protocole chimiothérapeutique le plus adapté et l'élimination du corps étranger (le cas échéant). L'importance d'un choix thérapeutique

judicieux est illustrée par le traitement de l'endocardite sur prothèse valvulaire, dont le taux de mortalité précoce a été rapporté à plus de 70 %. La prudence est de mise lors du choix d'un protocole antimicrobien pour une infection à *S.epidermidis* , car les tests de sensibilité standard peuvent ne pas être représentatifs . La pénicilline est le médicament de choix pour les microorganismes sensibles. En cas de souches véritablement sensibles à la méthicilline , une pénicilline semi – synthétique résistante à la pénicillinase (nafcilline, oxacilline) ou de la céphalotine peuvent être utilisées . En cas d'infection à *S. epidermidis* résistante à la méthicilline , la vancomycine est recommandée (**Lowy et al, 1983**).

Staphylococcus epidermidis est une cause majeure d'infections associées aux biomatériaux (IAB), la formation de biofilm augmentant la stabilité bactérienne. L'utilisation généralisée d'antibiotiques chez les patients en chirurgie cardiaque a accru la résistance aux bêta-lactamines comme la méthicilline. De nouvelles stratégies sont nécessaires pour prévenir et traiter les infections associées. Les peptides antimicrobiens et les complexes de furanones peuvent diminuer la résistance des IAB et des tissus péri-implantaires. Le linézolide, un antibiotique de la famille des oxazolidinones, est efficace contre les staphylocoques résistants à la méthicilline et les cocci résistants aux glycopeptides. Des composés comme la NAC, l'huile essentielle de cannelle et le farnésol peuvent réduire la formation de biofilm (**Namvar et al, 2014**).

Les biofilms staphylococciques, qui présentent une résistance bactérienne aux défenses de l'hôte et aux mesures antibactériennes, peuvent être perturbés par des enzymes comme la désoxyribonucléase I (Dnase I) et la dispersine β (Dsp β). La Dnase I dégrade l'ADN environnemental, un composant structural, et la dispersine β hydrolyse la poly-(β -1,6)-Nacétylglucosamine (PNAG).

La Dnase I peut inhiber la formation de biofilm *in vitro* lorsqu'elle est présente dans le milieu de culture, mais elle est incapable de détacher le biofilm formé une fois celui-ci développé. La Dnase I sensibilise également les bactéries du biofilm aux biocides et au détachement des détergents anioniques (*Arciola et al, 2012*).

✓ **Nouvelles approches prophylactiques**

Devenues bien ancrées, les infections liées aux dispositifs sont pratiquement impossibles à éradiquer; par conséquent, la prévention des infections est plus urgente que jamais. Semblables au dicton « mieux vaut prévenir que guérir », ces approches se concentrent sur le développement de nouveaux agents antibiofilms par le biais de moyens empêchant la colonisation bactérienne et la formation d'infections cliniquement significatives au lieu d'éradiquer une infection déjà formée. L'immunoprophylaxie est une stratégie très prometteuse pour la prévention des infections staphylococciques liées aux dispositifs. Götz (2006) a fourni un aperçu des cibles potentielles pour le développement de vaccins contre les staphylocoques. Les composants exprimés à la surface cellulaire de *S. epidermidis* comme le PIA, les acides téichoïques, les adhésines protéiniques et les protéines CWA se sont révélés être des cibles candidates pour le développement de vaccins et l'immunomodulation. La vaccination staphylococcique a été utilisée, avec un succès partiel, pour prévenir les infections chez les animaux, ce qui suggère qu'un vaccin staphylococcique est réalisable (McCann *et al*, 2008).

Partiell :

PARTIE

PRACTIQUE



Chapitre III
Matériels
et
Méthodes

1. . Introduction

Ce présent travail a été réalisé entre Mars et Mai 2025 au niveau d u Laboratoire de Microbiologie (N°3) et le Laboratoire de Recherche de Microbiologie et Biologie Végétale à l'Université Abdelhamid Ibn Badis (Mostaganem).

Le travail expérimental porte sur l'étude de l'activité antistaphylococcique de quelques champignons marins isolés à partir du sable marin prélevé sur la plage de Salamandre, wilaya de Mostaganem (Algérie).

Cette recherche est subdivisée en étapes suivantes:

1. Isolement et identification de la bactérie *Staphylococcus epidermidis*
2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des souches de *S. épidermidis*
3. Etude de la formation du biofilm par les isolats de *S. épidermidis*
4. Isolement et identification des champignons marins
5. Extraction des métabolites secondaires à partir de souches fongiques
6. Évaluation de l'activité antistaphylococcique des extraits fongiques

2. Caractérisations des milieux de culture utilisés

(Annexe 2)

2.1 Bouillon nutritif

C'est un milieu de culture liquide couramment utilisé pour cultiver des microorganismes peu exigeants et pour la revivification des souches (Biokar, 2016).

2.2 Gélose nutritive

La gélose nutritive ordinaire (GN) constitue un milieu solide d'isolement qui n'est pas sélectif. Sur ce milieu, on peut observer une variété de colonies distinctes. Il permet de séparer les micro-organismes présents dans un mélange, facilitant ainsi leur étude individuelle (dutcher, 2018).

2.3 Milieux Chapman

Le **milieu de Chapman** est un **milieu de culture sélectif** utilisé pour isoler et identifier des bactéries du genre **Staphylococcus** (bactéries halotolérantes), c'est un milieu gélosé contenant 7,5 % de chlorure de sodium il contient également du mannitol et un indicateur de pH (rouge de phénol). (Connie et Donald, 20 19).

2.4 Gélose Mueller-Hinton

Il s'agit d'une gélose peu sélective, qui permet la croissance d'une grande variété de bactéries. Ce milieu est utilisé pour la réalisation d'antibiogrammes standardisés notamment le test de diffusion sur disque, Sa composition standardisée permet une bonne diffusion des antibiotiques dans le milieu. (Gillespie et Hawkey, 2006).

2.5 Gélose au Rouge Congo Agar

La gélose au Congo Rouge (CRA) est un milieu de culture sélectif et différentiel largement utilisé pour détecter la formation de biofilm par les bactéries. La méthode standard, décrite par Freeman *et al.*, (1989), repose sur l'ajout derouge Congo (généralement 0,8 g/L) et de saccharose (30–50 g/L) à un agar de Brain Heart Infusion (BHI)

2.6 Gélose Sabouraud au chloramphénicol

La gélose de Sabouraud est un milieu permettant **la culture des champignons**, notamment des **levures** et des **moisissures**,. Dans le cas de prélèvement fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose Sabouraud + Chloramphénicol, qui inhibe la croissance des bactéries Gram négatif et Gram positif (Bianchi *et al.*, 2003).

3. Etude bactériologique

3.1. Isolement et purification de *Staphylococcus epidermidis*

3.1.1. prélèvement des staphylocoques au niveau des narines

Il s'agit d'un d'auto-prélèvements par deux volontaires sains parmi le personnel du laboratoire. Le prélèvement est effectué à l'aide des écouvillons stériles, par une introduction de l'écouvillon dans une narine ensuite frotter délicatement la paroi interne en faisant un mouvement de rotation, puis ensemencer l'échantillon en stries sur gélose Chapman et incubé à 37° pendant 24 à 48 heures.

03 souches de *Staphylococcus epidermidis* ont été fournies par le laboratoire d'analyses médicales du Dr. MOHCINE F. Médecin Spécialiste en Biochimie (Mostaganem). les colonies de couleur blanche ou légèrement roses **et** ne fermentant pas le mannitol (fig.07) ont été prélevées ensuite purifiées sur milieu gélosé de Chapman.



Figure 7:purification des staphylocoques épidermidis

3.2. Identification des souches bactériennes

Les souches isolées ont été identifiées par des techniques microbiologiques standards : étude morphologique, coloration de Gram, production de catalase et de coagulase libre.

3.2.1. Etude des caractères morphologiques

3.2.1.1. Examen macroscopique

Une observation macroscopique constitue une première étape dans l'identification des souches permet de décrire plusieurs caractères des colonies : la forme, la couleur, et l'aspect des colonies sur milieu sélectif chapman, ainsi que la modification de milieu de culture.

3.2.1.2 Examen microscopique

Cet examen est basé sur la coloration de Gram (annexe 3) afin de différencier le type de Gram (Gram positif ou Gram négatif), et examiner la forme et l'agencement des cellules bactériennes (fig 08).

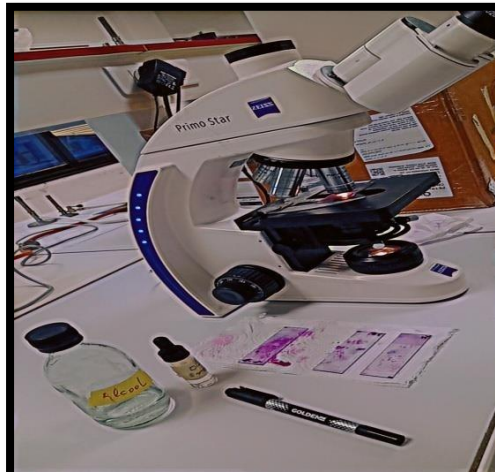


Figure 8: Observation microscopique des isolats bactériens après coloration de Gram.

3.2.2 Etude des caractères biochimiques**3.2.2.1 Test de catalase**

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques (Garnier et Denis, 2007). Il se fait par l'addition d'une goutte d'eau oxygénée (H_2O_2) sur une colonie bactérienne. L'observation d'effervescence par émission de bulles d'oxygène signifie que la bactérie produit l'enzyme catalase, qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (**Delarras, 2014**)

3.2.2.2 Test de coagulase libre

Le test de la coagulase permet de différencier les staphylocoques à coagulase positive (comme *Staphylococcus aureus*) des staphylocoques à coagulase négative (SCN), tels que *Staphylococcus epidermidis*. Cette enzyme permet à certaines bactéries de coaguler le plasma en convertissant le fibrinogène en fibrine.

Deux méthodes sont utilisées pour ce test: la méthode en tube (coagulase libre) et la méthode sur lame (coagulase liée). Dans notre étude, nous avons appliqué la méthode en tube.

- Un tube contenant 0,5 ml de plasma humain à étéensemencé par une colonie jeune de culture bactérienne. Puis, Incubé à 37 °C pendant 4 heures. Si aucun caillot n'apparaît, poursuivre l'incubation jusqu'à 24 heures, car certaines souches coagulase positives peuvent réagir plus lentement.
- L'absence de coagulation indique une souche coagulase négative, caractéristique de *S. epidermidis*. Ce test permet de distinguer *S. aureus* (coagulase positive) des autres staphylocoques (MacFaddin, 2000).

3.3. Conservation des souches de *Staphylococcus epidermidis*

Les isolats identifiés des *Staphylococcus epidermidis* ont été conservés dans les tubes de géloses nutritives inclinées à +4°C, Avant toute manipulation, chaque isolat est inoculé en bouillon nutritif pour une revivification.

4. Etude de la sensibilité des souches de *Staphylococcus epidermidis* aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par la méthode de diffusion sur disque en milieu gélosé Mueller Hinton (MH) selon les normes et les recommandations du

comité de l'antibiogramme de la société française de la microbiologie (CASFM, 2024).

Tous les isolats ont été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques en utilisant les 09 antibiotiques suivants:

Gentamicine (10 µg), Amikacine (30 µg), Chloramphénicol (30 µg), Rifampicine (5 µg),

Tobramycine (10 µg), Oxacilline (1 µg), Streptomycine (300 µg), Nitrofurantoin (300 µg),

Azithromycine (15 µg).

- A partir d'une culture pure de 24 heures sur gélosé nutritive quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques sont été raclé avec un écouvillon stérile puis décharger dans 5 ml d'eau physiologique stérile à 0.9 % ; la suspension bactérienne et bien homogénéiser, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mac Farland ou à une D.O de 0.08 à 0.10 lue à 625 nm.
- À l'aide d'un écouvillon, la boîte de milieu Mueller-Hinton estensemencée sur toute la surface de la gélose par des stries serrées, en tournant la boîte trois fois de 60 °. L'ensemencement est effectué dans les 15 mn qui suivent la préparation de l'inoculum.
- À l'aide d'une pince préalablement flambée, les disques d'antibiotiques sont appliqués sur la surface de la gélose (fig 09). Les boîtes sont, ensuite, incubées pendant 24 heures à 37 °C.
- Après l'incubation, la lecture des résultats est faite par la mesure des diamètres des zones d'inhibition. L'interprétation a été faite selon les normes de CASFM.

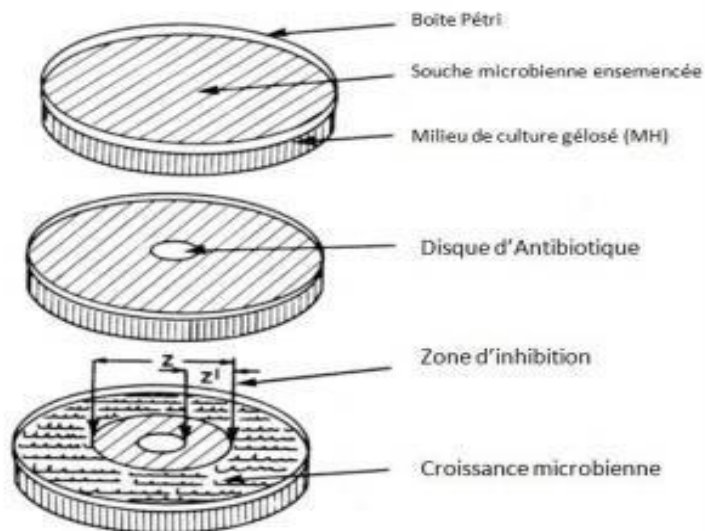


Figure 9: Technique de l'antibiogramme (Zaika, 1989)

5. Formation du biofilm

Pour démontrer la capacité de formation d'un biofilm chez quatre isolats de *Staphylococcus epidermidis*, deux techniques sont sélectionnées : la technique standard de coloration au Cristal Violet (CV) et la technique de culture sur gélose au Rouge Congo (RCA).

5.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode de coloration au cristal violet

Il s'agit d'une méthode qualitative de détection du biofilm décrite par Christensen *et al* (1985). Les *S. epidermidis* ont été inoculés dans 04 mL de bouillon trypticase soja contenant 1 % de glucose dans des tubes à essai. Les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 24 h.

Après l'incubation, le milieu de chaque tube a été jeté et les tubes ont été lavés et décantés 3 fois avec l'eau physiologique afin d'éliminer les cellules non adhérentes, puis laissés sécher à l'air libre pendant 20 min.

Les tubes ont été colorés au violet de cristal (0,1 %) pendant 20 min. puis les tubes

sont rincés abondamment pour éliminer l'excès de colorant et laissés sécher de nouveau à l'air en position inversée. Après séchage, 4 ml d'éthanol à 95% sont ensuite ajoutés dans chaque tube afin de

solubiliser le colorant lié aux cellules adhérentes et incubés pendant environ 30min, le contenu de chaque tube a été mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm.

La notation de la méthode du tube a été effectuée sur la base du résultat de la souche témoin. La formation de biofilm a été notée positive lorsque la paroi et le fond du tube présentaient un film visible . L'expérience a été réalisée en trois fois (Hassan et *al*, 2011).

5.2. Etude de la formation du biofilm par la méthode de Rouge Congo Agar (RCA)

La méthode suggérée par Freeman et *al*. (1989) requiert l'emploi d'un milieu solide préparé à partir d'un bouillon cœur de cervelle (BHIB) enrichi en 5% de saccharose et en rouge Congo.

La préparation du Rouge Congo a été effectuée séparément dans une solution aqueuse concentrée qui a été autoclavé pendant 15 min.

On ajoute ensuite cette solution aux autres composants du milieu (en état de surfusion à 55°C). Le milieu préparé de cette manière est ensuite inoculé avec une portion d'une culture de la souche bactérienne et incubé à 37° pendant 24h à 48h (Kara Terki, 2014).

Selon Kara Terki (2014), le colorant Rouge Congo réagit directement avec certains polysaccharides bactériens pour créer une bave et produire des colonies de couleur noire sur un milieu CRA, contrairement aux colonies non productrices de polysaccharides qui restent rouges.

6. Etude des champignons marins**6.1.Echantillonnage**✓ **Présentation de la région d'étude**

Les échantillons du sable, utilisés pour cet objectif ont été prélevés à partir d'un sable sous l'eau de mer durant la période de mois de mars 2025, le site de prélèvement d'échantillon se trouve au niveau de la plage de Salamandre situé à l'ouest de Mostaganem, sur la côte nord-ouest algérienne (Fig 10 et 11). Il s'agit d'une crique en forme de petit golfe, bordée à l'arrière par une falaise rocheuse où se déversent parfois des rejets urbains et industriels . Le sable y est très fin, de bonne qualité, sur une bande côtière d'environ 7 km. Ce site est régulièrement sélectionné dans des études scientifiques sur les micromycètes marins (Plages d'Algérie, 2023)

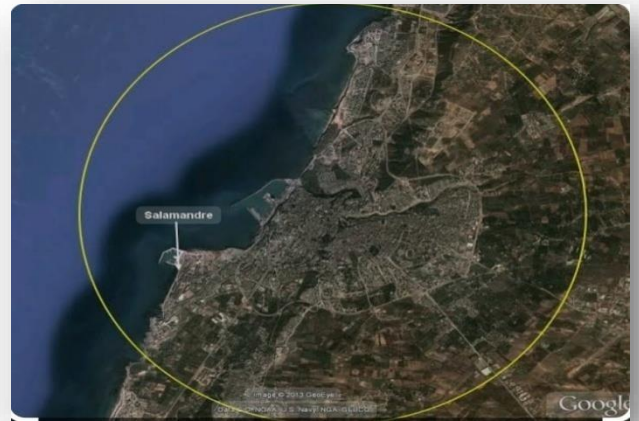


Figure 11:Site de prélèvement Figure 10: carte de la plage de Salamandre (Google Earth ,2025).

6.2. Technique de prélèvement

À l'aide d'une spatule stérile, les échantillons de sable ont été prélevés à une profondeur de 5 à 10 cm, là où les champignons marins sont actifs. Ils ont ensuite été placés dans des flacons en verre propres et désinfectés, puis transportés rapidement au laboratoire afin d'éviter toute dégradation (fig 12)



Figure 12:Prélèvement et transporter des échantillons de sable.

6.3. Isolement des champignons marins :

- En conditions stériles, 1 gramme de sable est prélevé puis transféré dans 9 ml d'eau de mer filtrée et stérilisée à l'autoclave. Le mélange est homogénéisé à l'aide d'un vortex, cette dilution constitue la solution mère. À partir de celle-ci, une dilution successive est réalisée

en transférant 1 ml de la solution précédente dans 9 ml d'eau de mer stérile, obtenant ainsi une série de dilutions décimales (allant de 10^{-1} à 10^{-4}) Une série de dilutions décimales (allant de 10^{-1} à 10^{-4}).

- Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est ensemencé en surface sur un milieu sabouraud au chloramphénicol, puis réparti uniformément à l'aide d'un râteau stérile en verre. Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 7 jours (figure 13) (Overy *et al*, 2019).

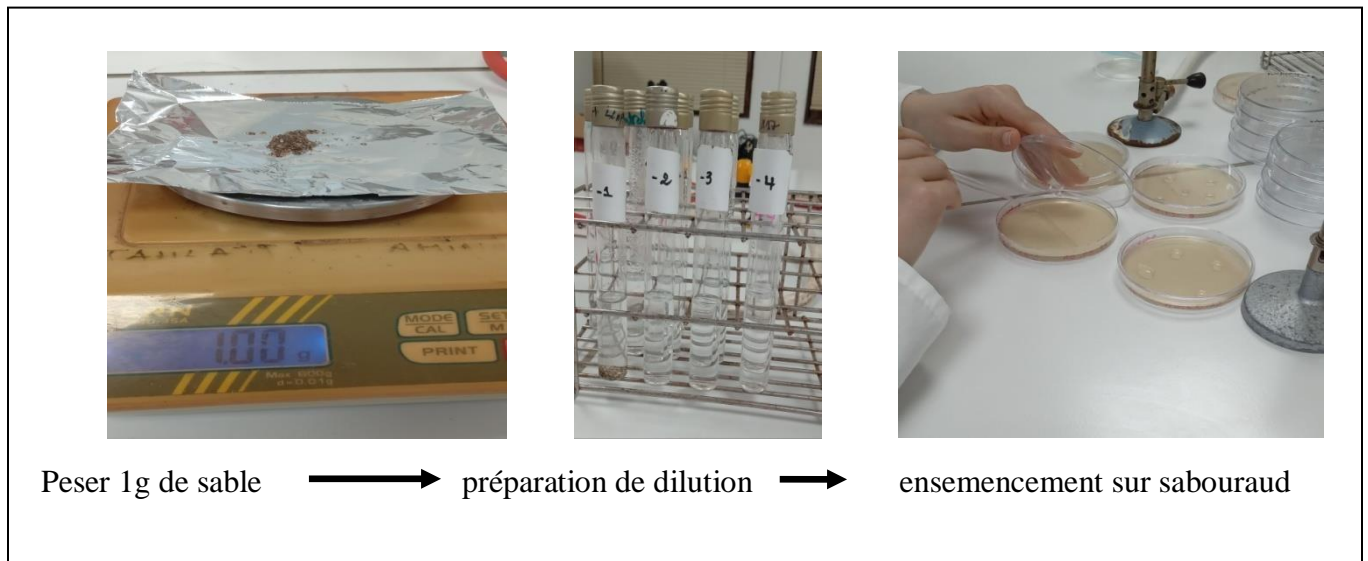


Figure 13: Les étapes de l'isolement des champignons marins.

6. 4.Purification des isolats fongique :

Après la période d'incubation, Les colonies présentant un aspect filamenteux ont été choisies et numérotés ensuite purifiées sur la milieu de culture par des stries. Les boites sont incubées à 28°C pendant 7 jours.

7. Test d'Antagonisme sur Milieu MH :

- ✓ L'évaluation de l'activité antibactérienne des champignons se fait par le test d'antagonisme. Le but de cette manipulation est la recherche du pouvoir antibactérien des souches fongiques étudiées. (Hazalin *et al.*, 2009). est réalisée par la technique du croisement à l'aide de stries verticales. Cette méthode implique plusieurs étapes pour déterminer l'inhibition de la croissance bactérienne par les champignons testés. Les isolats fongiques ont été ensemencées sous

forme de lignes sur la gélose de Mueller- Hinton coulé auparavant dans des boîtes Pétri puis incubés à 28°C pendant 7 jours.

- ✓ La réactivation des bactéries a été réalisée par ensemencement sur le milieu de culture GN selon la méthode des quadrants. Puis, l'incubation a été effectuée à 37°C pendant 24 heures avant d'être utilisées dans les tests de l'activité.
- ✓ Après la période d'incubation, les quatre souches de *Staphylococcus epidermidis* ont été ensemencées en position perpendiculaire au champignon.
- ✓ L'interprétation des résultats se fait suite à une incubation de 24h , en mesurant la distance d'inhibition entre les bordures de la souche cible et du champignon.

Cette méthode nous a donné la possibilité d'évaluer de manière quantitative l'effet antimicrobien de nos souches fongiques contre les isolats bactériennes différentes. Les résultats obtenus sont essentiels pour identifier les isolats les plus prometteurs en termes d'activité antimicrobienne, ouvrant ainsi la voie à des tests supplémentaires. (Zatout, 2020).

8. Identification des isolats sélectionnés

La caractérisation des 06 isolats d'intérêt a été réalisée par une étude morphologique (macroscopique et microscopique) des culture incubée à 28 C° dans une gélose Sabouraud pendant 7 jours.

8.1. Identification macroscopique

Cette étude consiste en l'observation à l'oeil nu des colonies sur milieu de culture. Il est nécessaire de caractérisé ces isolats par :

- ❖ **La couleur au recto et au verso des colonies :** les couleurs les plus fréquentes sont vert foncé, brun ou noir, blanc, crème, gris et jaune.
- ❖ **L'aspect des colonies :** les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses avec une texture épaisse, laineuse, floconneuse ou veloutée, poudreuse ou cotonneuse.
- ❖ **L' aspect du mycélium du champignon :** cet aspect est variable en fonction des genres fongiques, mycélium ras , poudreux , étendu ou envahissant.

8.2. Identification microscopique

L'examen microscopique des colonies fongiques a été réalisé entre lame et lamelle. Généralement, un examen à l'objectif 40 est suffisant pour mettre en évidence la plupart des éléments importants à examiner, telles que Le thalle, les spores, mode de groupement des conidies, mode d'implantation des cellules conidiogènes, présence de structures protectrices issues de la reproduction asexuée ou sexuée et présence des chlamydospores (Tabuc, 2007).

9. Extraction des métabolites secondaires à partir d'une souche fongique marine isolée

Après l'analyse des résultats du test d'antagonisme, la souche fongique présentant la plus forte activité a été retenue. Celle-ci a étéensemencée par stries sur huit boîtes de Pétri contenant le milieu de culture MH, puis incubées à 28 °C pendant 13 jours. À l'issue de cette période, la culture (gélose incluant le champignon actif) a été découpée en petits fragments à l'aide d'un couteau stérile, puis macérée sous agitation pendant 24 heures dans l'acétate d'éthyle (rapport volume/volume).

Après macération, le mélange a été filtré sur papier Whatman N° 1, et l'extrait obtenu (contenant les métabolites secondaires) a été évaporé à sec sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif. L'extrait brut a été pesé, puis redissous dans du DMSO (diméthylsulfoxyde). Pour préparer les solutions utilisées dans les tests antimicrobiens, 10 mg d'extrait ont été dissous dans 1 mL de DMSO, obtenant ainsi une concentration adaptée à l'évaluation de l'activité antimicrobienne. Ce protocole garantit une extraction efficace et une préservation optimale des métabolites secondaires, assurant ainsi une évaluation rigoureuse de l'activité antimicrobienne des champignons marins isolés.

L'extrait, sous forme de croûte sèche, a ensuite été employé dans des tests de diffusion en gélose afin d'évaluer son efficacité inhibitrice sur différents isolats bactériennes.

10. Évaluation de l'activité antistaphylococciques des extraits fongiques**10.1. Effet antistaphylococciques par la méthode de diffusion par disque**

L'activité antimicrobienne de l' extrait obtenu a été évaluée selon la méthode de diffusion sur disque sur milieu Mueller-Hinton, conformément aux protocoles décrits par Sacchetti *et al.* (2005) et Celiktas *et al.* (2007).

Une suspension bactérienne a été préparée à partir d'une culture pure de 20 heures cultivée sur gélose nutritive (GN), puis ajustée à 0,5 McFarland à une concentration de 10^8 UFC/ml avec de l'eau physiologique stérile. Puis, Un volume de 1 ml de cette suspension a été réparti de manière homogène sur la surface de boîtes de Pétri contenant 20 ml de gélose MH. Après une période de 2 minutes, l'excédent d'inoculum a été éliminé par aspiration sous conditions aseptiques. Par la suite, des disques de papier filtre stériles (Whatman, 6 mm de diamètre), préalablement imbibés pendant 15 à 20 minutes dans la solution de l'extrait fongique aux concentrations de 100 % et 0% (solution de DMSO pour servir comme témoin), ont été déposés soigneusement sur la surface des milieux ensemencés.

Les boîtes ont été laissées à température ambiante durant 15 minutes pour favoriser la diffusion des composés, puis incubées à 37°C pendant 24 heures (fig 14).

L'activité antimicrobienne de l' extrait a été mise en évidence par la formation d'un halos d'inhibition autour des disques, indiquant une sensibilité de la souche testée.

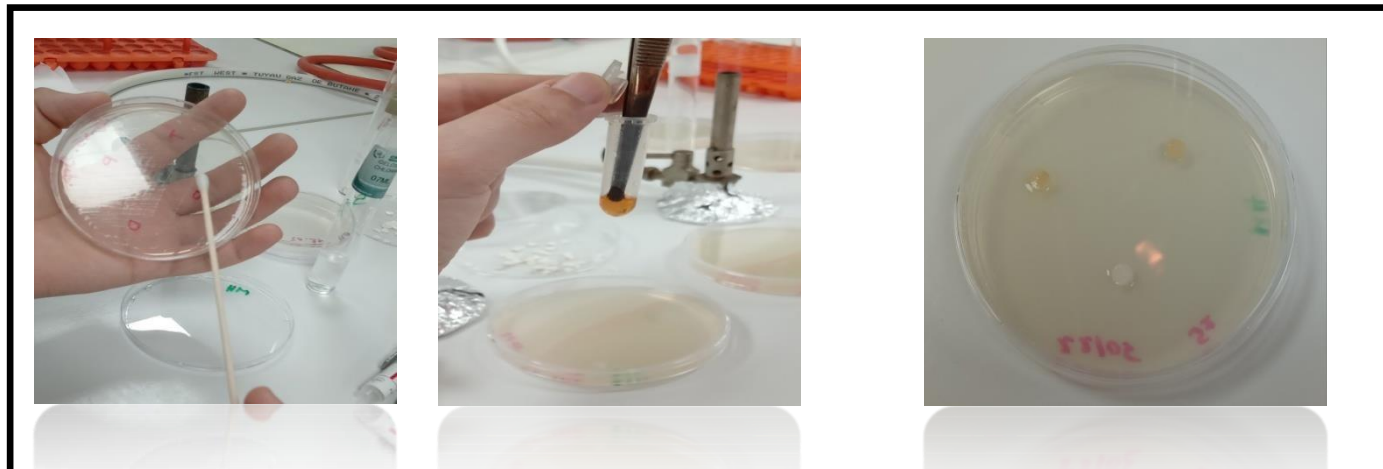


Figure 14:Processus de diffusion par disque

10.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de façon générale est la plus faible concentration capable d'inhiber toute croissance visible après un temps d'incubation de 18 à 24 h.

La CMI des extraits fongiques est déterminée par la méthode de disques sur milieu Mueller-Hinton. L'extrait brut, dissous dans 1 mL de DMSO. Puis, Des dilutions successives ont été effectuées pour obtenir des concentrations de 50% et 25% et 0%.

Des disques de papier filtre stériles ont été imprégnés avec chacune des concentrations d'extrait. Ces disques ont été déposés sur des boîtes de Pétri contenant du milieu MH préalablement inoculé avec des souches de *staphylococcus epidermidis*. L'incubation a été effectuée à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, les diamètres des zones d'inhibition autour des disques ont été mesurés pour évaluer l'activité antimicrobienne des extraits. La concentration la plus faible à induire une inhibition visible de la croissance bactérienne a été retenue comme CMI.

10.3.Effet de l'extrait fongique sur la formation de biofilm par *S.epidermidis*

Dans une série de tubes à hémolyse numérotés, nous avons introduit 100 µL d'un extrait fongique de concentration connue (100 %), avec deux répétitions. Dans un autre tube, 1 mL d'eau distillée stérile a été utilisé à la place de l'extrait fongique, servant ainsi de témoin. Ensuite, 100 µL de TSB doublement concentré, préalablement ensemencé avec la souche de *Staphylococcus epidermidis* à tester, a été ajouté à chaque tube. L'ensemble des tubes a été incubé pendant 24 heures à 37 °C.

Après la formation du biofilm, le contenu des tubes a été retiré, puis chaque tube a été lavé trois fois avec une solution de NaCl stérile à 0,9 %. Les biofilms ont ensuite été colorés avec 100 µL de violet de cristal à 0,1 % pendant 20 minutes.

L'excédent de colorant a été éliminé, et les tubes ont été lavés cinq fois à l'eau distillée. Un volume de 100 µL d'éthanol à 95 % a été ajouté à chaque tube coloré afin de solubiliser le colorant.

La lecture des résultats a été effectuée par mesure de l'absorbance du liquide obtenu, correspondant au colorant solubilisé lié aux cellules adhérees, à une longueur d'onde de 580 nm, selon la méthode décrite par Lattab (2018), avec quelques modifications.



Chapitre IV

Résultats

et

discussion

I Etude bactériologique**1. Identification des isolats de *staphylocoques epidermidis***

Au cours de cette étude, six prélèvements ont été réalisés. Parmi eux, quatre se sont révélés positifs et deux négatifs.

Les quatre prélèvements de *Staphylococcus epidermidis* positifs ont été soumis à une identification et une caractérisation phénotypique selon des méthodes conventionnelles, incluant l'observation macroscopique et microscopique, ainsi que les tests de catalase et de coagulase libre.

1.1 Etude macroscopique

La mise en culture de divers échantillons sur milieu Chapman a révélé, après 24 heures d'incubation à 37 °C, une croissance bactérienne, comme illustré dans la figure 15. Les colonies de *Staphylococcus epidermidis* apparaissent non pigmentées (blanchâtres), brillantes, arrondies, avec des bords réguliers, et mesurent entre 1 et 3 mm de diamètre. Elles ne provoquent pas de changement de couleur du milieu, ce qui indique une absence de fermentation du mannitol (Aubry, 2019).



Figure 15: Aspect macroscopique des colonies de *S.epidermidis* surmilieu Chapman

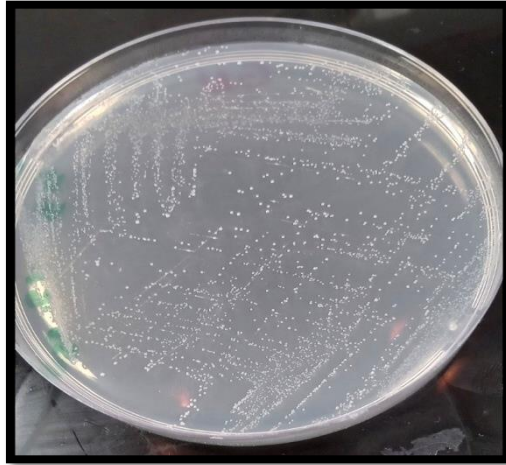


Figure 16: Aspect macroscopique des colonies de *S. epidermidis* sur gélose nutritive

Lors du repiquage successifs sur Gélose nutritive effectués à partir de différentes colonies bactériennes. après 24 h d' incubation, ont a observé des colonies arrondies bombées, opaque à contour nets de 1 mm de diamètre et de couleur blanc (fig 16).

1.2 Etude microscopique

L ' examen microscopique après coloration différentielle de Gram a montré la présence des cocci à Gram positif regroupés en amas ayant la forme de grappes de raisin, colorés en violet (fig. 17).

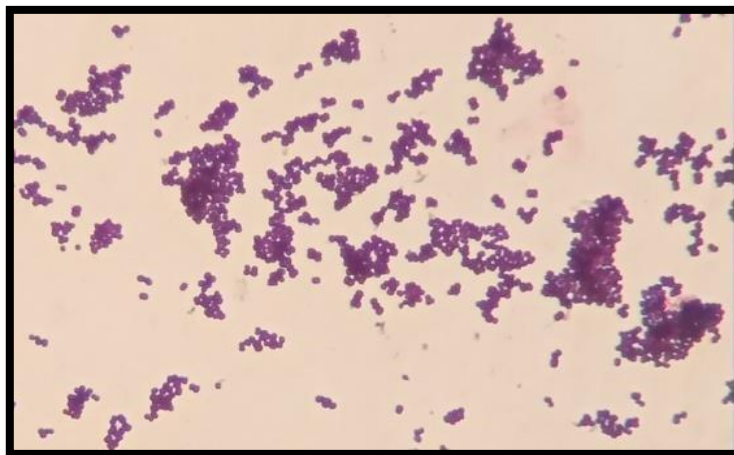


Figure 17: Observation microscopique de *S. epidermidis* après coloration de Gram (x1000)

1.3 Test catalase

Le test de la catalase a révélé que les quatre isolats présentent une activité catalasique positive, comme en témoigne la formation immédiate de bulles d'oxygène observée après l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Les résultats de ce test sont illustrés dans la figure (18). En effet, le résultat de test de catalase montre que toutes les *S. epidermidis* isolées sont capables de produire cette enzyme.

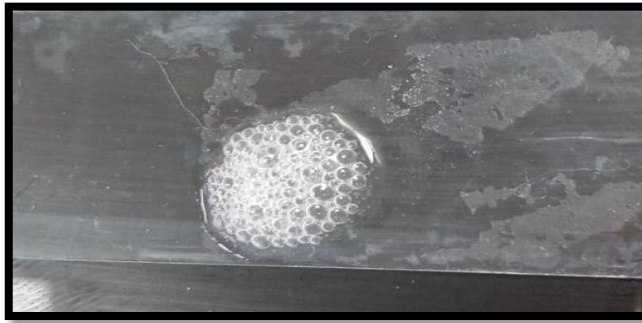


Figure 18: Résultat positif de test de la catalase des *S. epidermidis*

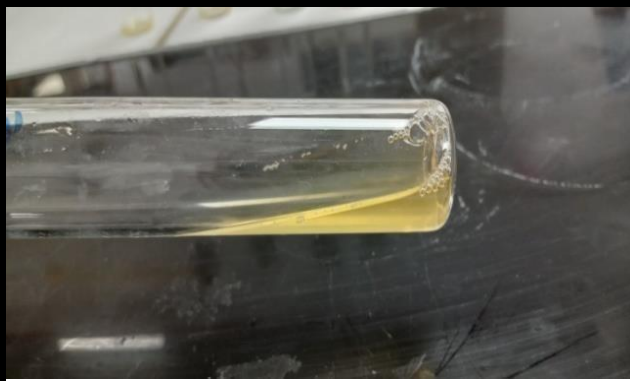

1.4 Test de coagulase libre

La recherche de la coagulase, par l'utilisation de plasma humain, a également été effectuée afin de compléter l'identification.

Ce test est utilisé pour différencier les staphylocoques à coagulase négative des staphylocoques à coagulase positive, principalement *S. aureus*.

Après l'incubation à 37 °C, l'observation visuelle du tube en position inclinée à 90° montre que les 4 isolats de *S. epidermidis* ne possèdent pas de coagulase libre, indiquant une réaction négative (coagulase négative) (fig. 19).

La souche de référence *S. aureus* ATCC 25923 a été utilisée comme témoin positif et a montré la formation d'un caillot (fig. 20).

	
<p>Figure 19:Résultat du test de coagulase libre négatif Chez S epidermidis</p>	<p>Figure 20:Résultat du test de coagulase libre positif chez S.aureus</p>

2. Étude de la sensibilité des souches de *Staphylococcus epidermidis* aux antibiotiques

Les résultats de la susceptibilité des isolats aux antibiotiques utilisés ont été déterminés suivant la méthode (CA-SFM, 2024) (Annex).

Le profil de sensibilité aux antibiotiques des isolats de *S. epidermidis* est présenté dans la figure 21.

En général, les tests antibiotiques présentent des niveaux d'activité variables sur la croissance de ces isolats.

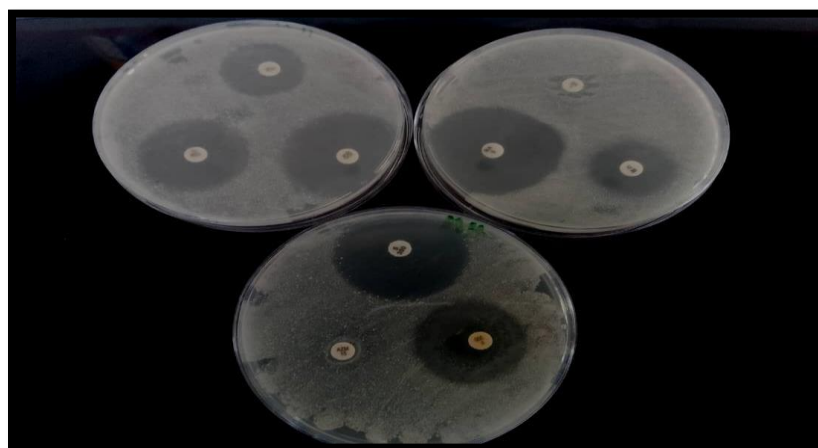


Figure 21:Résultats de l'anti biogramme obtenus

D'après les diamètres des zones d'inhibition illustrés dans le tableau 2, les résultats montrent que les SCN résistent à l'oxacilline et à l'azithromycine (100 %), tandis qu'ils demeurent sensibles à d'autres antibiotiques (fig. 22).

Tableau 2: Susceptibilité des isolats de S.epidermidisvers les antibiotiques testés

Les isolats testés	S	F	OX	C	GN	AZM	TOB	AK	RA
S1	28.63	21.44	/	31.08	34.10	/	29.03	25.51	40.95
S2	33.01	28.67	/	24.41	29.69	/	24.86	17.37	44.48
S3	34.60	28.79	/	27.69	31.36	/	25.39	17.29	44.56
S4	<u>33.35</u>	<u>16.21</u>	<u>/</u>	<u>24.06</u>	<u>35.93</u>	<u>/</u>	<u>29.51</u>	<u>24.14</u>	<u>35.92</u>

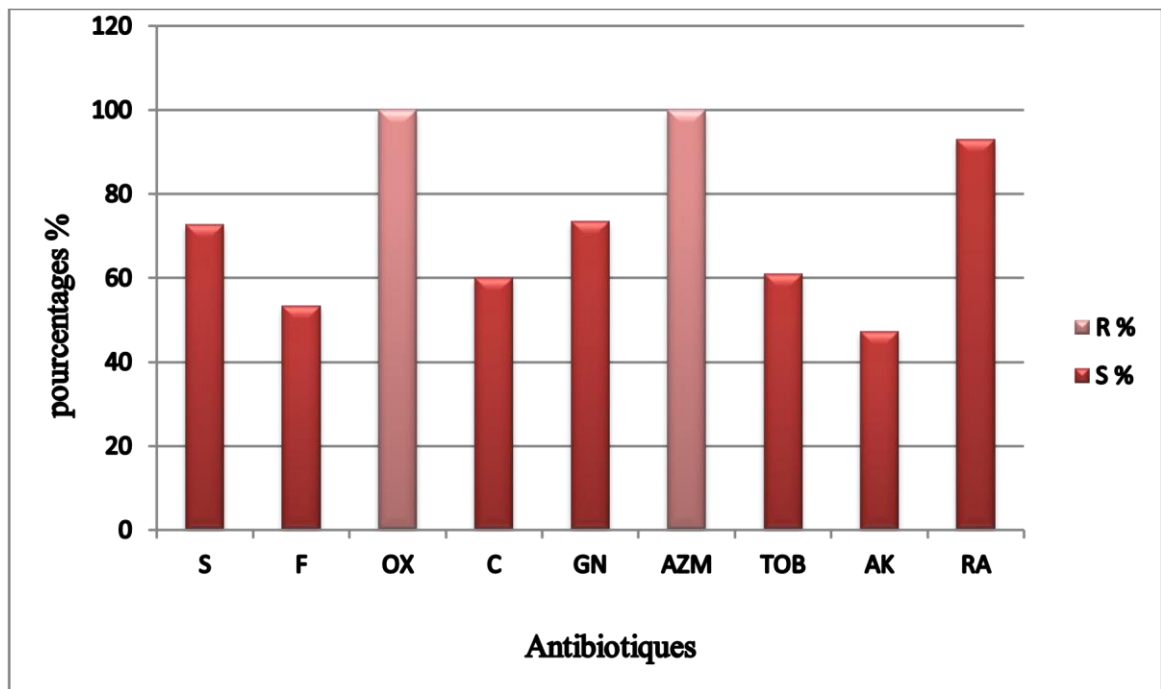


Figure 22:Représentation graphique du taux de sensibilités de S. epidermidis

3. Formation de biofilm

Dans le présent travail, L'étude de la production de bio film, par les isolats de *S.epidermidisa* été effectuée par deux méthodes qualitatives à savoir la méthode utilisant la gélose Rouge Congo ainsi que la méthode standard de coloration au cristal violet des bio films formés en tubes.

3.1. Etude de la formation du biofilm par la méthode de gélose Rouge Congo

La production de biofilm, par certaines bactéries, est considérée comme l'un des facteurs les plus importants qui favorisent l'adhérence bactérienne aux surfaces médicales,

La caractérisation phénotypique de la production de biofilm par production de slime a été réalisée par culture des isolats sur un milieu soli de additionné du colorant Rouge Congo.

La métho de RCA permet l'analyse directe et visuelle des colonies et l'identification des souches productrices de slime (qui donnent des colonies noires sur la gélose rouge)

Les 4 souches testées pour mettre en évidence leurs capacités à former des biofilms, ont donné naissance à des colonies noires et sont donc considérées comme productrice de slime (figure 23).



Figure 23: Résultats (recto et verso) de la production de bio film par la méthode RCA.

3.2. Etude de la formation du bio film par la méthode de coloration au cristal violet

Afin de quantifier les capacités de production de biofilms par les souches étudiées, l'essai de coloration au cristal violet (CV) est souvent préféré en raison de sa simplicité et de sa fiabilité. Le CV est un colorant qui se fixe sur les polysaccharides du peptidoglycane et colore de manière non spécifique l'ensemble de la biomasse, incluant tous types de cellules, vivantes ou mortes, ainsi que la matrice du biofilm bactérien.

Les expériences réalisées dans cette étude nous ont permis de mesurer le taux d'adhésion et la formation de biofilms des bactéries testées. À travers cette méthode, une souche peut être classée comme : non formatrice, faiblement formatrice, moyennement formatrice ou fortement formatrice de biofilm (Metzler, 2016).

La formation d'un biofilm était considérée comme positive lorsqu'un film visible tapissait la paroi et le fond du tube (Mathur et al., 2006). L'observation visuelle des tubes montre que les souches étudiées sont capables de former un biofilm (fig. 24).

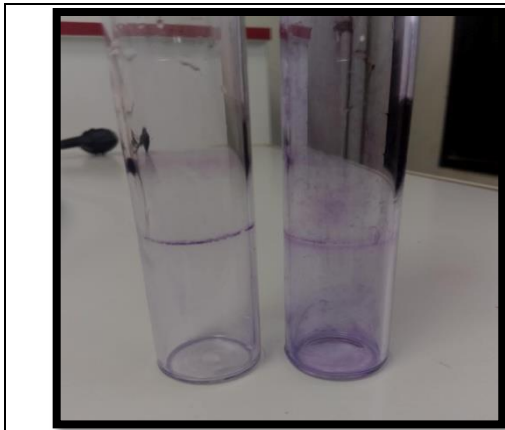


Figure 24: résultats de formation de biofilm



Figure 25: mesure de la DO

La classification de la formation de biofilms selon les critères de Stepanovic et al. (2007) est basée sur les valeurs de la DO obtenues pour les souches. L'expérience a été réalisée et répétée trois fois.

Tableau 3: Classification de la formation de biofilms selon Stepanovic et al. 2007

Moyenne des valeurs de la DO	Formation de biofilm
$DO_{moy} \leq DO_c$	Absence
$DO_c < DO_{moy} \leq 2 \times DO_c$	faible
$2 \times DO_c < DO_{moy} \leq 4 \times DO_c$	Modérée
$DO_{moy} > 4 \times DO_c$	Forte

Calcul du DO (contrôle) = DOc.

DOc = La valeur moyenne de la souche de contrôle négative + (3 × l'écart type).

L'écart type de notre souche est : 0,258.

Donc : DOc = 0,307 + (3 × 0,258) = 1,081.

Tableau 4: les valeurs moyenne d'absorbance des isolats (DO 595 nm)

	Témoin	S1	S2	S3	S4
DO moyenne	0.307	2.119	2.226	2.184	2.149

D'après le tableau 3 et 4, on a classé la production de biofilm des quatre souches comme suit :

Tableau 5: résultats de production de biofilm

	S1	S2	S3	S4
Souches bactériennes				
Caractéristiques de la production	Faible	Modérée	Modérée	Modérée

II Etude des champignons marins

1. Isolement et purification des isolats fongiques

Les cultures des échantillons de sable de l'eau de mer de la plage de Salamandre (Mostaganem) sur milieu Sabouraud + chloramphénicol ont permis d'obtenir 33 colonies à aspect filamenteux et couleurs variées après une période d'incubation de 7 j (figure 26).

En effet, 25 isolats d'aspect morphologique différent ont été choisis, numérotés et purifiés (fig. 27).

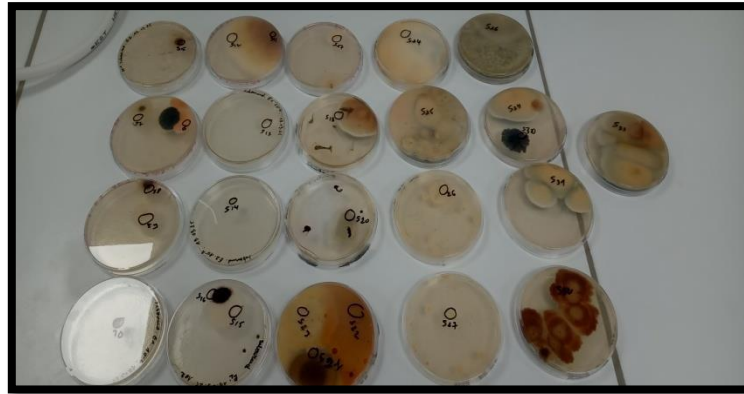


Figure 26: Isolats fongiques obtenus sur milieu Sabouraud + chloramphénicol.



Figure 27: Purification des champignons

2. Résultats du test d'Antagonisme sur Milieu MH

Les résultats de l'effet antagoniste des champignons étudiés par la technique de croisement vertical ont révélé une inhibition de la croissance des *S. epidermidis* par 06 souches fongiques parmi les 25 isolats.

Les souches S2, S7, S10, S11, S12 et S32 ont montré une activité antagoniste remarquable à l'égard de *S. epidermidis*.

Les pourcentages d'inhibition correspondants sont représentés dans la figure 28.

Par ailleurs, les zones d'interaction observées entre les deux souches fongiques les plus actives et la souche testée de *S. epidermidis* sont illustrées dans la figure 29.

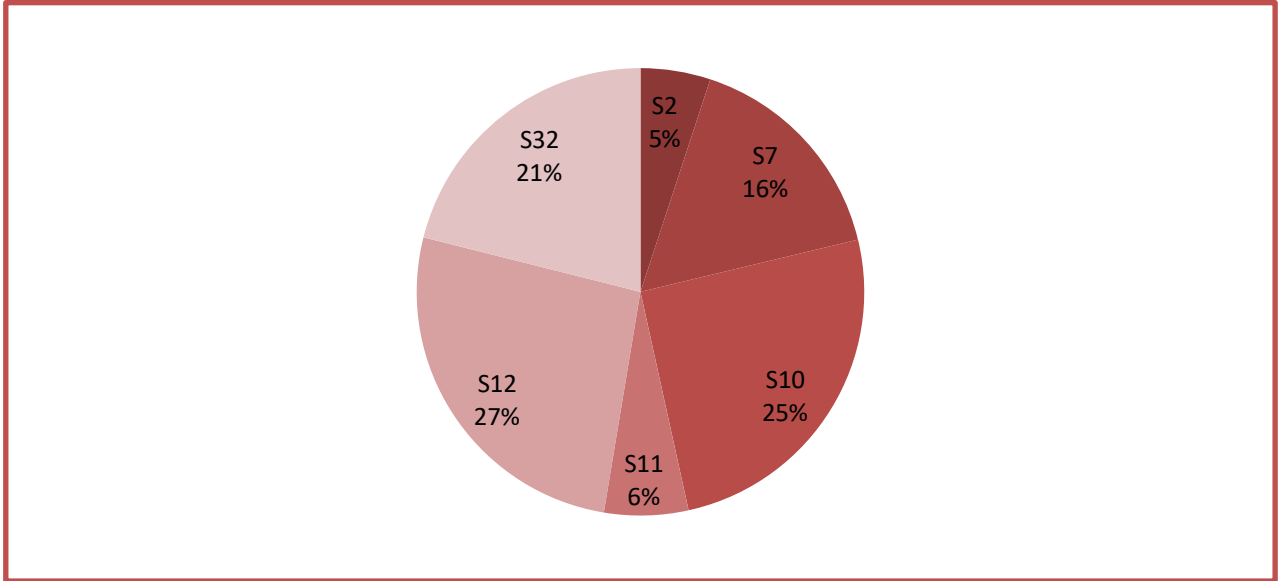
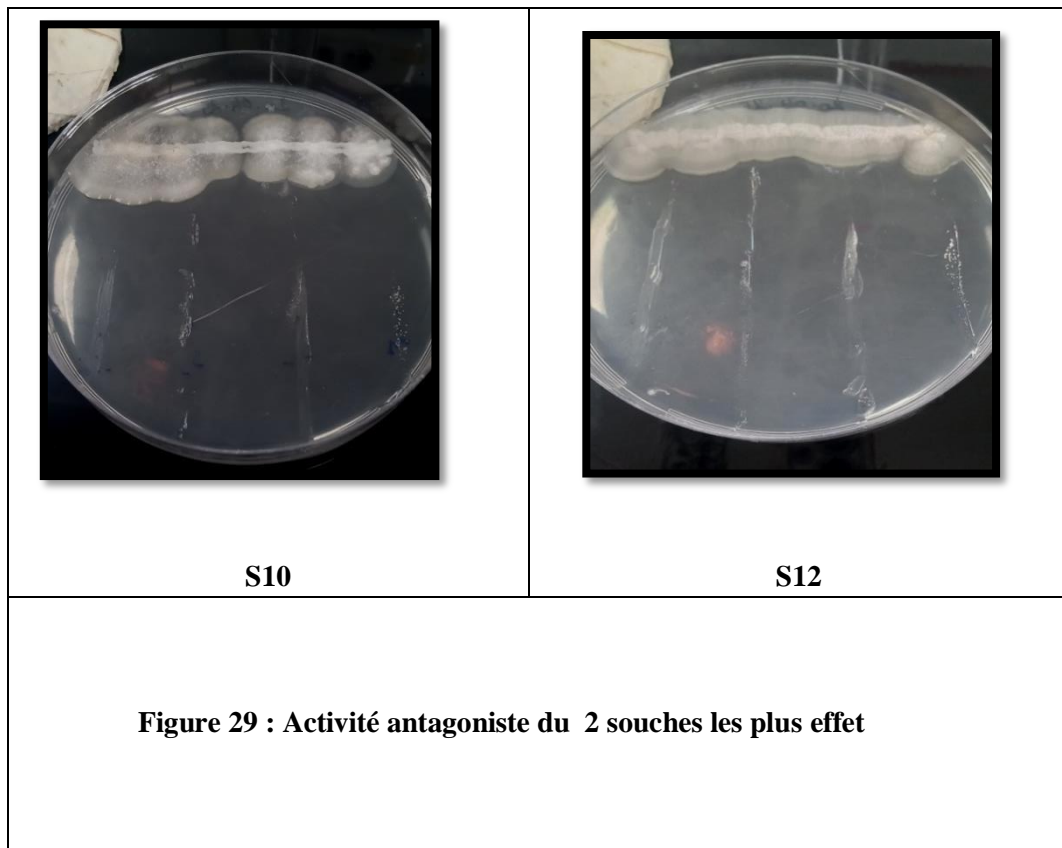


Figure 28: pourcentages d'inhibition des activités antagonistes des champignons vis-à-vis de *Staphylococcus epidermidis*





3. Identification des isolats sélectionnés

3.1. Etude macro et microscopique

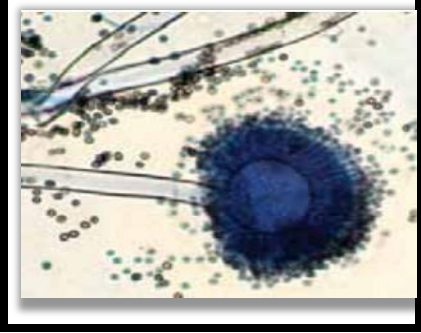

L'examen microscopique des 06 isolats présentant une activité antagoniste et purifiés sur milieu sabouraud., a permis de les identifier comme appartenant au genre *Aspergillus*. l'isolat n° 12 s'est distingué par une forte activité antagoniste lors des tests *in vitro*. Cet isolat a été sélectionné pour une identification plus poussée. L'analyse morphologique et microscopique a permis de l'identifier au stade de l'espèce, en tant que *Aspergillus niger* (tableau 6).

Tableau 6: Aspect macroscopique de *Aspergillus niger*

Espèce	recto	reverse
<i>Aspergillus niger</i>	<p>Thalle blanc cotonneux au début, devient jaunes, et enfin marron grisâtre granuleux au centre, et blanc cotonneux à la périphérie, de forme irrégulière.</p> 	<p>jaune</p> 

L'identification a été réalisée conformément à la méthode décrite par Salvamani et Nawawi (2014) qui repose sur l'analyse détaillée des structures de sporulation, incluant les hyphes, les conidiophores et les spores (tableau 7).

Tableau 7: Aspect microscopique d'Aspergillus niger

L'espèce	Description	Aspect microscopique
<p><i>Aspergillus niger</i></p>	<p>Hyphe : Septés.</p> <p>Conidiophore: Lisse, brunâtre dans sa moitié supérieure.</p> <p>Phialides: bisériées sur la vésicule par l'intermédiaire de métules disposées sur tout de porteur de la vésicule.</p> <p>Conidies: globuleuse, brunes.</p> <p>Tête aspergillaire : bisériée radiée, noire à maturité.</p>	 <p>abasse <i>et al.</i>, 2002)</p> 

III Extraction des métabolites secondaires à partir d'*Aspergillus niger* marin isolé

La production de métabolites secondaires par l'isolat *Aspergillus niger* a été effectuée sur milieu MH, suivie d'une extraction à l'aide d'acétate d'éthyle.

L'extraction du métabolite produit par cet isolat, présentant une activité antagoniste marquée, a conduit à l'obtention d'un résidu sec de couleur marron foncé, d'une masse totale de 32,4 mg (Fig. 30).

L'extrait brut a ensuite été utilisé pour la préparation d'une solution de métabolites. À cet effet, 10 mg de l'extrait ont été dissous dans 1 mL de l'extrait ont été dissous dans 1 mL de DMSO (fig 31).



Figure 30: masse totale de l'extrait brute.



Figure 31: concentrations 100%de la Solution de l'extrait fongique.

1. Évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait d'*A. niger***1.1. Effet antistaphylococcique par la méthode de diffusion sur disque**

L'extrait a été testé pour son activité antimicrobienne contre *S. epidermidis* en utilisant la méthode de diffusion par disque sur milieu gélosé MH.

C'est une technique qualitative basée sur la détermination du diamètre des zones d'inhibition apparentes autour des disques chargés par l'extrait fongique testé.

Les résultats obtenus montrent que l'extrait d'*A. niger* présente une activité antistaphylococcique, comme le montre la figure 32.

Des zones d'inhibition claires ont été observées autour des disques imprégnés de la solution de l'extrait, avec des diamètres compris entre 8,9 et 19,35 mm (Fig. 33).

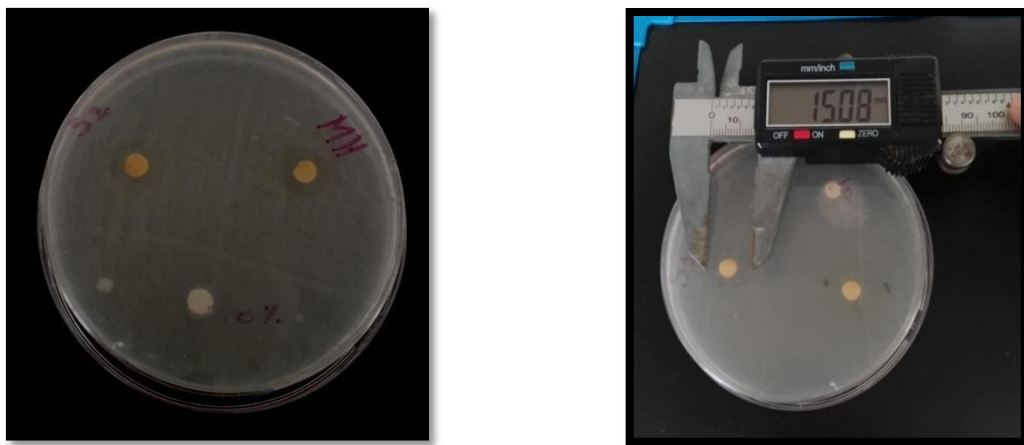


Figure 32: Activité antistaphylococciques de l'extrait d'*A.niger*

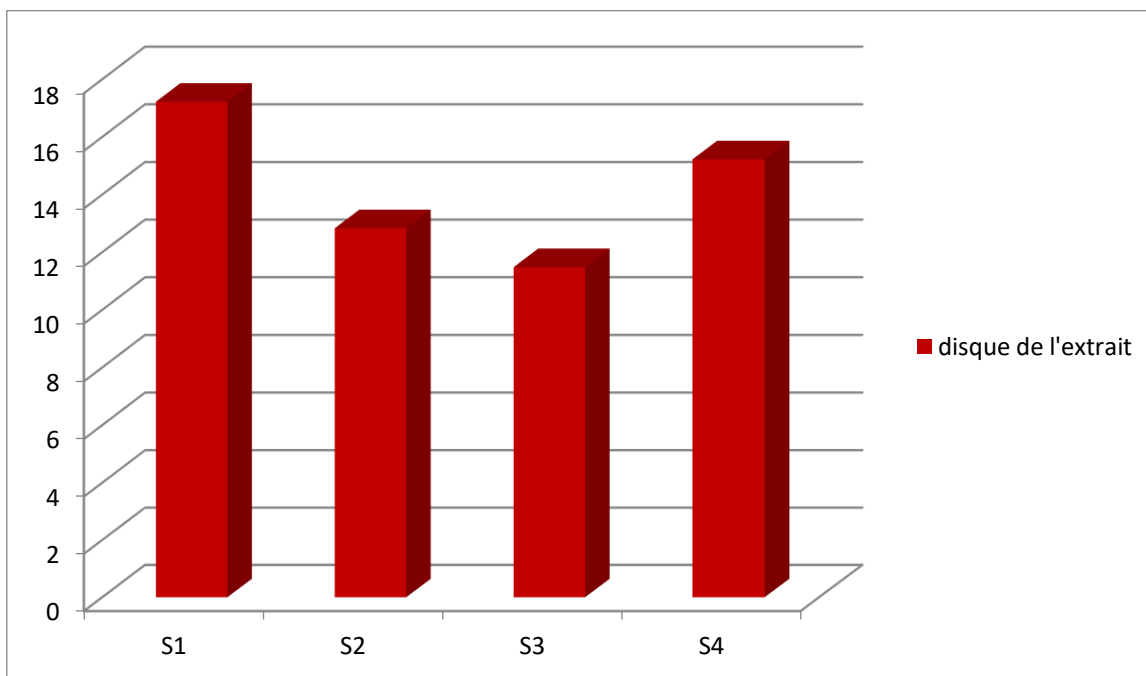


Figure 33: Zones d'inhibition exercées par l'extrait d'*A.niger* à l'encontre des souches de *S. epidermidis*

À partir des résultats présentés dans les figures 32 et 33, l'activité antibactérienne a été évaluée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des disques imprégnés d'extrait du champignon marin *Aspergillus niger* vis-à-vis de *S. epidermidis*.

Après 24 heures d'incubation à 37 °C, la présence des zones d'inhibition indique une activité antibactérienne positive.

Ces résultats suggèrent que cet isolat fongique est capable de produire des molécules bioactives inhibant la croissance de *S. epidermidis*.

1.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

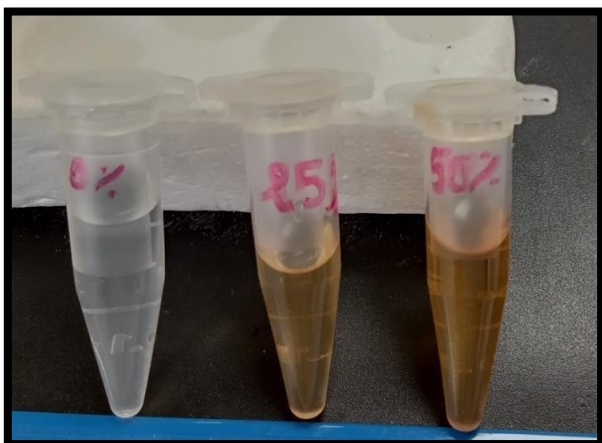


Figure 34: solution du test de CMI d'extrait d'*A. niger*

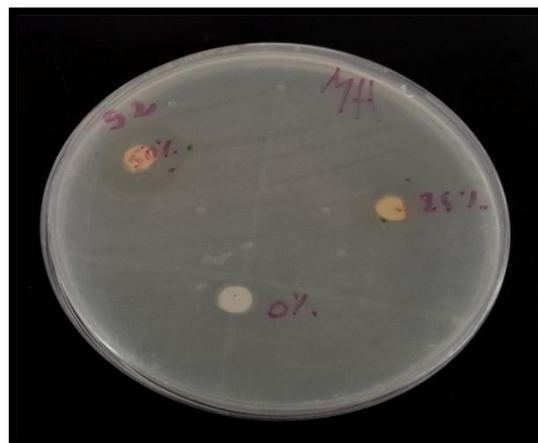


Figure 35: test de CMI d'extrait d'*A. niger*

Pour déterminer la CMI, des dilutions successives ont été effectuées pour obtenir des concentrations de

50 %, 25 % et 0 % (fig. 34).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est un paramètre fondamental permettant d'évaluer la sensibilité d'une bactérie à un métabolite.

Elle correspond à la plus faible concentration capable d'inhiber la croissance bactérienne.

Les résultats obtenus après 24 h d'incubation à 37 °C (fig. 35) montrent une zone d'inhibition de 17 mm autour du disque de l'extrait d'*A. niger* dilué à 50 %.

En revanche, aucune zone d'inhibition n'a été observée à la concentration de 25 %, en comparaison avec les disques témoins utilisés pour chaque isolat de *Staphylococcus epidermidis*.

Ainsi, la concentration minimale inhibitrice de l'extrait d'*A. niger* est estimée à **50 %**, soit **5 mg/mL**.

1.3 Effet de l'extrait d'*A. niger* sur la formation de biofilm dans des tubes en verre

Dans notre étude, l'extrait d'*Aspergillus niger* a montré une activité antibiofilm, avec une réduction significative de la formation de biofilm comprise entre **38 %** et **59 %**.

Staphylococcus epidermidis n'était pas considéré comme un agent pathogène opportuniste avant la généralisation de l'utilisation des dispositifs médicaux.

La formation de biofilms peut donc être considérée comme un facteur de virulence et une stratégie adoptée par *Staphylococcus epidermidis* pour augmenter son potentiel infectieux (Hall-Stoodley et al., 2004).

✓ Calcul de l'inhibition du biofilm (Rasouli *et al.*, 2020)

Inhibition % = $(DO_{\text{Contrôle Négatif}} - DO_{\text{expérimental}}) / DO_{\text{Contrôle Négatif}} \times 100$.

Tableau 8: résultats de l'inhibition du biofilm.

souches	S1	S2	S3	S4
Inhibition%	40%	59%	38%	58%

Ces résultats ont révélé une inhibition de la formation de biofilm allant de modérée à significative (40 à 59 %), en fonction des souches de *Staphylococcus epidermidis*.

Discussion :

Dans la présente étude, les colonies isolées des cavités nasales sur milieu Chapman ont été examinées par des observations macroscopiques afin de déterminer l'aspect de *Staphylococcus epidermidis*. Nos résultats sont en accord avec ceux de plusieurs auteurs, qui ont montré que *Staphylococcus epidermidis* se présente sous forme de colonies arrondies, non pigmentées, sans changement de couleur du milieu Chapman (Aryal, 2022).

L'observation microscopique a révélé que *S. epidermidis* apparaît sous forme de coques à Gram positif, de 0,8 à 1 µm de diamètre, isolées, en diplocoques, en courtes chaînettes ou, plus classiquement, en amas. L'aspect en grappe constitue d'ailleurs leur caractéristique la plus typique (Becker *et al.*, 2014).

Staphylococcus epidermidis est un commensal majeur de la peau et des muqueuses, fréquemment présent dans les cavités nasales dès la naissance, où il contribue à l'équilibre du

microbiote. Bien qu'ordinairement non pathogène, il peut devenir opportuniste en milieu hospitalier, notamment via la formation de biofilms sur les dispositifs médicaux (Becker *et al.*, 2014). Certaines souches produisent aussi des molécules inhibant *Staphylococcus aureus*, suggérant un rôle protecteur au sein de la niche nasale (Igyártó *et al.*, 2011 ; Janek *et al.*, 2016). Ce double rôle, bénéfique et pathogène, fait de *S. epidermidis* un acteur clé du microbiote et des infections nosocomiales.

Tous les *Staphylococcus epidermidis* testés se sont révélés producteurs de catalase. Cette enzyme permet d'hydrolyser le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau, ce qui se manifeste par un dégagement de bulles gazeuses (Hart et Shears, 1997).

Aucune coagulation du plasma n'a été observée dans le tube contenant les *S. epidermidis* testés, ce qui confirme son statut de coagulase négatif. Le test de coagulation du plasma a permis de distinguer clairement les deux espèces. Une coagulation rapide du plasma sanguin a été observée dans le tube contenant des colonies de *Staphylococcus aureus*, indiquant la production de l'enzyme coagulase et confirmant son caractère coagulase positif.

Par ailleurs, les résultats des tests de sensibilité aux antibiotiques ont montré une résistance marquée de *S. epidermidis* à l'oxacilline et à l'azithromycine (100 %), tandis que les isolats étudiés restent sensibles à d'autres antibiotiques.

Dans le cadre de cette étude, deux méthodes de détection des biofilms ont été comparées :

la méthode du tube à essai avec coloration au cristal violet, et la méthode utilisant le rouge Congo (RCA). Les résultats ont montré que les quatre souches testées étaient capables de former un biofilm, confirmant leur potentiel de virulence. En effet, la production de polysaccharides et la capacité de formation de biofilms sont reconnues comme des facteurs importants de virulence chez *Staphylococcus epidermidis* ainsi que chez d'autres staphylocoques à coagulase négative (SCN) (Akinkunmi *et al.*, 2014).

Le slime, matrice extracellulaire qui facilite la formation de biofilms, est considéré comme l'un des principaux déterminants favorisant l'adhérence des bactéries aux surfaces médicales (Hrv *et al.*, 2016). Dans cette optique, la méthode au rouge Congo s'est révélée être une technique simple, économique, sensible et spécifique, adaptée au dépistage en laboratoire clinique des souches productrices de slime. Par ailleurs, la méthode standard de coloration au cristal violet

appliquée aux biofilms formés dans des tubes a permis une évaluation quantitative de la biomasse formée, ainsi qu'une analyse de la cinétique de formation des biofilms par les souches étudiées

(Djordjevic et al., 2002). *Staphylococcus epidermidis*, bien que commensal cutané, est reconnu comme une cause majeure d'infections nosocomiales, en particulier liées aux dispositifs médicaux (cathéters, prothèses articulaires, valves cardiaques). Son aptitude à former des biofilms, combinée à une fréquence élevée de souches résistantes à la méthicilline (SERM), complique considérablement sa prise en charge thérapeutique (Otto, 2009)

Une approche complémentaire a été explorée, portant sur l'exploitation des champignons marins en tant que source de métabolites bioactifs à potentiel antistaphylococcique. L'isolement de 25 isolats fongiques du sable marin a conduit à la constitution d'un ensemble de souches fongiques, majoritairement affiliées au genre *Aspergillus*. ceci est en accord avec des travaux cités dans la littérature qui affirme que les champignons du genre *Aspergillus* sont couramment retrouvés dans les environnements marins côtiers, notamment dans les sables de plage, où ils jouent un rôle écologique important. Des études réalisées sur les plages d'Oran (Algérie) ont permis d'isoler diverses espèces telles que *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. terreus* et *A. versicolor*, représentant jusqu'à 13,3 % de la mycoflore totale du sable marin (Benmessaoud, 2010).

L'évaluation de l'activité antagoniste de différents isolats fongiques à l'égard de *Staphylococcus epidermidis* a permis de sélectionner 06 souches fongiques parmi les 25 isolats et de choisir par la suite l'isolat le plus inhibiteur des staphylocoques étudiés. Cet isolat présentant des caractéristiques morphologiques compatibles avec *Aspergillus niger*. D'après Chabasse *et al* (2002), L'*Aspergillus niger* : est caractérisé par une culture à mycélium blanchâtre à jaunâtre au début puis granuleuses noires après sporulation. Les conidies sont globuleuses, brunes et échinulée sa conidiophore lisse, brunâtre dans sa moitié supérieure et très longue. Les têtes aspergillaires sont bisériées avec des métules-phialides tout autour d'une vésicule ronde. Les conidies sont de couleur brune, sphérique et parfois côtelée.

L'extraction des métabolites secondaires produits par cet isolat a conduit à l'obtention d'un extrait bioactif, induisant une inhibition de la croissance les quatre *Staphylococcus epidermidis*

testés, avec des zones d'inhibition atteignant jusqu'à 19,35 mm selon la méthode de diffusion sur disque.

Al-Shaibani *et al.* (2013) ont rapporté des zones d'inhibition de 15 à 30 mm contre *S. aureus* et *S. epidermidis*, via des extrait de *A. niger* souche clinique., en fonction de la souche testée et de la méthode employée. Par ailleurs, d'après Kalyani et Hemalatha (2017) ont observé pour *A. niger* des zones entre 11 et 18 mm à 100 µg/ml. Nos résultats sont donc à la fois comparables et légèrement supérieurs, ce qui suggère une activité antibactérienne prometteuse, cohérente avec ce qui était attendu à cette concentration.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de l'extrait d'*Aspergillus niger* a été déterminée par une série de dilutions successives de l'extrait. Une inhibition de la croissance de *S. epidermidis* caractérisée par un diamètre de zone d'inhibition de 17 mm, a été observée à une concentration de 50 %, soit 5 mg/mL

Une dernière série d'expériences a porté sur l'évaluation de l'impact de l'extrait d'*Aspergillus niger* étudié sur la formation de biofilm par *S. epidermidis* dans des tubes en verre. Les résultats, indiquent que l'extrait a significativement réduit la formation de biofilm, avec un taux d'inhibition compris entre 38% et 59%.

Plusieurs travaux ont démontré que les *Aspergillus* marins peuvent produire des composés antifongiques et antibactériens actifs contre des pathogènes humains tels que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Salmonella Typhimurium*. Par exemple, des extraits bruts d'*A. terreus* isolé de mangroves ont montré une inhibition significative de *S.*

Typhimurium avec une zone d'ihibtion de de 8,9 mm à 2 mg/mL (Ravi *et al.*, 2024). D'autres composés comme les asperalins A–F, isolés d'*Aspergillus alabamensis*, ont affiché des activités remarquables contre des bactéries pathogènes aquatiques telles que *Edwardsiella ictaluri* et *Streptococcus iniae*, avec des concentrations inhibitrices minimales (MIC) allant de 2,2 à 87,3 µM (Kim *et al.*, 2021). Ces résultats confirment le potentiel pharmacologique des *Aspergillus* marins des zones sablonneuses, justifiant des recherches approfondies pour l'isolement et la caractérisation de leurs métabolites antibactériens.



Conclusion

Générale

CONCLUSION

L'objectif principal de ce manuscrit est d'approfondir l'étude de l'activité antibactérienne des métabolites produits par des champignons marins isolés du sable de la plage de Salamandre (Mostaganem) vis-à-vis de quatre isolats de *Staphylococcus epidermidis*. Ces isolats ont été obtenus par auto-prélèvements réalisés par deux volontaires sains appartenant au personnel du laboratoire, puis identifiées à l'aide de techniques microbiologiques standards.

L'évaluation du profil de résistance aux antibiotiques des isolats de *Staphylococcus epidermidis* a révélé une résistance complète (100 %) à l'oxacilline et à l'azithromycine, tandis qu'une sensibilité a été observée vis-à-vis des autres antibiotiques testés.

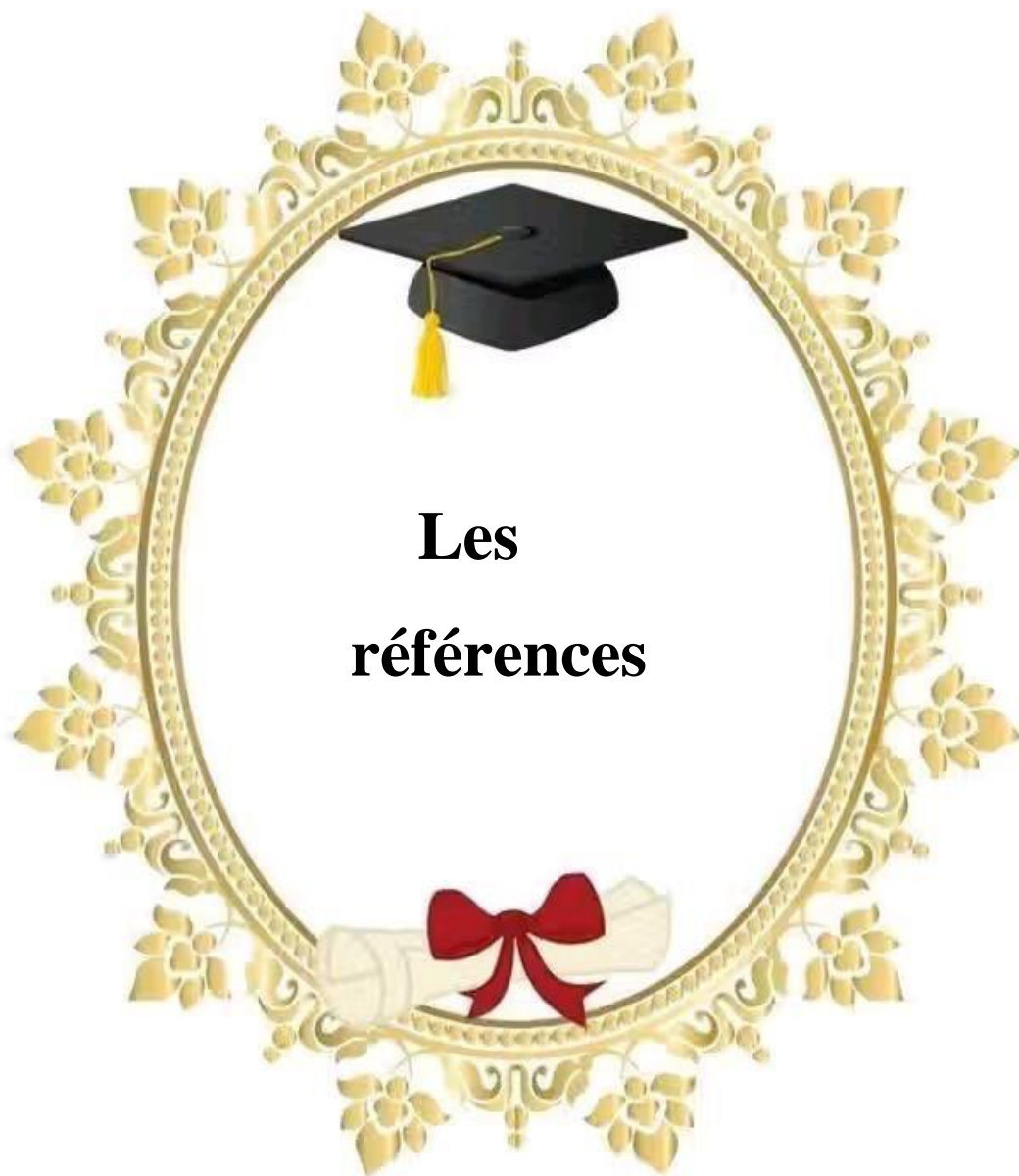
Ces résultats mettent en évidence la nécessité de développer de nouvelles alternatives antimicrobiennes, notamment à partir de sources naturelles peu exploitées, telles que les microorganismes marins.

Les études de la formation du biofilm ont été réalisées par la technique TM avec utilisation de coloration au cristal violet, et la technique de RCA. Les résultats de nos expériences ont montré que les 04 isolats de *S. epidermidis* sont formatrices de biofilm et productrices de slime.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles alternatives antimicrobiennes, une approche complémentaire a été explorée dans cette étude en ciblant les champignons marins comme source potentielle de métabolites antistaphylococciques. Vingt-cinq isolats fongiques ont été obtenus à partir de sable marin, dont six ont montré une activité antagoniste considérable, contre *Staphylococcus epidermidis*. L'isolat le plus actif, identifié morphologiquement comme *Aspergillus niger*, a produit un extrait bioactif inhibant la croissance des quatre souches testées, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 19,35 mm. La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée à 5 mg/mL (50 %), produisant une zone d'inhibition de 17 mm. Par ailleurs, l'extrait a significativement réduit la formation de biofilm, avec un taux d'inhibition variant entre 38 % et 59 %.

À la fin et en perspectives, des études complémentaires pourraient être menées pour caractériser par des méthodes chimiques (par chromatographie, spectrométrie de masse, RMN, etc.)

L'extrait d'*Aspergillus niger* afin d'identifier les composés responsables de l'activité antistaphylococcique observée. , nous suggérons aussi une variété de recherches *in vitro* et *in vivo* pour lutter contre les infections nosocomiales et les biofilms en utilisant des techniques de biologie moléculaire et physico-chimiques.



**Les
références**

Références Bibliographiques

- A. Zatout, R. Djibaoui ,A. Kassah-Laouar ,C. Benbrahim. Coagulase negative staphylococci in Anti-Cancer Center, Batna, Algeria: antibiotic resistance pattern, biofilm formation, and detection of *mecA* and *icaAD* genes. / African Journal of Clinical and Experimental Microbiology / Vol. 21 No. 1 (2020) / Articles
- Abdelmohsen, U. R., Cheng, C., Viegelmann, C., Zhang, T., Grkovic, T., Ahmed, S., ... & Hentschel, U. (2017). Marine fungalmetabolites: Sources of antimicrobial and cytotoxicactivities. *Marine Drugs*, 15(5), 129. <https://doi.org/10.3390/md15050129>
- Abdulkawi Ali Al-FakihaandWaelQasemAbdulgabbarAlmaqtri. Overview on antibacterial metabolitesfromterrestrial *Aspergillus* spp.*Mycology*. 2019; 10(4): 191–209.
- Al-Shaibani, A. B. A., Al-Shakarchi, F. I., & Ameen, R. S. (2013). Extraction and characterization of antibacterial compound from *Aspergillus niger*. *Al-Nahrain Journal of Science*, 16(4), 167–174
- Annabel Braem, Nur Hidayatul Nazirah Kamarudin,Nitu Bhaskar,Zoya Hadzhieva,Andrea Mele,Jérémy Soulié, show all.Biomaterial strategies to combat implant infections: new perspectives to old challenges. *J Mater Sci Mater Med*. 2023
- Aryal, S. (2022, 9 juillet). *Staphylococcus epidermidis* – Aperçu. *Microbe Notes*. Récupéré de <https://microbenotes.com/staphylococcus-epidermidis/>
- Aubry, B. (2019). *Détection de la pénicillinase du Staphylococcus epidermidis : comparaison de méthodes phénotypiques* (Mémoire pour le diplôme d'études spécialisées en biologie médicale, Université d'Angers). Soutenu le 26 septembre 2019.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926.
- Benmessaoud, N. (2010). *Biodiversité fongique du sable de quatre plages (Beau Séjour, Eden, Les Andalouses, Madagh)*. Mémoire de Magistère, Université d'Oran 1.
- BIANCHI. V, NICOLAS. B, EL ANBASSI. S, (2003). *Bactériologie-virologie*. Éd : paris, 41:27 ,101.

- Biokar Diagnostics. (2016). *Bouillon nutritif* (Fiche technique BOUILLON NUTRITIF_FR_V6). Allonne, France: Biokar Diagnostics. Formulation conforme aux directives du Journal officiel du 8 août 1972 pour la recherche d'un pouvoir inhibiteur intrinsèque des produits cosmétiques.
- Botton B., Breton A., Févre M., Gauthier S., Gyp P., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J.J., vayssier Y., Veau P.(1990) Moisissures utiles et nuisible, Importance industrielle. Ed. Masson, Paris.
- Bouchet P. H.,Guignard J. L., Villard J. (1999). Les champignons, mycologie fondamentale et appliqué Ed. masson, paris. 194p.
- BOUCHET P., GUIGNARD J.L., VILLARD J. 1999. Les champignons Mycologie fondamentale, Masson Paris.
- Calvez Th .2009. Diversité et fonctions écologiques des champignons en écosystème hydrothermal marin profond. These de doctorat Biologie ,Université dE Rennes 1,11.
- CHABASSE D. (2008). Classification des champignons d'intérêt médical. Encycl Méd Chir (Editions scientifiques et Médicales Elsevier SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-088-B-10, 9p.
- Chabasse D., Bouchara J.P., Gentil L. 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation N°25. Biologie médicale. Paris. éd bioforma 230 bd Rspail 75014.
- Chabasse D., Bouchra J.P., Gentile L., Brun S et Penn P. (2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, France. Laboratoire d'analyses de biologie médicale. 159p.
- Christensen G.D, Simpson W.A, Younger J.A, Baddour L.M, Barrett F.F, Melton D.M and Beachey E.H. (1985). Adherence of coagulase negative Staphylococci to plastic tissue cultures:a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol.* 22: 996–1006.
- Connie R.M, Donald C.L (2019) *Textbook of diagnostic microbiology*. Elsevier Saunders,6th ed. ISBN: 978-0-323-48218-9.
- DELARRAS. C, (2014). *Pratique en microbiologie de laboratoire. Recherche de bactéries et de levure-moisissures*. 2éme édition Lavoisier, p : 633, 634.

- Diongue kh. Etude Épidémiologique mycologique et molécule des champignons isolés au CHU le Dantec de Dakar de 2014 à 2017. These de doctorat en parasitologie et mycologie, université Cheikh anta diop de Dakar, 12-13 -17-18.
- Djordjevic D., Wiedmann M. and Mclandsborough L.A. (2002). Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Applied And Environnemental Microbiology; Vol. 68, No. 6 : 2950– 2958.
- Dugat M . 2014. Apport de la spectrométrie de la masse et de la biologie moléculaire à l'identification des champignons filamenteux au laboratoire de Mycologie Médicale. These de doctora en Médecine, université de Limoges, 7.
- Encyclopaedia Britannica (2025, 10 avril). Ascomycota. Dans Encyclopaedia Britannica. Consulté le 17 juin 2025, de <https://www.britannica.com/science/Ascomycota>.
- ERIKSSON O.E. (1997). Supraordinal taxa of Ascomycota. Myconet, 1, 1-16.
- Freeman D. J., Falkiner F. R.,et keane C.T. (1989). Newmethod for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. Journal of Clinical Pathology. 42:872-874.
- Genevès L., 1992-Biologie Végétale : thallophytes et micro-organismes, Dunod . Paris, 159p.
- Ghosh, S., Mishra, P., et Dey, N. (2021). Marine microorganisms as a promising source of bioactive compounds against multidrug-resistant pathogens. Microbial Pathogenesis, 152, 104618. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104618>
- Gillespie S.H, Hawkey P.M (2006) *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. England: John Wiley & Sons Ltd, 2nd ed. ISBN-13 978-0-470-84976-7.
- Gôtz F., Bannerman T., and Schleider K.-H. (2006) The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. *Prokaryotes*, 4:5-75.
- Grosjean J, Clavé D, Archamband M, Pasquier C, (2016). Bactériologie et virology pratique. De Boeck, Belgique.
- Hawksworth D.L. 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. *Mycological Research*. 95: 641-655.
- Hawksworth D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 105: 1422-1432.

- Hazalin N., Ramasamy K., Lim S., Wahab I., Cole L. and Abdul Majeed A. (2009) Cytotoxic and antibacterial activities of endophytic fungi isolated from plants at the National Park, Pahang, Malaysia. *BMC Complementary and Alternative Medicine*.p: 46.
- He, M.-Q., Zhao, R.-L., Liu, D.-M., Denchev, T. T., Begerow, D., Yurkov, A., Kemler, M., Millanes, A. M., Wedin, M., McTaggart, A. R., Shivas, R. G., Buyck, B., Chen, J., Vizzini, A., Papp, V., Zmitrovich, I. V., Davoodian, N., & Hyde, K. D. (2022). Species diversity of Basidiomycota. *Fungal Diversity*, 114(1), 281–325. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00497-3>
- Houis f . 2011. Les champignons de la famille des tricholomatacées source d'innovation thérapeutique ?. Thèse de doctorat en Pharmacie , université de Nantes, 10.
- Igyártó, B. Z., Jenison, M. C., Dudda, J. C., Roers, A., Müller, W., & Koni, P. A. (2011). Skinresident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigenspecific T helper cell responses. *Immunity*, 35(2), 260–272.
- Jones, E. B.G., Pang, K. L., Abdel-Wahab, M. A., Scholz, B., Hyde, K. D., Boekhout, T., Ebel, R., Rateb, M. E., Henderson, L., Sakayaroj, J., Suetrong, S., Dayarathne, M. C., Kumar, V., Raghukumar, S., Sridhar, K. R., Bahkali, A. H.A., Gleason, F. H., & Norphanphoun, C. (2025, 11 juin). *An online resource for marine fungi*. MarineFungi.org. Consulté le 17 juin 2025, de <http://marinefungi.org>
- Kalyani, P., & Hemalatha, K. P. J. (2017). In vitro antimicrobial potential of *Aspergillus niger* (MTCC-961). *International Journal of ChemTech Research*, 10(4), 430–435.
- KARA TERKI I (2014), Caractérisation et évaluation de la formation de biofilm de souches de staphylocoques isolées de sondes urinaires chez des patients hospitalisés au CHU de Tlemcen, Thèse du doctorat, Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen (Algérie), 132 p.
- Kim, D. H., Lee, D. S., & Lee, Y. M. (2021). Asperalins A–F, antibacterial alkaloids from a marine-derived *Aspergillus alabamensis*. *Marine Drugs*, 19(9), 467.
- KIRK P.M., MINTER D.W, STALPERS J.A. 2008. Dictionnaire des champignons 10ème éd. Wallingford, royaume –uni : CABI, 599.
- Landemaine, L., Orvain, C., Croyal, M., Khammari, A., Nguyen, J. M., Dreno, B., &Corvec, S. (2023). *Staphylococcus epidermidis* isolates from atopic or healthy skin have opposite effect on

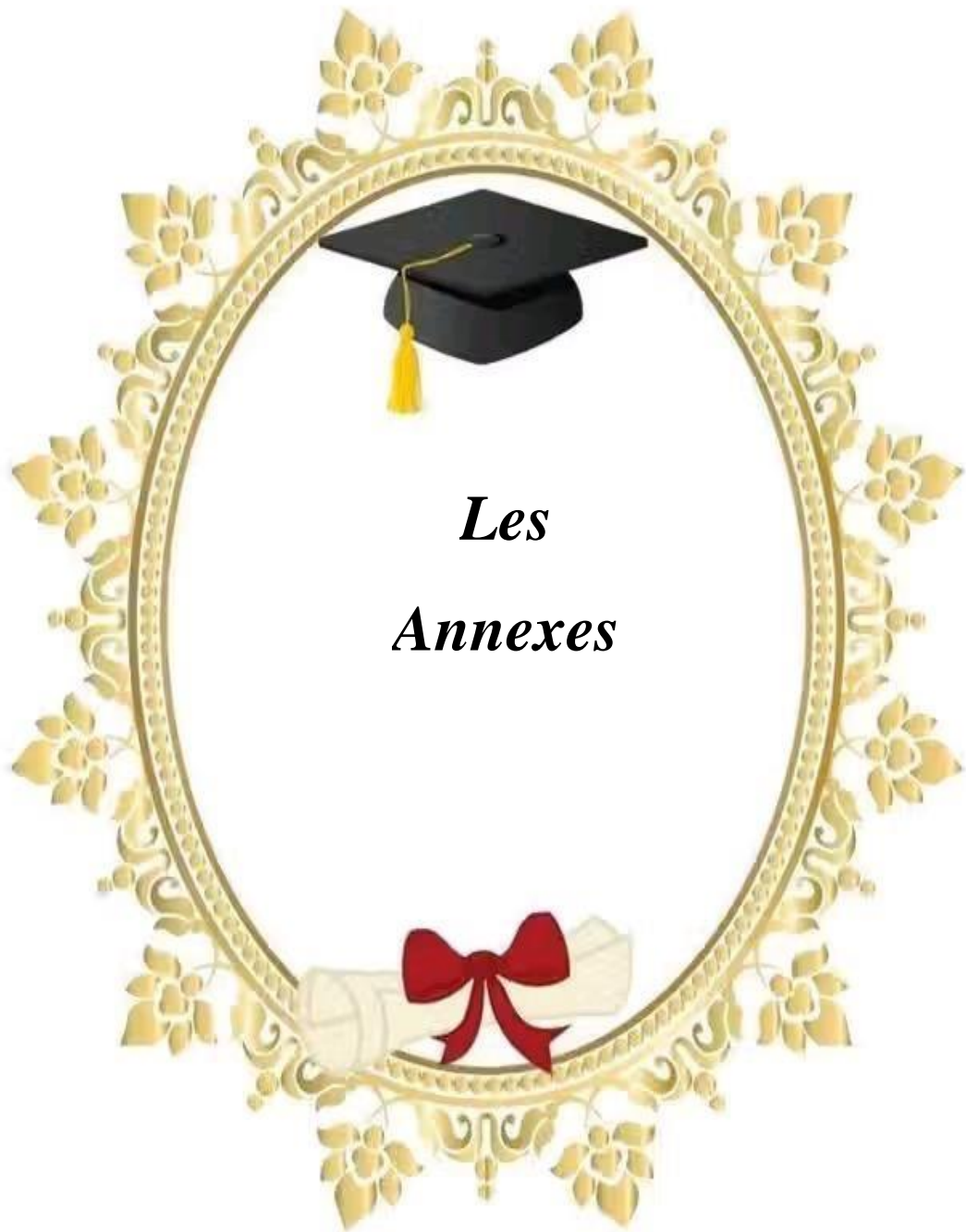
skin cells: potential implication of the AHR pathway modulation. *Frontiers in Immunology*, 14, 1098160. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098160>

- LANIER L., JOLY P., BONDOUX P., BELLEMERE A. 1978. *Mycologie et pathologie forestière tome 1*, Mycologie forestière édition Masson.
- LANOTTE. P, MEREGHETTI. L, QUENTIN. R, (2011). *Bactériologie médicale Technique usuelles*, 2ème édition, Masson, Paris, Démarche de l'examen bactériologique, 158p.
- Lattab A. (2018). Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *Pseudomonas aeruginosa* (Doctoral dissertation, Université de Mostaganem-Abdelhamid Ibn Badis)
- Lee, E., & Anjum, F. (2023, April 27). Staphylococcus epidermidis infection. In StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. PMID 33085387.
- Lodge D.J. (1996a). microorganismes. In Reagan, D,P, and R.W.Waide (eds.), the food web of a tropical rain forest. University of Chicago Press, Chicago, 53-108.
- Lopez C .1998. isolement identification et physiologiques des champignons thermophiles en vue de la production lipase par fermentation en milieu solide. These de doctorat en biochimie et biologie moléculaire , université de Montpellier II ,23.
- Lowy, F. D., & Hammer, S. M. (1983). Staphylococcus epidermidis infections. *Annals of Internal Medicine*, 99(6), 834–839. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-99-6-834>
- MacFaddin, J. F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mayer K.F.X., Waugh R., Langridge P., Close T.J., Wise R.P., Graner A., Matsumoto T., Sato K., Schulman A., Muehlbauer G.J. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 1, 145-160.
- Mekhloufi, O. A. (2018). Recherche des staphylocoques à coagulase positive dans les aliments de restauration à Alger et caractérisation moléculaire des facteurs de virulence (Mémoire de magister, Université Ibn Khaldoun, Tiaret).
- Meradji, A. (2024, octobre). Introduction à la Mycologie [Notes de cours, Faculté de médecine, Université Constantine 3]. Université Saleh Boubnider Constantine 3.

- Minich, A., Levarski, Z., Mikulášová, M., et al. (2022). Complex analysis of vanillin and syringic acid as natural antimicrobial agents against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1816.
- Mueller G.M., Schmit J.P.(2007). Fungal biodiversity : what do we know ? what can we predict? *Biodiversity conservation*.16:1-5.
- Nageleisen I M . Dominique P. Xavier S.F . Philippe R .N . 2010 .La santé des forêts CNPFIDE, France ,120.
- Nasraoui B. (2015). Les champignons et pseudo-champignons pathogenes des plantes cultivees. Tunisie. Institut National Agronomique de Tunisie. 180p.
- O'gara J. P. and Humphreys H. (2001) *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *J Med Microbio.*, 50, 582-587.
- Otto M. (2013) Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annu Rev Med.*, 64,175-88.
- Otto M. *Staphylococcus epidermidis*—the “accidental” pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555–567.
- Overy, D. P., Jones, E. B. G., Kettner, A., Knox, D., Sivonen, K., Egan, S & Rämä, T. (2019). The neglected marine fungi, sensu stricto, and their isolation for natural products discovery. *Marine Drugs*, 17(1), 42. DOI:10.3390/md17010042.
- Plages d’Algérie. (n.d.). Plages de la commune de Mostaganem. Jimdo. Récupéré le 16 juin 2025, de <https://plagesalgerie.jimdofree.com/les-plages/wilaya-de-mostaganem/plages-de-lacommune-de-mostaganem>.
- Quero L . 2018 . Développement de la spectrométrie de masse Maldi-TOF pour l’identification des champignons filamenteux d’intérêt alimentaire et étude de leur résistance aux molécules biocides. These de doctorat en Ecologie et Géosciences et Agronomie et Alimentation ,Université De Bretagne Occidentale , 10.
- Rasouli, R., Navidinia, M., Shams Ghahfarokhi, M., Vahabpour Roudsari, R., Adabian, S., & Baghestani, A. R. (2020). Antibiofilm activity of cellobiose dehydrogenase enzyme (CDH) isolated from *Aspergillus niger* on biofilm of clinical *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 15(1), e90635.

- RAVEN P H., EVERT R F., EICHHORN. 2008. Biologie végétale Boeck université 2 édition p 261-286.
- Ravi, R., Rajendran, P., & Arumugam, G. (2024). Antibacterial activity of endophytic fungi from mangroves. *Asian Journal of Mycology*, 7(1), 15–25.
- Sardin S . M . 2016. études physiologiques et moléculaires de l'adaptation des mucor aux matrices fromagères . Thèse de doctorat en microbiologie , université de bretagne occidentale, 9 .
- Simon É. 2020 . Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongiques. These de doctorat en biologie médicale, université de Rouen Normandie UfR santé département pharmacie, 28.
- Sistek V, (2010). Identification des staphylocoques, streptocoques et entérocoques par des méthodes génotypiques. Thèse de Doctorat. Université Laval, Québec.
- Société Française de Microbiologie (2024) : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie : Recommandations 2024 V.1.0 Juin. In : CASFM / EUCAST : Société Française de Microbiologie 177 pages.
- Tabuc, C. (2007, décembre 6). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. 18à22. Toulouse, l'université de Bucarest.
- Taylor J.W., Jacobson D.J., Kroken S., Kasuga T., Geiser D.M., Hibbet D.S., Fisher M.C. 2000. Phylogenetic species recognition and species concept in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 31: 21-32.
- Taylor J.W., Spatafora J., O'Donnell K., Lutzoni F., James T., Hibbett D.S., Geiser D., Bruns T.D., Blackwell M. 2004. The Fungi. In *Assembling the Tree of Life* (Joel Cracraft, Michael J. Donoghue eds). Oxford University Press.
- Thibault Maurice ; Tweddell Russell J . 2016 . Champignons Moléculaire bioactives d'intérêt Médical et pharmacologiques . Lise Morin . Canada , 1 .
- TORTORA J., FUNK B.F. and CASE CH.L. 2003. introduction à la microbiologie, ISBN. Canada.
- Vuong C. and Otto M. (2002) *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microb Infect.*, 4, 481-489.

- Wei, L., Zhang, Q., Xie, A., Xiao, Y., Guo, K., Mu, S., Xie, Y., Li, Z., & He, T. (2022, 11 juillet). Isolation of bioactive compounds, antibacterial activity, and action mechanism of spore powder from *Aspergillus niger* xj (Frontiers in Microbiology, 13, Article 934857).
- WHITE M.M, JAMES T.Y, O'DONNELL K, CAFARO M.J, TANABE Y ET SUGIYAMA J. 2006. Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data. Mycologia. Vol (98) N°6: 872-884.
- <https://lejournaldumedecin.pmg.be/fr/actualite/s-epidermidis-redoutable-mais-connu/articlenormal-35591.html>



*Les
Annexes*

Annexe 1

« Matériel »

✓ Pour la réalisation de ce travail nous avons utilisé divers matériel :

Appareillages	les vererries et outils	Produits et réactifs
<ul style="list-style-type: none"> -Etuve de 37°C et 28°C. -Réfrigérateur -Une balance. -Balance de précision - Bain marie. -Vortex. -Centrifugeuse -Spectrophotomètre -Microscope optique. -Agitateur magnétique + plaque chauffante -autoclave 	<ul style="list-style-type: none"> -Bec bunsen. -Une spatule -Les boîtes de pétri. -Pipettes pasteur. -Les embouts. -Micropipette 100 µL et 1000 µL. -Flacons en verre -Cuve à électrophorèse -Anses de platine. -Lames et lamelles. -Tubes à essais. -Portoirs. -Erlenmeyer -Bécher -Eprouvette graduée -Papier de Wattman -Pincés -Ecouvillons -Filtre -Les disques vierges -couteau stérile -eppendorfs -seringue - pied à coulisse 	<ul style="list-style-type: none"> -Eau distillée stérile. -Eau physiologique stérile. -Eau oxygéné pour le test Catalase. -Produits de coloration de Gram (Violet de Gentiane, Lugole, Fushine, Ethanol , Huile d'immersion).

Annexe 2

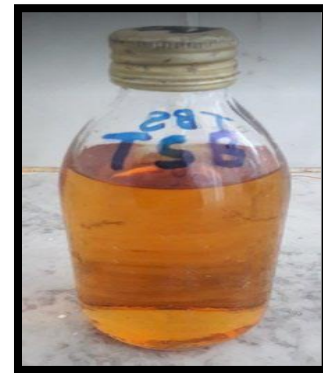
« Milieux de culture »

✓ Composition des milieux de cultures :

Gélose Mueller-Hinton (MH)	
extrait de viande de bœuf	2g
Peptone de caséine	17.5g
Amidon	1.5g
Agar	15g
Eau distillée	1L



Bouillon Tryptone Soja (TSB)	
Peptone de caséine	5.1g
Peptone	0.9g
Glucose	0.75g
NaCl	1.5g
K₂HPO₄	0.75 g
Eau distillée	300 ml



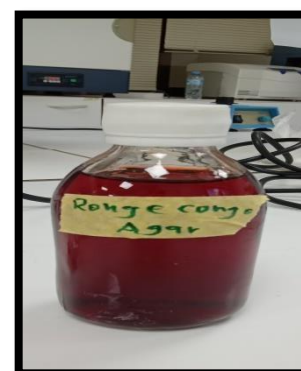
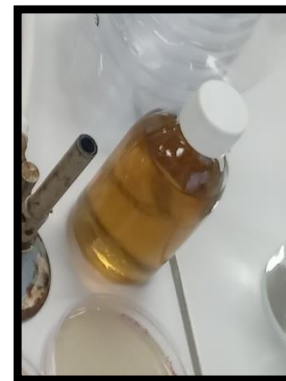
Gélose Nutritive

(GN)	
Peptone	5g
Extrait de viande	3g
Chlorure de sodium	5g
Agar	15g
Eau distillée	1L



Gélose Sabouraud au Chloramphénicol

Peptone de caséine	05g
Peptone de viande	05g
Glucose	40g
Chloramphénicol	0.5g
Agar	15g
Eau de mer filtré	1L



Rouge Congo Agar (RCA)	
BHIB	5.55g
Saccharose	7.5g
Rouge Congo	0.12g
Agar	2.25g
Eau distillée	150mL

Gélose de Chapman	
Peptones	10g
Extrait de viande	3g
Chlorure de sodium	70g
Mannitol	10g
Rouge de phénol	0,005g
Agar	15g
Eau distillée	1L




✓ Les solvants

L'eau physiologique :

- Chlorure de Sodium.....9g
- Eau distillée1000 mL

Annexe 3

La coloration de Gram est effectuée en plusieurs étapes :

 **Préparation d'un frottis bactérien :**

- Avec une pipette pasteur stérile, prélever dans la zone stérile du bec une colonie bactérienne de la boîte de pétri.
- Les diluer dans une goutte d'eau distillé sur une lame propre, ne pas trop étaler.
- Fixer le frottis à la chaleur de la flamme du bec Bunsen.

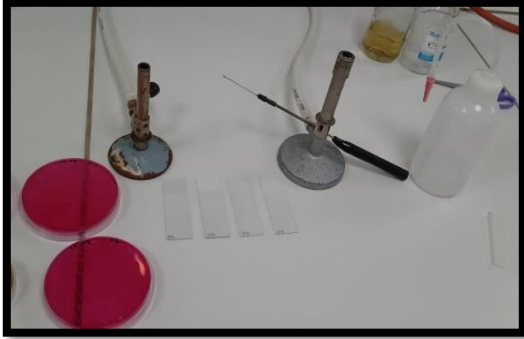
 **Coloration**

- Couvrir le frottis fixé de solution de Violet de Gentiane, laisser agir 1minute, puis rincer à l'eau de robinet.
- Recouvrir le frottis avec le lugol pour la fixation, laisser agir 1min, puis rincer à l'eau.
- Décolorer avec l'alcool (95%), pendant 30 seconds, et puis rincer à l'eau.
- Recolorer avec la fuchsine, pendant 1minute, puis rincer à l'eau. **(Lanotte et al, 2011).**
- Sécher entre deux feuilles de papier filtre, puis à la chaleur.
- Examiner au microscope optique a l'objectif à immersion (x100).

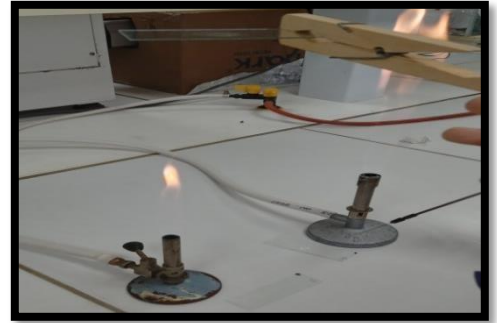
 **Lecture :**

- Gram (+) : les bactéries colorées en violet.
- Gram (-) : les bactéries apparaissent en rose.

1. Préparation d'un frottis bactérien



2. Fixation



3. coloration



4. observation microscopique

Annexe 4

Tableau 9: valeur critiques des diamètres des zones d'inhibition pour Staphylocoques (CASFM, 2024)

Antibiotiques	Symbole du disque	Charge des disques (µg)	Moyenne de diamètres mesurés (mm)	Diamètres Critiques (mm)	
				S ≥	R <
Amikacine	AK	30	21.08	15	15
Gentamicine	GN	10	32.77	22	22
Chloramphénicole	C	30	26.81		
Rifampicine	RA	5	41.48	28	28
Tobramycine	TOB	10	27.20	20	20
Oxacilline	OX	1	/	25	25
Streptomycine	S	300	32.40		
Nitrofurantoïne	F	300	23.78		
Azithromycine	AZM	15	11.21		

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس - مستغانم -
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرقي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،
الطالب(ة): بعلي حلينة
رقم التسجيل الجامعي: 202037031739
الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم : 110020984002390001
والصادرة بتاريخ: 04/01/2025
عن بلدية عشعاشة - مستغانم
المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم علوم بيولوجية
شعبة ..ميكروبيولوجي / التخصص : ميكروبيولوجيا التطبيقية
والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

**Etude de l'effet antagoniste de quelques champignons marins
sur Staphylococcus epidermidis**

أصرح بشرقي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية
المطلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ: 2025/06/29

إمضاء المعني

* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 28 جويلية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة عبد الحميد بن باديس-مستغانم-
كلية علوم الطبيعة والحياة

تصريح شرفي خاص بالالتزام بقواعد النزاهة العلمية
لإنجاز البحث

أنا الممضي أدناه،

الطالب(ة):

نورين حياة..... رقم التسجيل الجامعي:.....2020370341.....

الحامل لبطاقة التعريف الوطنية رقم:.....412587814... والصادرة بتاريخ:

..... 2024. 08. 28.....

عن..بلدية سيدي علي. مستغانم.....

المسجل بكلية علوم الطبيعة والحياة / قسم

البيولوجيا.....

شعبة.....مكروبيولوجيا...../.....

التخصص.....ميكروبيولوجيا التطبيقية.....

والمكلف بإنجاز مذكرة ماستر بعنوان:

دراسة التأثير المضاد لعدد من أنواع الفطر البحري ضد المكورات العنقودية البشرية.

أصرح بشرفي أنني ألتزم بمراعاة المعايير العلمية والمنهجية ومعايير الأخلاقيات العلمية والنزاهة الأكاديمية الم
طلوبة في إنجاز البحث ، وأتحمل المسؤولية الشخصية عن كل
المحتوى المتضمن في البحث المذكور أعلاه .

التاريخ:

.....29.06.2025.....

إمضاء المعني



* ملحق القرار الوزاري رقم 933 المؤرخ في 22 جوانية 2016 الذي يحدد القواعد المتعلقة بالوقاية من السرقة العلمية ومكافحتها.