



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, et des Sciences de la Terre et de
l'Univers

Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)

MEMOIRE

Présenté par

AYACHE Fella

&

BENMASMOUDI Dalila Hadjer

En vue de l'obtention du diplôme de Master en Biologie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie et Contrôle de Qualité

Thème

Évaluation de l'activité antimicrobienne des moisissures et des actinomycètes marines isolées à partir des sédiments collectés de la plage de Mkhalled (Tlemcen)

Soutenue le : **30 Juin 2025**

Devant le Jury composé de :

Président : Mr. REBIAHI Sid-Ahmed	Professeur	Université de Tlemcen
Encadrante : Mr. BELYAGOUBI Larbi	Professeur	Université de Tlemcen
Examinatrice : Mme. BOUBLENTZA Nesrine	MCB	Université de Tlemcen
Invitée d'honneur : Mme. BENGUEDDA Wassila	MCA	Université de Tlemcen

Année universitaire : 2024/2025

REMERCIEMENT

Remerciement

Avant tout, nous rendons grâce à **Dieu, le Très-Haut**, pour nous avoir accordé la force, la santé et la patience nécessaires à la réalisation de ce travail.

Nous adressons nos sincères remerciements à notre encadrant, **Monsieur BELYAGOUBI Larbi**, pour sa disponibilité, ses précieux conseils et son accompagnement tout au long de la préparation de ce mémoire.

Nous remercions également **Madame BELYAGOUBI-BENHAMMOU Nabila**, pour son aimable co-encadrement, ses conseils avisés et sa disponibilité.

Nous tiendrons à remercier sincèrement les membres du jury **Monsieur REBIAHI Sid Ahmed** et **Mme. BOUBLENTA Nesrine** pour le temps qu'ils m'ont accordé, pour leurs remarques constructives et pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail.

Nos remerciements vont également à **Madame BENGUEDDA-RAHAL Wassila** pour son aide précieuse et son entière disponibilité.

Un grand merci à **l'ensemble du corps enseignant de la Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature de Tlemcen** pour la qualité de l'enseignement reçu tout au long de notre parcours universitaire.

Nous témoignons également notre reconnaissance à **toutes les personnes** qui nous ont apporté leur aide, leur soutien ainsi que leur motivation, que ce soit lors des recherches, de la rédaction du mémoire, ou tout simplement dans les moments de doute.

Enfin, nous adressons nos plus vifs remerciements à **nos familles et à nos amis** pour leur amour, leurs encouragements constants et leurs prières. Votre soutien a été, tout au long de ce travail, notre plus grande force.

Dédicace

Avant toute chose, je remercie Allah, le Tout-Puissant, de m'avoir donné la santé, la patience, l'intelligence et le courage pour réaliser ce travail, que je dédie avec tout mon cœur :

À ma mère adorée:

Pour tous vos sacrifices, votre patience et votre soutien tout au long de mes études. Vous avez toujours été là pour me reconforter. Aucun mot ne saurait suffire pour vous exprimer ma reconnaissance.

Et A mon cher Papa

Qu'Allah, le Tout-Puissant, vous accorde santé et longue vie.

À mon cher frère et à mes chères sœurs :

Amine, Siham et Imen,

Pour votre soutien constant, vos encouragements, vos conseils, votre affection et votre présence à mes côtés.

À mes nièces Aya et Razane,

pour la joie et la tendresse qu'elles m'apportent chaque jour.

À ma binôme Dalila Hadjer :

Pour son soutien et sa collaboration tout au long de ce travail.

Enfin, à l'homme qui n'a jamais dit non à mes exigences, qui sait toujours me rendre

heureuse,

mon partenaire de vie, mon cher fiancé Ibrahim.L .

Merci d'être toujours là pour moi

Fella

Dédicace

C'est avec une profonde gratitude que je dédie ce travail à toutes les personnes qui m'ont soutenue.

Je remercie sincèrement ma famille pour leur amour, leurs sacrifices et leur soutien inconditionnel qui ont été le pilier de ma réussite.

Ma reconnaissance va également à mes amies les plus chères : Nesrine, pour son soutien constant, Lamia pour ses conseils avisés, et Yasmine pour son encouragement précieux. Un merci spécial à Fatima et Khadija pour leur aide indispensable lors des travaux pratiques.

J'exprime ma gratitude à ma tante, Madame la Professeure Ghelai Fatima Zohra, pour son soutien moral tout au long de mon cursus.

Enfin, je remercie mes cousines Ismahan, Jihane et Khadidja ainsi que mes amies Boutheïna, Fella, Samira, Bouchra et Fadia, pour leur précieux appui.

Dalila

ملخص

إذا كانت البحار تغذي، فهي قادرة أيضاً على العلاج والشفاء والمساهمة في رفاهيتنا. وضمن هذه التنوع البيولوجي البحري توجد مكونات غالباً ما تكون غير مرئية: المكونات الميكروبية.

تستغل التكنولوجيا الحيوية البحرية، أو ما يُعرف بالتكنولوجيا الحيوية الزرقاء، هذه الموارد البيولوجية البحرية لتطوير تطبيقات في المجالات الطبية، والتجميلية، والبيئية، والصناعية.

في هذا الإطار، كان هدفنا عزل الفطريات والشعائيات (الأكتينوميستات) انطلاقاً من الرواسب البحرية باستخدام أوساط زراعة مختلفة (PDA)، PDA حمضي، PDA مع البنغال الوردي، CDA، CDA مع البنغال الوردي، MEA، آغار غوز، النشا، الكازين، آغار (ISP2) قمنا بعد ذلك بتقييم نشاطها المضاد للميكروبات ضد عزلات ممرضة.

تم عزل ما مجموعه سبع عزلات ميكروبية ووصفها بناءً على خصائصها العيانية والمجهريّة. وقد سمحت عملية التعريف بتمييز أجناس مثل *Aspergillus* و *Penicillium* و *Cladosporium*. أظهرت اختبارات النشاط المضاد للميكروبات، التي أجريت بطريقة الانتشار على الآغار، تثبيطاً لنمو عدة عزلات بكتيرية وفطرية ممرضة، مع مناطق تثبيط تراوحت بين 0 و 10 ملم.

تعتبر هذه الكائنات الدقيقة البحرية المستخلصة من رواسب شاطئ مخلد - تلمسان مصدرًا محتملاً للجزيئات النشطة بيولوجياً. وهي تُظهر أنشطة بيولوجية متنوعة ذات أهمية تكنولوجية وصناعية، مما يبرر الحاجة إلى مزيد من الدراسات لاستغلالها.

الكلمات المفتاحية: التكنولوجيا الحيوية الزرقاء، شاطئ مخلد، الرواسب البحرية، الفطريات، القدرة المضادة للميكروبات.

Abstract

If the sea nourishes, it can also heal, cure, and contribute to our well-being. Within this marine biodiversity lies a component that is often invisible: the microbial component.

Marine biotechnology, also known as blue biotechnology, exploits these marine biological resources to develop applications in the biomedical, cosmetic, environmental, and industrial fields.

In this context, our objective was to isolate molds and actinomycetes from marine sediments using various culture media (PDA, acidified PDA, PDA with rose bengal, CDA, CDA with rose bengal, MEA, Gause's agar, starch, casein, ISP2 agar). We then evaluated their antimicrobial activity against pathogenic strains.

In total, seven microbial strains were isolated and characterized based on their macroscopic and microscopic features. Identification revealed genera such as *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Cladosporium*. Antimicrobial activity tests performed using the agar diffusion method, showed inhibition of the growth of several pathogenic bacterial and fungal strains, with inhibition zones ranging from 0 to 10 mm.

These marine microorganisms, isolated from the sediments of Mkhalled beach in Tlemcen, represent a potential source of bioactive molecules. They exhibit various biological activities of biotechnological and industrial interest, justifying further research for their valorization.

Keywords: Blue biotechnology, Mkhalled beach, marine sediments, molds, antimicrobial potential.

Résumé

Si la mer nourrit, elle peut aussi soigner, guérir et contribuer à notre bien-être. Au sein de cette biodiversité marine se trouve une composante souvent invisible : la composante microbienne.

La biotechnologie marine, ou biotechnologie bleue, exploite ces ressources biologiques marines pour développer des applications dans les domaines biomédical, cosmétique, environnemental et industriel.

Dans ce cadre, notre objectif a été d'isoler des moisissures et des actinomycètes à partir de sédiments marins sur différents milieux de culture : PDA, PDA acidifié, PDA rose bengal, CDA, CDA rose bengale, MEA, gélose de Gause, amidon, caséine, agar ISP2).

Nous avons ensuite évalué leur activité antimicrobienne sur des souches pathogènes.

Au total, sept souches microbiennes ont été isolées et caractérisées sur la base de leurs caractéristiques macroscopiques et microscopiques. L'identification a permis de distinguer des genres tels qu'*Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*. Les tests d'activité antimicrobienne, réalisés par la méthode de diffusion sur gélose, ont montré une inhibition de la croissance de plusieurs souches bactériennes et fongiques pathogènes, avec des zones d'inhibition comprises entre 0 et 10 mm.

Ces micro-organismes marins, issus des sédiments de plage Mkhalled Tlemcen, représentent une source potentielle de molécules bioactives. Ils présentent diverses activités biologiques d'intérêt biotechnologique et industriel, justifiant des recherches complémentaires pour leur valorisation.

Mots clés : Biotechnologie bleue, Plage de Mkhalled, Sédiments marins, Moisissures, Potentiel antimicrobien.

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENT	i
Résumé	vi
TABLE DES MATIERES	vii
LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
<u>1</u> Introduction	1
<u>2</u> Généralités	3
<u>3</u> Matériel et Méthodes.....	8
<u>3.1</u> Collecte des échantillons	9
<u>3.2</u> Situation géographique.....	9
<u>3.3</u> Prélèvement des sédiments.....	10
<u>3.4</u> Isolement, purification et conservation des microorganismes	10
<u>3.4.1</u> Isolement des moisissures	10
<u>3.4.2</u> Repiquage et purification des moisissures	12
<u>3.4.3</u> Identification et observation microscopique des isolats sélectionnés :.....	12
<u>3.4.4</u> Méthode de ruban adhésif avec coloration de bleu de coton	12
<u>3.4.5</u> La microculture:.....	13
<u>3.4.6</u> Étapes de la microculture.....	13
<u>3.5</u> L'activité antimicrobienne.....	14
<u>3.5.1</u> La méthode des cylindres d'agar	14
<u>3.5.2</u> Préparation des bactéries tests :	15
<u>3.5.3</u> La technique des puits	16
<u>4</u> Résultats et Discussion.....	17

<u>4.1</u> Isolement des actinomycètes	18
<u>4.2</u> Isolement des moisissures	19
<u>4.3</u> Identification macroscopique des moisissures	20
<u>4.4</u> Identification microscopique des moisissures.....	21
<u>4.5</u> Résultats de l'activité antimicrobienne	23
<u>5</u> Conclusion.....	27
Références biographiques	29
Annexes	34

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Evolution du nombre de molécules marines décrites par an (Navarri, 2016).	4
Figure 2 : repartition des nouveaux metabolites secondaire identifiées entre 2000 et 2024 selon les types de milieux marins	7
Figure 3 : Photo de la plage Mkhalled	9
Figure 4 : Situation géographique de plage de Mkhalled	10
Figure 5 : : schéma explicatif du principe de scotch test.....	13
Figure 6 : Nombre des souches isolées par milieu de culture.	21
Figure 7 : les zones d'inhibition observées sur les souches <i>Bacillus subtilus</i> et <i>Candida albicans</i>	24

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Métabolites secondaires des champignons marins	5
Tableau 1.2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne	15
Tableau 1.3 : Des codes : Les souches identifiées avec définition et description macro et microscopique	19
Tableau 1.4 : Activité antimicrobienne des moisissures.....	23

Introduction

Introduction

L'environnement marin offre un réservoir encore peu exploré de micro-organismes, présentant un fort potentiel pour la production de métabolites secondaires bioactifs (**Bredholt et al., 2008**). Le milieu marin représente un réservoir exceptionnel de biodiversité microbienne, offrant un potentiel considérable pour la découverte de nouvelles molécules bioactives. Ces composés présentent des activités thérapeutiques variées (antibactériennes, antifongiques, antitumorales, anti-inflammatoires), ainsi que des applications en cosmétique et en biotechnologie industrielle. Grâce à leur originalité structurale et fonctionnelle, ils constituent une réponse prometteuse aux défis actuels en matière de santé et d'environnement (**Imhoff et al., 2011**).

La biotechnologie marine en Algérie constitue un domaine émergent et encore peu exploité, malgré un littoral s'étendant sur plus de 1200 kilomètres et une biodiversité marine remarquable. Les écosystèmes côtiers algériens, notamment les sédiments marins, renferment une grande diversité de micro-organismes encore largement sous-explorée. Ces ressources microbiennes présentent un fort potentiel biotechnologique pour le développement de produits à haute valeur ajoutée dans les domaines pharmaceutique, cosmétique, agricole et environnemental (**Ksentini, 2024**).

Dans ce vaste réservoir de biodiversité, les micro-organismes marins occupent une place de plus en plus centrale dans les recherches en biotechnologie durable. En effet, près de 60 % des nouveaux produits naturels marins découverts ces dernières années proviennent de micro-organismes (**Carroll et al., 2019**) c'est un domaine multidisciplinaire qui s'attache à valoriser les organismes marins en vue de créer des produits ou services bénéfiques pour l'humanité. Cette biodiversité est dotée de caractéristiques uniques façonnées par des conditions environnementales particulièrement rigoureuses (**Parte et al., 2017**).

C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à évaluer l'activité antimicrobienne des moisissures et des actinomycètes issus de sédiments marins qui sont récoltés du mois de février 2025.

Notre travail a été divisé en trois parties :

- La première partie concernant l'étude bibliographique, comprend: des généralités
- La deuxième partie reporte la description du protocole expérimental
- La troisième partie portera sur l'interprétation des résultats obtenus et leur discussion et conclusion

Généralités

Généralités

Les océans couvrent environ les trois quarts de la surface terrestre et abritent la majorité des espèces vivantes, représentant entre 50 % et 80 % de la biodiversité mondiale (Choudhary et al., 2017). La biotechnologie bleue s'appuie sur cette biodiversité pour développer des applications innovantes dans divers secteurs (Boyen & Pascal Jaouen, 2015).

Le microbiome marin constitue une ressource inestimable et encore largement inexploitée. Il abrite des milliards de gènes codant pour une immense diversité de petites molécules, de protéines, de lipides et d'autres composés bioactifs aux fonctions écologiques multiples, dont beaucoup présente un potentiel considérable pour le développement de nouvelles solutions thérapeutiques.

Parmi ces composés, un grand nombre présentent des activités antimicrobiennes contre des bactéries multi résistantes, ainsi que des propriétés anticancéreuses, ciblant de manière sélective les cellules tumorales tout en préservant les cellules saines. Des molécules telles que la trabectédine, isolée à l'origine d'un tunicier marin (*Ecteinascidia turbinata*), ou encore la salinosporamide A, issue d'un actinomycète marin (*Salinispora tropica*), ont démontré des activités anticancéreuses prometteuses et font l'objet d'essais cliniques avancés (Newman & Cragg, 2016).

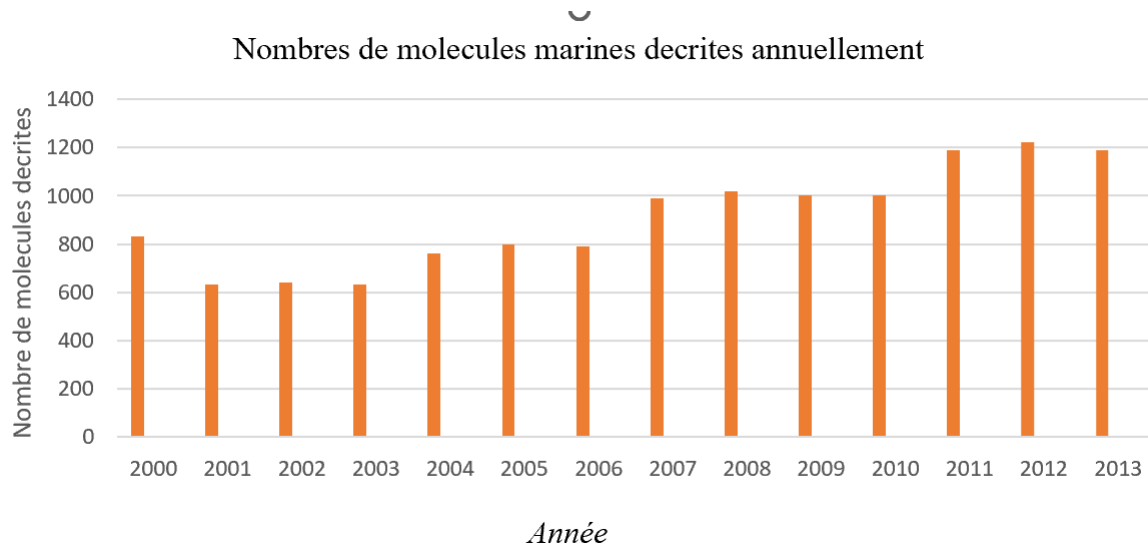


Figure 1 : Evolution du nombre de molécules marines décrites par an (Navarri, 2016).

Généralités

Les sédiments marins se forment par l'accumulation progressive de particules minérales, organiques et biogéniques au fond des océans. Véritables réservoirs de nutriments, de

Les sédiments marins, en tant que réservoirs de contaminants et de communautés microbiennes, constituent un habitat riche et complexe, abritant une biodiversité encore peu explorée (**Hoshino et al., 2020**). Les milieux marins, façonnés par les interactions dynamiques entre les conditions physico-chimiques et les espèces qui les peuplent, jouent un rôle essentiel dans la régulation du climat et influencent de nombreuses activités humaines (**Raghukumar, 2017**). Parmi les organismes saprophytes dominants figurent les moisissures, des micromycètes filamenteux capables de se développer sur une grande variété de substrats. Ces champignons se répartissent en deux principaux groupes (**Hamidou et al., 2016**). Bien que la majorité des espèces fongiques soient présentes dans les écosystèmes marins, leur répartition diffère sensiblement de celle observée en milieu terrestre (**Sylvain, 2019**). Les champignons marins sont particulièrement intéressants en biotechnologie, car ils produisent de nombreux métabolites secondaires — des molécules de faible poids moléculaire — aux propriétés bioactives. Leur potentiel dans la production d'antibiotiques est prometteur, avec plusieurs composés actifs contre des souches résistantes, telles que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) (**Xu et al., 2015**)

Tableau 1. 1 : Métabolites secondaires des champignons marins

Métabolite secondaire	Espèce de champignon marin	Activité biologique	Référence
Pestalotiopsolide A	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	Anticancéreuse	Xu et al., 2010
Scopararane A	<i>Scopulariopsis sp.</i>	Antibactérienne	Liu et al., 2010
Penicillide	<i>Penicillium sp.</i>	Cytotoxique, antifongique	Zhou et al., 2018
Alternariol	<i>Alternaria sp.</i>	Antiprolifératif, génotoxique	Flewelling et al., 2015
Gliotoxin	<i>Aspergillus fumigatus (marin)</i>	Immunosuppresseur, cytotoxique	Scharf et al., 2012
Mycophenolic acid	<i>Penicillium</i>	Immunosuppresseur	Bills et al., 2009

Généralités

	<i>brevicompatum</i>		
Trichodermamide A	<i>Trichoderma sp.</i> (isolé marin)	Antitumorale	Zhang et al., 2009
Chaetoglobosin A	<i>Chaetomium globosum</i> (marin)	Antitumorale, antifongique	Huang et al., 2012

Certains composés marins ont montré une efficacité contre des cancers résistants, mais leur développement, exemplifié par le plinabulin, reste long et complexe. **(Mohanlal et al., 2018).**

Les champignons marins sont une source prometteuse pour découvrir de nouvelles molécules bioactives et développer des applications en médecine, biotechnologie et industrie grâce à leurs composés originaux, Les sédiments marins, représentent des habitats riches en champignons au fort potentiel biotechnologique **(Raghukumar, 2016).**

Les actinobactéries marines représentent une source prometteuse de produits naturels aux structures chimiques complexes, capables de manifester une grande diversité d'activités biologiques constituent une ressource de grande valeur pour de nombreux secteurs industriels, en raison de leur fort potentiel à contribuer à l'amélioration de plusieurs aspects de la vie humaine **(Boublenza, 2022 ; Law et al., 2020).**

Les actinomycètes marins représentent une source majeure de métabolites secondaires bioactifs (figure 1).

Généralités

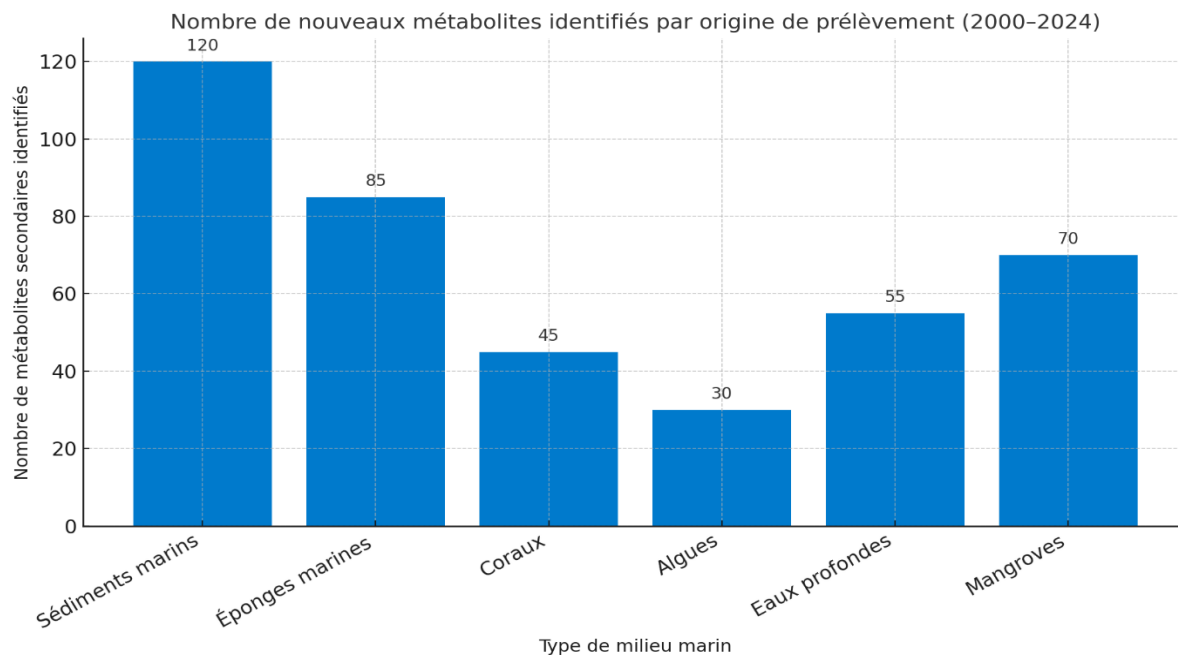


Figure 2 : Répartition des nouveaux métabolites secondaires identifiés entre 2000 et 2024 selon les types de milieux marins **Blunt et al. (2022)**.

Leur grande diversité et leur potentiel thérapeutique en font des cibles clés dans la recherche de nouveaux médicaments, notamment à partir de milieux comme les sédiments marins. Les avancées en biotechnologie et en culture microbienne permettent aujourd'hui d'explorer plus efficacement leur richesse chimique encore largement inexploitée (**Subramani & Aalbersberg, 2012**).

Matériel et Méthodes

Matériel et Méthodes

3.1 Collecte des échantillons

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire la recherche des Produits Naturels (LAPRONA).

Ce travail vise à isoler et identifier des moisissures ainsi que des actinomycètes à partir d'échantillons de sédiments marins, et à évaluer l'activité antimicrobienne des métabolites qu'ils produisent. L'objectif principal de cette étude est de valoriser le potentiel biotechnologique des champignons filamenteux des milieux sédimentaires, notamment leur aptitude à synthétiser des composés bioactifs à propriétés antimicrobiennes.

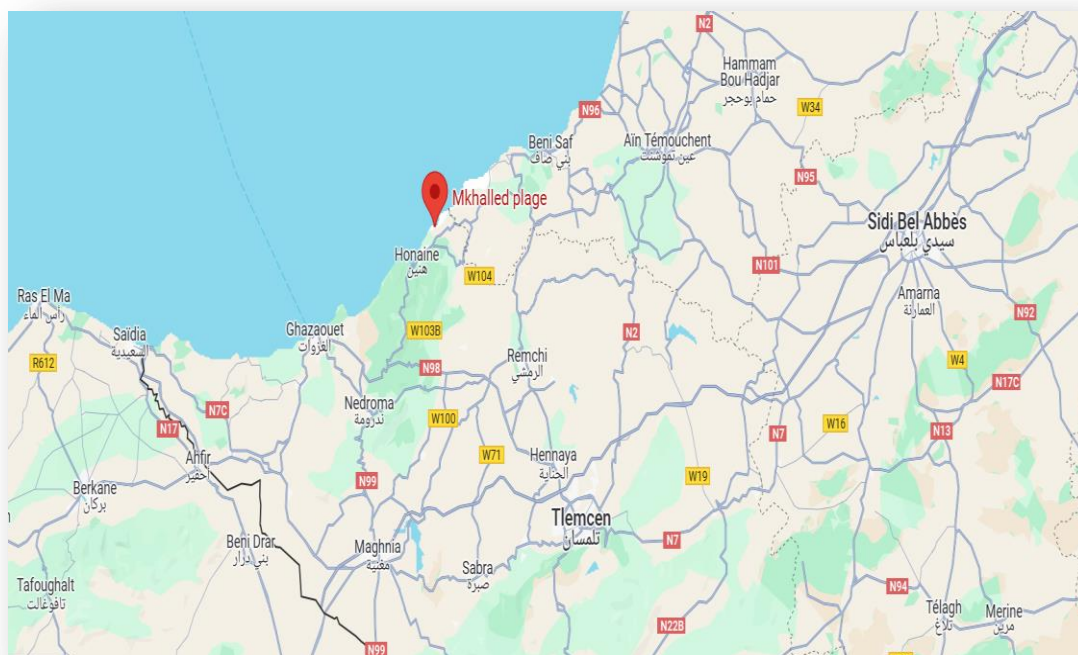
Les sédiments analysés ont été prélevés sur la plage de Mkhalled, située dans la wilaya de Tlemcen (Algérie).



Figure 3 : Photo de la plage Mkhalled (Photo personnelle prise par Belyagoubi, 2025)

3.2 Situation géographique

Plage Mkhalled l'Est du port de Honaïne Honaine dans la Wilaya de Tlemcen Algérie. Elle est localisée à environ 60 km au nord-ouest de la ville de Tlemcen et à 120 km à l'ouest de Sidi Bel Abbès, dans la commune de Béni Khelad, relevant de la daïra de Honaïne (**Direction des Services Agricoles de Tlemcen, 2020**).




 : Zone d'échantillonnage

Figure 4 : Situation géographique de plage de Mkhalled (**Google Maps, 19/06/2025**).

3.3 Prélèvement des sédiments

La collecte des sédiments a été réalisée manuellement. Les prélèvements ont été effectués dans des conditions aseptiques. Les échantillons ont été conservés dans des sacs en plastiques stériles.

3.4 Isolement, purification et conservation des microorganismes

3.4.1 Isolement des moisissures

Les isolements ont été effectués par la méthode de suspension-dilutions. Après la création d'une zone stérile, on prépare la suspension mère en mélangeant 10g de suspension des sédiments dans 90 mL d'un mélange de 45 mL de l'eau de mer avec 45 mL d'eau distillée stérile ($\text{NaCl } 9 \text{ g.L}^{-1}$) ce qui représente la dilution 10^{-1} . Après homogénéisation à l'aide d'un vortex, on réalise des dilutions décimales dans l'eau de mer stérile jusqu'à 10^{-9} (**Boublenza,**

Matériel et Méthodes

2022). Puis on étale 1000 μL de chaque dilution à l'aide d'un râteau en verre à la surface des milieux de culture pour l'isolement des moisissures nous avons utilisé les géloses :

PDA, PDA acidifié., PDAar, CDA, CDAr, MEA.

Des boîtes de Pétri contenant les milieux : PDA, PDAac., PDAr, CDA, CDAr et MEA (voir Annexe II) sont ensemencées avec 1mL des dilutions, le surnageant est éliminé après 10 à 15mn ; et l'incubation dure 5 à 7j à $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

L'ajout de l'acide lactique (25%) ou du rose bengal à raison de 1 à 1,5ml par flacon ($\approx 200\text{ml}$) empêche le développement des bactéries. De plus, le rose bengal ralentit la croissance des moisissures à croissance rapide et donne plus de chance d'isoler les moisissures à croissance lente.

Pour l'isolement des actinomycètes, on met en suspension 10g de sédiments dans 90 mL d'eau de mer/distillée 50%/50% (V/V), ce qui représente la dilution 10-1. Après homogénéisation au vortex, on réalise des dilutions décimales dans l'eau de mer jusqu'à 10-5 (**Boublenza, 2022 ; Belyagoubi et al., 2018**), puis on étale 100 μL de chaque dilution à la surface des milieux de culture :

la gélose ISP2, la gélose Amidon-Cascade, la gélose de Gause et gélose Trypticase de Soja (T.S.A) et le milieu TSI (triple sugar iron) contient trois glucides : le glucose, le saccharose et le lactose .

Tous les milieux utilisés dans cette étude contiennent des antifongiques : le cycloheximide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) et l'acide nalidixique (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Williams et Davies, 1965 in Bastide, 1986**). Les solutions d'antifongiques sont préparées extemporanément en acétone (cycloheximide) et en eau (nystatine). Elles sont ajoutées aseptiquement aux différents milieux après stérilisation de ceux-ci.

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement. Les colonies présentant les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur les milieux Bennett (**Bastide, 1986**). La conservation a été faite à $+4^\circ\text{C}$ dans des tubes en verre spécifiques (25x100) et à -20°C dans le glycérol à 20 % (v/v) (**Bastide, 1986 ; Kitouni, 2007**).

Matériel et Méthodes

3.4.2 Repiquage et purification des moisissures

Après un bon développement des colonies, nous avons effectué des repiquages de chaque colonie sur milieu PDAac pour purifier les champignons et minimiser les risques de contamination, jusqu'à arriver à isoler sur chaque boîte de Pétri une seule colonie d'un champignon donné. **(Guiraud, 1998)**, Les boîtes sont ensuite incubées à 28 °C pendant six jours, jusqu'à l'obtention de colonies bien développées.

3.4.3 Identification et observation microscopique des isolats sélectionnés :

La caractérisation et l'identification sommaires des isolats d'intérêt ont été faites à échelle du genre à partir des caractères cultureux (macroscopique) et morphologique (microscopique) et la capacité de produire des substances antimicrobiennes **(Compaore et al.,2016)**.

Les observations microscopiques ont été effectuées à l'aide d'un microscope optique, aux grossissements $\times 40$ et $\times 100$.

3.4.4 Méthode de ruban adhésif avec coloration de bleu de coton

L'observation microscopique des structures fongiques a été réalisée à l'aide de la méthode du scotch (ou méthode de bande adhésive transparente), selon la technique décrite par **(Samson et al., 2010)**, avec quelques adaptations.

Une bande de ruban adhésif transparent (type scotch) a été doucement appliquée sur la colonie fongique en croissance, de manière à prélever des spores et des éléments mycéliens sans trop les endommager. La bande a ensuite été délicatement retirée, puis posée sur une lame de microscope contenant une goutte de bleu de coton à 1 %, servant de colorant vital pour mieux visualiser les structures au microscope **(Samson et al., 2010)**.

Après application, une lamelle a été posée sur la préparation afin d'éviter les bulles d'air. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique à différents grossissements.

Matériel et Méthodes

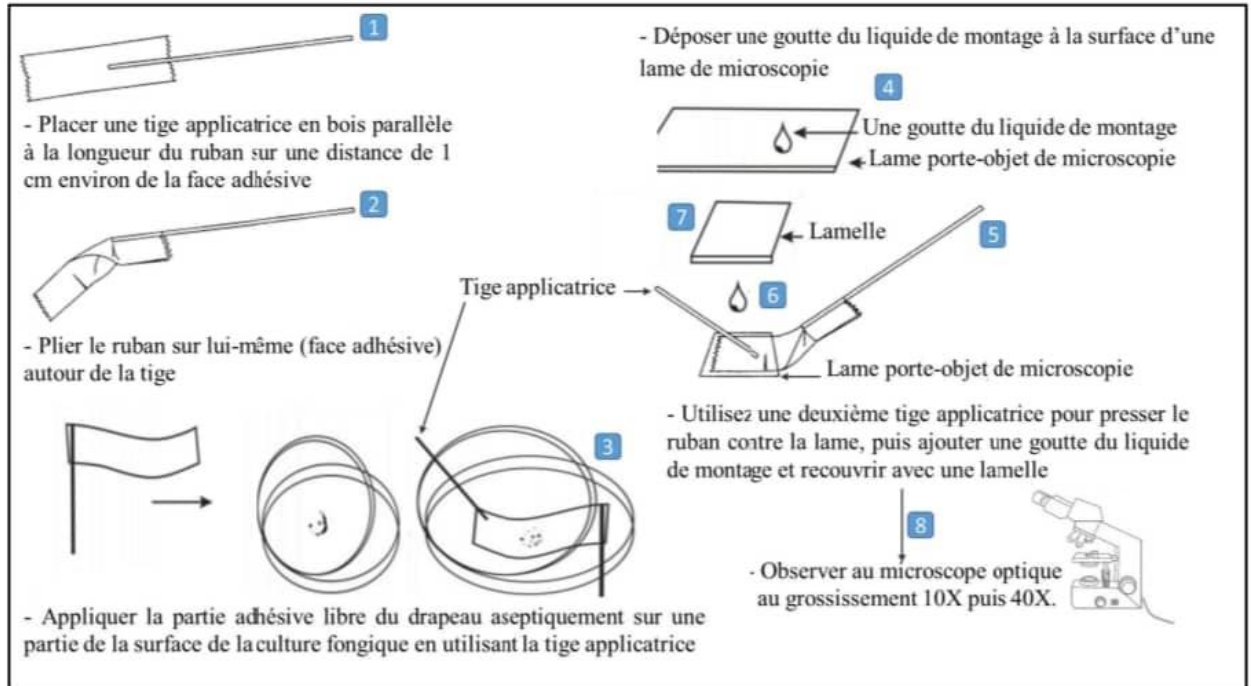


Figure 5 : Schéma explicatif du principe de scotch test (Loucif, 2022-2023) .

3.4.5 Microculture :

En examinant la croissance cellulaire à l'aide d'un microscope à travers une technique de microculture (Matallana-Surget *et al.*, 2007) c'est une méthode mycologique utilisée pour observer la morphologie des champignons filamenteux dans des conditions de croissance contrôlées, permettant une identification plus précise des genres ou espèces. Elle consiste à cultiver le champignon sur une petite lame recouverte d'un milieu gélosé (généralement Sabouraud ou PDAac), puis à observer directement les structures reproductrices (conidiophores, conidies, phialides, etc.) au microscope optique (Larone, 2011).

Cette technique permet de préserver l'organisation naturelle des structures fongiques, qui peut être altérée dans les cultures en boîte de Pétri classiques. La microculture est particulièrement utile pour l'identification des champignons filamenteux tels que *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, ou *Trichophyton* (Chabasse *et al.*, 2017).

3.4.6 Étapes de la microculture

Préparation du montage

Un petit morceau de lame de verre stérilisé ou une lamelle a été placé au centre d'une boîte de Pétri contenant un papier filtre humidifié pour maintenir une atmosphère saturée en humidité.

Matériel et Méthodes

***Inoculation**

Un petit cube (environ 1 cm²) de milieu de culture solide (généralement de la gélose Sabouraud ou PDA) a été placé sur la lamelle. Ensuite, à l'aide d'une aiguille stérile, les spores ou mycéliums de la moisissure à identifier ont été inoculés sur les quatre côtés du bloc de gélose.

Recouvrement

Une lamelle stérile a été délicatement posée sur le dessus du bloc de gélose inoculé.

Incubation

La boîte de Pétri a été fermée et incubée à température ambiante (environ 25–28 °C) pendant 4 à 7 jours, selon la vitesse de croissance de l'isolat.

***Observation**

À l'issue de l'incubation, la lamelle a été prélevée et montée entre lame et lamelle dans une goutte de bleu de méthylène pour l'observation des structures fongiques au microscope optique (×40 – ×100).

3.5 L'activité antimicrobienne

3.5.1 La méthode des cylindres d'agar

Les isolats de moisissures ont été inoculés en stries serrées sur la surface d'un milieu PDA, puis incubés à 25°C pendant environ 7 jours. Des boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton pour les bactéries et le milieu sabouraud pour le champignon *Candida sp* ont été ensemencées en surface avec la souche bactérienne cible, à l'aide d'un écouvillon stérile imbibé d'une suspension bactérienne homogène. Cette opération vise à assurer une répartition uniforme des bactéries sur l'ensemble de la surface du milieu. Ensuite, des cylindres de 6 mm de diamètre sont prélevés à l'aide d'un emporte-pièce (**Pazhanimurugan et al., 2012**) Enfin, la boîte a été placée à 4°C pendant 2 heures pour favoriser la diffusion des substances. (**Kitouni, 2007**) Les boîtes sont ensuite incubées à 37 °C pendant 24 heures. À l'issue de cette incubation, les zones d'inhibition formées autour des cylindres sont mesurées (**Belyagoubi et al., 2018**).

Matériel et Méthodes

3.5.2 Préparation des bactéries tests :

Souches microbiennes utilisées :

Dans le cadre de l'évaluation de l'activité antimicrobienne des isolats fongiques, des souches de référence microbienne ont été utilisées en tant qu'organismes tests. Pour chaque bactérie-test, un inoculum a été réalisé à partir d'une culture de 24 h, mis en suspension dans le milieu (**Belyagoubi et al.,2018**)

Les souches sélectionnées sont répertoriées dans le tableau ci-dessous, avec leurs principales caractéristiques :

Tableau 1.2 : Souches utilisées dans les différents tests d'activité antimicrobienne

	<i>Microorganismes</i>	Gram	Code
Bactéries	<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 29213
	<i>Bacillus subtilus</i>		ATCC 6633
Bactéries	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Négatif	ATCC 27853
			ATCC 35218
	<i>Escherichia coli TEM</i>		
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		ATCC 700603
Levure	<i>Candida albicans</i>		ATCC 10231

ATCC : American Type Culture Collection

Matériel et Méthodes

3.5.3 Technique des puits :

Le criblage de l'activité antimicrobienne a été effectué à l'aide de la méthode des puits. Les souches fongiques ont été cultivées dans un bouillon PDAac et incubées à 25 °C pendant 14 jours. **(Bosco, 2016)**, Les boîtes de Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton préalablement ensemencés avec les bactéries cibles, et de Sabouraud préalablement ensemencés avec la levure *Candida albicans*, les boîtes de Pétri ont été ensemencées en surface avec les souches microbiennes à l'aide d'un écouvillon stérile, préalablement plongé dans une suspension homogène. La surface de la gélose est ensuite laissée à sécher pendant environ 5 minutes à température ambiante afin d'éliminer l'excès d'humidité. Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible. 100 µl de la culture de moisissure ont été déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, les boîtes de Pétri sont placées à 37 ± 1 °C pendant 24 heures pour les bactéries, Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite mesurés **(Lemriss et al., 2003 ; Valanarasu et al., 2010)**

L'activité antimicrobienne est révélée par l'apparition de zones claires (zones d'inhibition) autour des puits. Le diamètre de ces zones est mesuré pour quantifier l'efficacité du filtrat. Une zone d'inhibition plus large est généralement corrélée à une activité antibactérienne plus marquée.

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

4.1 Isolement des actinomycètes

L'isolement des actinomycètes à partir des échantillons de sédiments côtiers prélevés sur la plage de Mkhalled a été tenté à l'aide des milieux sélectifs ISP2, gélose de Gause, Amidon, Caséine et Agar, spécialement formulés pour favoriser leur croissance tout en limitant celle d'autres micro-organismes, leurs isolement a été empêché par la vitesse rapide de croissance des souches fongiques.

Les résultats obtenus sont cohérents avec plusieurs études antérieures ayant également rapporté des difficultés similaires d'isolement, notamment en l'absence de traitements préalables adaptés qui ont empêché l'apparition des caractéristiques morphologiques typiques des actinomycètes, telles que les colonies poudreuses, pigmentées et le mycélium aérien.

Les résultats obtenus sont cohérents avec plusieurs études antérieures ayant également rapporté des difficultés similaires d'isolement, notamment en l'absence de traitements préalables adaptés qui ont empêché l'apparition des caractéristiques morphologiques typiques des actinomycètes, telles que les colonies poudreuses, pigmentées et le mycélium aérien.

Plusieurs recherches, dont celles de **(Williams et Cross 1971)** et de **(Barka et al.,2016)**, ont mis en évidence l'importance de traitements préalables comme l'exposition à la chaleur humide, l'usage de phénol dilué ou encore l'ajout d'antibiotiques sélectifs. Ces méthodes permettent de limiter la croissance des contaminants rapides, facilitant ainsi l'isolement efficace des actinomycètes.

Ces résultats soulignent la nécessité d'une optimisation des protocoles d'isolement, notamment par :



- L'application de traitements thermiques ou chimiques préalables aux échantillons;
- L'enrichissement des milieux avec des agents inhibiteurs (comme la nalidixique, le cycloheximide ou la rifampicine);
- Un travail en conditions aseptiques rigoureuses pour limiter les contaminations fongiques.

Résultats et discussion



4.2 Isolement des moisissures

L'isolement des champignons à partir des échantillons analysés a permis d'obtenir plusieurs colonies fongiques sur milieux, dont certaines ont pu être identifiées morphologiquement, tandis que d'autres restent non identifiées en raison de contaminations ou d'un développement insuffisant. Les résultats d'isolement sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau 1. 3 : des codes : Les souches identifient avec définition et description macro et microscopique

Numéro de souche	Milieu et dilution	Aspect macroscopique	Aspect microscopie	Photo de la colonie
SM1	CDA R 10-1	jaune	<i>Aspergillus sp.</i>	
SM5	PDA AC 10-1	Vert claire petite	<i>Penicilium sp.</i>	

Résultats et discussion

SM6	MEA AC 10-3	Vert foncé au tour blanc	<i>Cladosporium</i> <i>sp.</i>	
SM7	CDA 10-2	Vert et jauné au tours blanc	<i>Penicillium sp.</i>	

4.3 Identification macroscopique des moisissures

Les caractéristiques macroscopiques des colonies ont été évaluées après une incubation de 15 jours à 25 °C sur milieu PDA L'observation à l'œil nu a permis de noter divers critères comme la couleur de la colonie, son aspect général (texture, relief, bordure) et la pigmentation du milieu environnant (**Guiraud, 1998**).

Lors de l'analyse mycologique des échantillons collectés, plusieurs isolats fongiques ont été obtenus. Parmi eux, une souche appartenant au genre *Cladosporium*, *Penicillium* et *Aspergillus* sont pu être identifiées sur la base de ses caractéristiques morphologiques observées En revanche, d'autres isolats fongiques présents n'ont pas pu être identifiés de manière précise. Malgré la réalisation de microcultures dans le but d'observer leur morphologie.

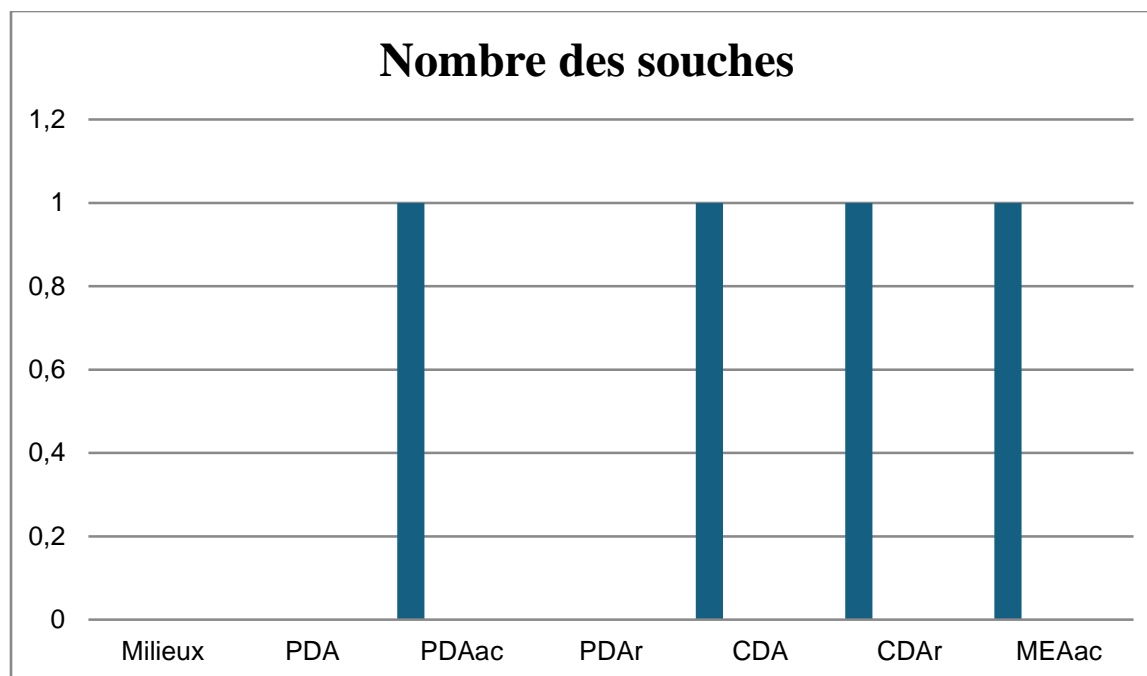


Figure 6 : Nombre des souches isolées par milieu de culture.

4.4 Identification microscopique des moisissures

Pour l'identification des moisissures isolées, une microculture en boîte de Pétri a été réalisée selon la méthode décrite par **(Riddell, 1950)** souvent reprise dans les travaux mycologiques modernes de **(Hoog et al., 2000 ; Samson et al., 2010)**. Cette méthode permet l'observation des structures reproductrices des champignons filamenteux dans des conditions proches de leur croissance naturelle, tout en limitant leur déformation

L'isolement de champignons filamenteux à partir de sédiments marins constitue un axe de recherche majeur dans l'exploration de la biosphère marine profonde. Dans cette étude, l'objectif était d'isoler, d'identifier morphologiquement et de caractériser les champignons présents dans des échantillons de sédiments marins, tout en comparant les résultats obtenus à ceux de la littérature, notamment aux travaux de **(Rédou et al., 2015)**

Nos résultats ont permis d'isoler plusieurs souches fongiques, principalement affiliées aux genres *Penicillium*, *Aspergillus* et *Cladosporium*. Ces champignons ont été identifiés sur la base de leurs caractéristiques macro- et microscopiques, telles que la texture, la couleur des colonies, ainsi que la morphologie des conidiophores et des conidies. Ces résultats montrent qu'il est possible de détecter des genres fongiques typiques des milieux marins, déjà décrits comme cosmopolites dans divers écosystèmes.

Résultats et discussion

Dans l'étude de **Rédou et al. (2015)**, une diversité bien plus large a été rapportée avec 183 isolats fongiques provenant de sédiments collectés entre 4 et 1884 mètres sous le plancher océanique. Cette collection est dominée par des Ascomycètes filamenteux, dont les genres *Penicillium*, *Fusarium* et *Aspergillus*. Ces résultats confirment la prévalence de *Penicillium*, un genre également identifié dans notre travail, et renforcent l'idée que certaines espèces fongiques sont bien adaptées aux conditions extrêmes du milieu marin, y compris à de fortes pressions, des faibles niveaux d'oxygène et des gradients de salinité élevés.

En revanche, deux différences majeures apparaissent entre les deux études : d'une part, les genres *Fusarium* fréquemment isolés par Rédou et al. n'a pas été détectés dans notre analyse ; d'autre part, *Cladosporium*, identifié dans nos échantillons, n'est pas mentionné dans leur étude. Cette divergence pourrait s'expliquer par plusieurs facteurs : les différences de profondeur d'échantillonnage, de conditions physico-chimiques, ou encore de méthodes d'isolement.

Dans l'étude de **Matallah-Boutiba et al. (2009)**, 241 souches fongiques ont été isolées à partir d'échantillons d'eau de mer, de sédiments et de moules. Le genre *Penicillium* domine très largement (55,18 %), suivi d'*Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, entre autres. Ce résultat contraste fortement avec notre étude où seul *Penicillium* (2 souches) , *Cladosporium* (1 souche) et *Aspergillus* (1 souche) ont été identifiés.

L'activité antimicrobienne correspond à l'évaluation de la sensibilité ou de la résistance d'une souche bactérienne vis-à-vis de différentes espèces, Cette méthode repose sur la mesure de l'inhibition de la croissance bactérienne en présence d'antibiotiques, généralement par diffusion en milieu gélosé selon la méthode de **Kirby-Bauer (CLSI, 2020)**.

Toutes les espèces ne réagissent pas de manière égale à un agent antimicrobien, lequel est défini par son spectre d'activité. Toutefois, si l'agent antimicrobien cible un large éventail d'espèces, son efficacité sera alors considérée comme universelle. De plus, l'état physiologique de la bactérie joue un rôle crucial dans sa sensibilité : les bactéries en phase exponentielle de croissance sont généralement plus vulnérables aux agents antimicrobiens chimiques, qui sont rapidement absorbés par elles. En revanche, les bactéries plus âgées (de 24 heures ou plus) tendent à être plus sensibles aux traitements physiques.

Résultats et discussion

4.5 Résultats de l'activité antimicrobienne

L'étude de l'activité antimicrobienne menée dans ce travail repose sur la méthode de diffusion en milieu gélosé, plus précisément la méthode standardisée de Kirby-Bauer. Cette technique, largement utilisée en microbiologie clinique et expérimentale, consiste à déposer des disques de papier imprégnés d'antibiotiques sur un milieu gélosé ensemencé de la souche bactérienne cible.

L'objectif principal de ce test était d'évaluer la sensibilité ou la résistance des souches microbiennes sélectionnées vis-à-vis de deux agents antimicrobiens :

- l'ampicilline, un antibiotique β -lactamine largement utilisé contre les bactéries Gram-positives et certaines Gram-négatives,
- la nystatine, un antifongique polyénique, principalement actif contre les levures et champignons pathogènes.

Après incubation, on observe la formation éventuelle de zones claires autour des disques, appelées zones d'inhibition, qui traduisent une absence de croissance microbienne.

La taille de ces zones, mesurée en millimètres, reflète la capacité de diffusion de l'antimicrobien dans le milieu et son efficacité à inhiber la croissance de la souche testée. Plus la zone est grande, plus la souche est considérée comme sensible à l'antibiotique ; à l'inverse, une absence ou une très faible zone d'inhibition indique une résistance ou une inefficacité de l'antimicrobien dans les conditions testées.

Tableau 1. 4 : Activité antimicrobienne des moisissures

	SM5	SM6.1	SM3	SM7	SM1	AMPICILINE	NYSTATINE	SM6	SM5.1	SM3.1	SM5.2
Ca	-	-	-	-	-	/	23	-	-	-	-
Sa	-	-	-	-	-	6.25	/	-	-	-	-
Pa	-	-	-	-	-	6.25	/	-	-	-	-
Kp	-	-	-	-	-	6.25	/	-	-	-	-

Résultats et discussion

Ec	-	-	-	-	-	6	/	-	-	-	-
Bs	-	-	-	-	-	31.33	/	-	-	-	-

Ces résultats suggèrent une présence fongique notable dans les sédiments marins de la zone étudiée, avec une dominance du genre *Penicillium*.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne réalisée par la méthode de diffusion en milieu gélosé a permis de mettre en évidence des profils de sensibilité variables selon les souches microbiennes testées. Comme attendu, *Candida sp.* a montré une forte sensibilité à la nystatine (zone d'inhibition de 23 mm), tandis qu'aucune inhibition n'a été observée avec l'ampicilline, confirmant l'absence d'effet de cet antibiotique sur les levures. Du côté des bactéries, seule *Bacillus subtilis* s'est révélée sensible à l'ampicilline, avec une large zone d'inhibition de 31,33 mm. À l'inverse, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* ont présenté des zones d'inhibition très faibles (< 6,5 mm), traduisant une résistance importante à l'ampicilline dans les conditions testées. La nystatine n'a, comme attendu, exercé aucun effet sur ces souches bactériennes, à l'exception d'une très faible inhibition observée pour *Bacillus subtilis* (5 mm), probablement due à un artefact ou à un effet non spécifique. Ces résultats soulignent non seulement la diversité des profils de sensibilité entre les espèces testées, mais aussi la nécessité de conditions optimisées (concentrations, milieux, extraits) pour révéler pleinement le potentiel antimicrobien des agents étudiés (Liang et al., 2019).

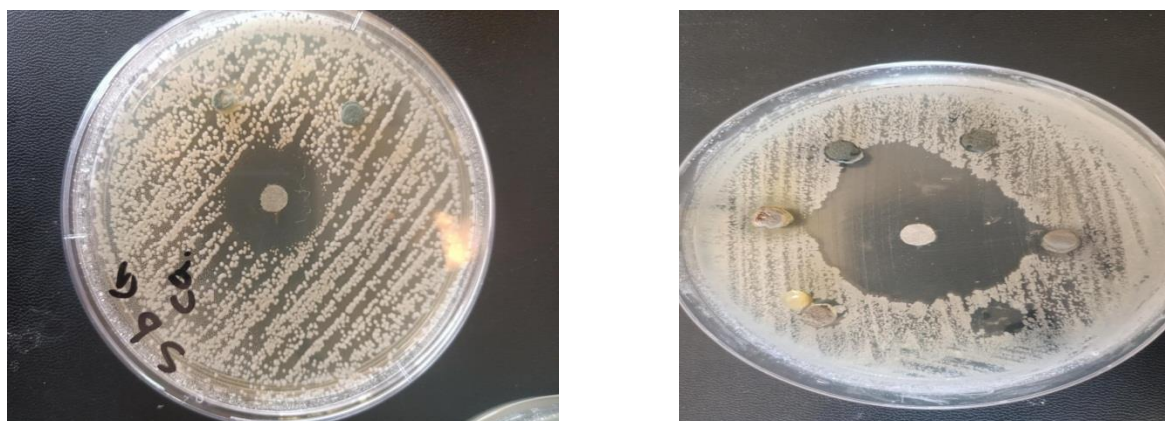


Figure 7 : Zones d'inhibition observées sur les souches *B. subtilis* et *C. albicans*

Résultats et discussion

À titre d'exemple (**Sivasubramanian et al., 2017**) ont mis en évidence des différences significatives dans l'efficacité des extraits marins selon les souches bactériennes ciblées, ce qui met en lumière la nécessité d'une exploration plus approfondie des composés bioactifs produits par les micro-organismes marins afin d'en mieux cerner le potentiel thérapeutique

L'environnement peut avoir un impact significatif sur l'efficacité des agents antimicrobiens, qu'ils soient physiques ou chimiques. Parmi les facteurs majeurs influençant cette efficacité, on retrouve :

Le pH du milieu, La turbidité et la viscosité, La dureté de l'eau, La présence de matières organiques et La température, qui peut altérer l'efficacité de certains agents antimicrobiens chimiques (**Cuq, 2025**).

La dimension de la zone d'inhibition donne une indication de l'activité, mais plusieurs facteurs peuvent influencer les résultats (**Carballo et al., 2012**).

Les tests d'activité antimicrobienne réalisés selon la méthode de Kirby-Bauer ont révélé une faible à très faible activité antimicrobienne des extraits testés vis-à-vis des souches microbiennes sélectionnées (*Candida sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*).

Les résultats rapportés par **El Amraoui et al. (2014)** montrent une activité antimicrobienne significative parmi les isolats marins. En effet, 82 % des isolats ont montré une activité contre au moins un des six pathogènes testés, avec une activité particulière contre les bactéries Gram-positives (76 %) et les bactéries Gram-négatives (62 %). Ces résultats sont renforcés par la diversité des genres identifiés, qui incluent des genres bien connus pour leur potentiel antimicrobien comme *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, et *Bacillus*.

Cette diversité génétique, associée à la présence de souches actives contre des pathogènes significatifs, suggère que les isolats marins possèdent un potentiel non négligeable pour la production de métabolites secondaires antimicrobiens.

Les auteurs attribuent probablement cette activité à des composés bioactifs produits par ces micro-organismes marins dans un environnement compétitif. Ce type de biodiversité dans le milieu marin peut fournir une large gamme de cibles pour de futurs traitements antimicrobiens, en particulier face à la résistance croissante des agents pathogènes

Résultats et discussion

Les faibles zones d'inhibition observées dans notre étude peuvent être expliquées par plusieurs facteurs, notamment le type d'extrait testé, les conditions de culture ou la méthodologie d'isolement des isolats. L'isolement dans des milieux de culture riches en nutriments pourrait avoir influencé l'expression des métabolites antimicrobiens, car les micro-organismes pourraient ne pas avoir été en stress environnemental suffisant pour produire ces composés.

Conclusion

Conclusion

Le milieu marin représente une source d'innovations inégalées pour les biotechnologies. Notre travail s'est intéressé au screening des micro-organismes présents dans les sédiments marins, avec pour objectif de mettre en évidence des biomolécules d'intérêt pour les industries pharmaceutique, cosmétique, agroalimentaire, chimique et pour la bioremédiation des sites pollués.

Nos résultats ont permis d'isoler et de caractériser plusieurs souches de champignons filamenteux et d'actinomycètes, appartenant notamment aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Cladosporium*. L'évaluation de leur activité antimicrobienne a révélé un potentiel intéressant contre diverses souches pathogènes bactériennes et fongiques, avec des zones d'inhibition allant jusqu'à 10 mm. Ces résultats confirment que les sédiments marins constituent un réservoir prometteur de micro-organismes producteurs de métabolites secondaires bioactifs.

Notre étude s'est toutefois interrompue à ce stade, et n'a pas permis d'aller jusqu'à la purification et à la caractérisation chimique des composés actifs, en raison des contraintes rencontrées au cours du projet.

Afin de valoriser ces premiers résultats, nous proposons :

- De poursuivre cette étude en recherchant au sein de notre collection de souches les activités enzymatiques et antimicrobiennes d'intérêt, et en identifiant les espèces les plus prometteuses.
- D'approfondir la recherche de nouvelles espèces microbiennes marines, sachant que seule une faible part (environ 15 %) de la biodiversité marine est actuellement connue, alors que les océans couvrent plus de 70 % de la surface de notre planète.
- De valoriser la fraction invisible des bioressources marines par la recherche de nouvelles applications biotechnologiques, car la biodiversité microbienne des sédiments marins pourrait bien représenter le principal réservoir de nouvelles molécules d'intérêt pour les prochaines décennies.

Références biographiques

- American Society for Microbiology (ASM). (2016). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. Disponible en PDF : <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol-pdf.pdf>
- Barka, E. A., et al. (2016). *Biotechnological applications of Actinomycetes in the pharmaceutical industry*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 679.
- Belyagoubi, L., et al. (2018). *Antimicrobial activities of culturable microorganisms (actinomycetes and fungi) isolated from Chaabe Cave, Algeria*. *International Journal of Speleology*, 47(2), 8.
- Bills, G. F., et al. (2009). *Natural products from marine-derived fungi*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(5), 433–441.
- Binder, J. (2007). *Global Project Management: Communication, Collaboration and Management across Borders*. Gower Publishing.
- Blunt, J. W., et al. (2022). *Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 39(2), 123–198.
- BOUBIENZA, N. (2022). *Isolement et caractérisation de souches d'actinomycètes marines productrices de biomolécules antimicrobiennes à partir de l'île de Rachgoun, l'Ouest algérien* [Diplôme de DOCTORAT LMD 3ème Cycle].
- Bosco, M. (2016). *Étude de l'activité antimicrobienne des extraits fongiques*.
- Boyen, C., & Jaouen, P. (2015). *Les Biotechnologies Marines dans le Grand Ouest*.
- Carroll, A. R., et al. (2019). *Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 36(1), 122–173. <https://doi.org/10.1039/C8NP00092A>
- Chabasse, D., et al. (2017). *Mycologie médicale : identification et diagnostic des champignons pathogènes*. 3ème édition. Éditions Médecine-Sciences Flammarion.
- Choudhary, A., et al. (2017). *Current status and future prospects of marine natural products (MNPs) as antimicrobials*. *Marine Drugs*, 15: 272–314.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th Edition, CLSI supplement M100*.
- Compaoré, S., et al. (2016). *Étude de la diversité des champignons producteurs de substances antimicrobiennes isolés dans le sol*. *Journal of Applied Biosciences*, 102, 9456–9465.

- Cuq, J.-L. (n.d.). *Microbiologie alimentaire...* <https://www.ac-sciences-lettres-montpellier.fr/...>
- de Hoog, G. S., et al. (2000). *Atlas of Clinical Fungi (2nd ed.)*. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Direction des Services Agricoles de Tlemcen. (2020). Monographie de la wilaya de Tlemcen. Tlemcen : DSA Tlemcen.
- El Amraoui, M., et al. (2014). *Antifungal and antibacterial activity of marine microorganisms*. *Annales Pharmaceutiques Françaises*, 72(2), 107–111.
- El-Hossary, E. M., et al. (2017). *Antifungal potential of marine natural products*. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126: 631–651.
- Flewelling, A. J., et al. (2015). *Alternariol and its derivatives: Chemistry and toxicology*. *Toxins*, 7(2), 403–432.
- Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris, pp. 310-321.
- Hamidou Compaoré, et al. (2016). *Isolement et caractérisation morphologique de moisissures productrices de substances antibactériennes...* *Int. J. Biol. Chem. Sci.*, 10(1), 198–210.
- Harazi, A., et al. (2020). *Marine microorganisms as an untapped source of bioactive compounds*. *Microbial Biotechnology*, 13(1), 1–14.
- Hoshino, T., et al. (2020). *Global diversity of microbial communities in marine sediment*. *PNAS*, 117(44), 27587–27597.
- Huang, X., et al. (2012). *Chaetoglobosin Ae from marine Chaetomium globosum: Biological activity and mode of action*. *Marine Drugs*, 10(12), 2930–2941.
- Imhoff, J. F., et al. (2011). *Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products*. *Biotechnology Advances*, 29(5), 468–482.
- Kitouni, M. (2007). *Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques...*
- Ksentini, S. (2024). *Biotechnologie marine : de nombreux atouts pour le développement du secteur en Algérie*. Dzair Scoop.
- Larone, D. H. (2011). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*. 5th ed. ASM Press.

- Law, J. W. F., et al. (2020). *The rising of “modern actinobacteria” era*. Progress In Microbes & Molecular Biology, 3(1).
- Lemriss, S., et al. (2003). *Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes*. Can J Microbiol, 49(11): 669–674.
- Liang, J., et al. (2019). *Antimicrobial potential of marine sediment-derived microorganisms: A review*. Marine Drugs, 17(6), 341.
- Liu, Y., et al. (2010). *Scopararane A, a new sesterterpene from marine-derived Scopulariopsis sp.* Marine Drugs, 8(10), 2479–2486.
- **Loucif, L.** (2022-2023). *Polycopié des Travaux Pratiques de Mycologie (Mycologie-Algologie-Virologie, Licence 3 Microbiologie)*. Université Batna 2, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Département de Microbiologie et de Biochimie. Disponible : http://staff.univ-batna2.dz/loucif_lotfi/classes/polycopi%C3%A9-des-travaux-pratiquesmycologietroisi%C3%A8me-ann%C3%A9e-licence-sp%C3%A9cialit%C3%A9
- Matallana-Surget, S., et al. (2007). *Isolation and characterization of oligotrophic marine bacteria...*
- Mattallah Boutiba, A. (2009). *Identification des espèces fongiques des eaux marines du littoral occidental algérien...*
- Mohanlal, R. W., et al. (2018). *Plinabulin, a novel small molecule clinical stage IO agent...* JCO, 36: 126–126.
- Morincome, S. (2019). *Le milieu marin et la pharmacie : étude d’un milieu méconnu et fragile...*
- Navarri, M. (2016). *Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds...*
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). *Natural products as sources of new drugs...* J. Nat. Prod. 83, 770–803.
- Parte, S., et al. (2017). *Biotechnological Applications of Marine Enzymes...* Advances in Food and Nutrition Research, 80, 75–106.
- Pazhanimurugan, R., et al. (2012). *Bioactive potential of actinobacteria against drug resistant pathogens*. J. Appl. Pharm. Sci., 167-173.
- Raghukumar, C. (2016). *Marine fungal biotechnology: An ecological perspective*.

- Raghukumar, S. (2017). *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems*. Springer.
- Reddou, V., et al. (2015). *Diversity of culturable fungi in deep-sea sediments...* FEMS Microbiol Ecol, 91(8), fiv083.
- Riddell, R. W. (1950). *Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture*. Mycologia, 42(2), 265–270.
- Samson, R. A., et al. (2010). *Introduction to food- and airborne fungi*. 7th ed. CBS-KNAW.
- Scharf, D. H., et al. (2012). *Gliotoxin: A fungal virulence factor...* PLoS Pathogens, 8(6), e1002770.
- Sivasubramanian, A., et al. (2017). *Evaluation of antimicrobial activity of marine sediment-derived actinomycetes...* J. Appl. Microbiol, 123(3), 712–723.
- Subramani, R., & Aalbersberg, W. (2012). *Culturable rare Actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 97(21), 9291–9321.
- Valanarasu, M., et al. (2010). *Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of Streptomyces*.
- Williams, S. T., & Cross, T. (1971). *The Isolation and Identification of Actinomycetes*. J. Appl. Microbiol, 21(3), 412-420.
- Xu, J., et al. (2010). *Pestalotiopsolides A–E...* J. Nat. Prod., 73(9), 1461–1465.
- Xu, L., et al. (2015). *Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi*. Marine Drugs, 13, 3479–3513.
- Zhang, Y., et al. (2009). *Trichodermamides A–C...* Org. Lett., 11(2), 341–344.
- Zhou, Y., et al. (2018). *Cytotoxic and antifungal metabolites from marine-derived Penicillium species*. Frontiers in Microbiology, 9, 1457.

Annexes

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURES

1-PDA (Potato Dextrose Agar) :

Le milieu de culture PDA est favorable pour la croissance des champignons phytopathogènes.

Pomme de terre	200gr
Dextrose	20g
Agar	15g
Eau distillée	1litre

-Laver et couper en petits morceaux la pomme de terre ; les mettre dans 700ml d'eau et porter à ébullition. Après filtrer et compléter à 1 litre puis ajouter les autres ingrédients.

PDAr : PDA+ rouge bengal

PDAac : PDA+ acide citrique

2-CDA (Czapek Dextrose Agar) :

Sodium nitrate NaNO_3	30g
Potassium KH_2PO_4	1g
Magnésium sulfate MgSO_4	0.5g
Fer de sulfate FeSO_4	0.01g
Dextrose	20gr
Agar :	15g
Eau distillée	1litre

CDAr :CDA+ rouge bengal

3-MEA (Malt Extract Agar)

Extrait de malt	20g
Agar	15g
Eau distillée	1litre

MEAal : MEA+ acide lactique.

Annexes

4-ISP2(Projet International des Streptomyces)

Poudre d'extrait de levure	4g
Poudre d'extrait de malt	10g
Dextrose	4g
Agar	20g
Eau distillée	1lire

5-Amidon caséine agar (SCA) :

Poudre de caséine	1g
Amidon	10g
Eau de mer	37
Agar	15g

6-Gélose de gause :

Glucose :	10g
Peptone :	1g
Chlorure de sodium Na Cl :	1g
Agar :	15g
Eau distillée :	1 litre

7-Mueller Hinton Broth (bouillon)

Mueller Hinton :	6.9g
Eau distillée :	300ml

8-Sabouraud Dextrose Broth (bouillon) :

Peptone de gélatine :	1g
Glucose :	4g
Eau distillée :	100ml

Annexes

9-Gélose Mueller Hinton

Mueller Hinton :	23g
Agar :	17g
Eau distillée :	1litre

10-Gélose Sabouraud :

Sabouraud :	65gr
Eau distillée :	1litre
Rose bengel :	1g
Eau distillée :	100ml

Czapek concentré (pour les milieux G25N et C.Y.A) :

NaNO ₃	300 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	50 g
KCL	50 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	1 g
Eau distillée	1000 ml

G25N (25% Glycérol Nitrate Agar):

K ₂ HPO ₄	075 g
Czapek concentré	7,5 ml
Extrait de levure	3,7 g
Glycérol pour analyse	250 g
Agar	12 g

Annexes

Eau distillée	750 ml
---------------	--------

C.Y.A (Czapek Yeast Agar):

K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentré	10 ml
Extrait de levure	5 g
Saccharose	30 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml

AFPA : Aspergillus flavus, Parasiticus Agar :

Peptone bactériologique	10 g
Extrait de levure	20 g
Dichloran (2-6-Dichlor-4-nitroanilin 96%)	2 mg (0,2% in éthanol, 1,0 ml)
Cl ₂ C ₆ H ₂ (NO ₂) NH ₂	
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Chloramphénicol	100 mg
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Annexes

Au lieu de chloramphénicol en a utilisé l'Ampicilline une dose plus forte (≈ 50 mg / 200 ml de AFPA).

Lactophénol:

Phénol	20 g
Acide lactique (25%)	20 ml
Glycérol	20 ml
Eau distillée	40 ml

Bleu de coton :

Lactophénol	
bleu de méthylène	0,5 g

Y.E.S (Yeast Extract Sucrose):

Extrait de levure	20 g
Sucrose	40 g
Eau distillée	1000 ml

Annexes

Bennett

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Eau distillée	1000mL
pH	5,6

Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1000 mL

Annexes

pH 6,8

Gélose nutritive

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15-20 g
Eau	1000 mL
pH	7,2

Gélose TSI (Triple Sugar Iron)

Peptone de viande	15g
Protéose peptone	5g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Lactose	10g
Citrate de fer ammoniacal	0,3g
Chlorure de sodium	5g
Sodium thiosulfate	0,3g
Rouge de phénol	0,05g
Agar	18g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Annexes

ISP 6

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sodium thiosulfate	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7-7,2

Milieu LB (Luria-Bertani Medium)

Pour 1 litre :

A 950 mL d'eau distillée on ajoute :

10 g de bacto-tryptone

5 g extrait de levure

10 g NaCl

Mélanger jusqu'à dissolution des solutés, et ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 5 N. Ajuster le volume de la solution à litre avec de l'eau distillée, puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120 °C.

M63

Le milieu chimiquement défini M63 (Miller, 1972) est composé de 13,6 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 250 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L de thiamine-HCl et 0,5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à la valeur de 7,3 avec une solution de KOH. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 30 min à 0,5 bar puis du glucose stérile est ajouté à la concentration finale de 4 g/L.

Milieu Minimum M63 : KH_2PO_4 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM pH 7, supplémenté par du glucose 0.2 %, MgSO_4 0,02 %, thiamine 1 mg/L et 1 g/L d'hydrolysats tryptiques d'acide aminés (Difco) ou d'hydrolysats acide de caséine (Difco).

Annexes

M 72 (Gélose Trypto-caséine soja)

Tryptone	15 g
Peptone papainique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar agar bactériologique	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3±0,2

MRS

Le milieu MRS (milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al*, 1960) est composé de 10 g/L de peptone de protéose n°3, de 10 g/L d'extrait de boeuf, de 5 g/L d'extrait de levure, de 20 g/L de glucose, de 1 g/L de polysorbate 80, de 2 g/L de citrate d'ammonium, de 5 g/L d'acétate de sodium, de 0,1 g/L de sulfate de magnésium, de 0,05 g/L de sulfate de manganèse et de 2 g/L de phosphate dipotassique. Le pH final de ce milieu est de 6,5. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 15 min à 1 bar.

Mueller Hinton

infusion de viande de bœuf	2 g
Amidon	15 g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3

Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Agar	17g
Eau distillée	1000 mL

Annexes

pH 17g

Soyabean Flour Medium (SFM)

Extrait de levure 5g
Farine de soja 5g
K₂HPO₄ 5g
NaCl 5g
Glycerol 20g
Eau distillée 1000mL
pH 6,8 (ajuster avec 5N HCl)

TSA (Gélose Trypticase de soja)

Trypticase 17 g
Soytone 3 g
Chlorure de sodium 5 g
Agar 15 g
Eau distillée 1000ML
pH 7,2

Milieu TSB (Bouillon Trypto-Caséine Soja)

NaCl 5 g
KH₂PO₄ 2,5 g
Glucose 2,5 g
Peptone de caséine 17 g
Peptone de farine de soja 3 g
Eau distillée 1000mL
pH 7,3

Urée- indole

L-tryptophane 3g
Phosphate de dipotassique 1g

Annexes

Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Rouge de phénol	2,5g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8