

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

Etude de l'activité antimicrobienne d'une plante aquatique
endémique de la Méditerranée, Alternative aux antibiotiques en
aquaculture.

Présenter par

- Bezazel Chams Ennahar
- Boudeffa Safa
- Khoualed Remissa
- Rabah Hazila Hayem

Membre de Jury :

Mme. Chaib Nadjla (Prof)	Président	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Boucetta Sabrina (MCA)	Promoteur	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Agoun Asma (MCB)	Examineur	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda

Année universitaire 2023/2024

Remerciement

Avant toutes choses, nous tenons à remercier Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la volonté et la santé pour la réalisation de ce travail que nous espérons bénéfique.

*D'abord nous tenons, Vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude au notre encadreur **Dr.Mme. BOUCETTA Sabrin.**, pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse jusqu'à la fin de ce mémoire et bien sûr n'oublie pas son fils **Hani.***

*Nous remercions également **Prof.Mme Chaib Nadjla** professeur en université 20 Aout 1955 Skikda pour avoir accepté de juger ce travail.*

*Nos remerciements sont adressés également à **Dr.Melle. Agoun Asma** maître de conférences -A- notre enseignante et membre de jury examinateur.*

*Nous remercions **Mme MACHIA Leila** maître assistante -A- notre enseignante pour ses aides, ses conseils scientifiques et ses encouragements.*

*Un merci très spécial à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de la Willaya de Skikda spécialement à **Mr ZAYED Nacer** qui était trop généreux avec nous, C'est un honneur de travailler avec telles personnes compétentes.*

Un merci spécial à tous l'équipe du laboratoire de Baterio-Parasitologie de l'hôpital cicel pour leurs aides.

Nous remercions aussi l'équipe de laboratoire de la microbiologie université Skikda.

*Nous remercions **club blue planet** pour nous apporter la plante.*

À tous les étudiants de master de la promotion 2024.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

*A ma très chère mère **Driffa***

*Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point
te remercier comme il se doit. Ton affection me
couvre, ta bienveillance me guide et ta présence à
mes côtés a toujours été ma source de force pour
afférents obstacles*

*A mon très cher père **Ismail***

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et
m'encourager. Que ce travail traduit ma gratitude
et mon affection*

*A mes très chers frères **Abderrazak** et sa femme
Bouchra, Mohiédine, Aissam et sa femme **Assia***

*Mes belles sœurs **Zainb** et **Imen***

*A mes chers amis proches **Nesrin** et **Salsabil***

*Puisse dieu vous donne santé, bonheur, courage, et
surtout réussite*

Khoualed Remissa

Avant tout, Merci dieu de m
'avoir donné la force, la capacité de réfléchir, la patience d'aller jusqu'au
bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel «
Alhamdoulileh»

Je dédie ce travail à l'âme de mon cher défunt père Mouhamed qui m'a
appris les fondements de la vie et m'a donné la confiance et le courage
nécessaires pour atteindre cette période.

A' celle qui a œuvré ma réussite avec son amour et son soutien, à celle
qui mérite d'être remerciée ma chère mère Djamila.

A' mes sœurs Mouna et Manel et à ses enfant Nour sin et Saned la source
de mon sourire et l'espoir dans ma vie.

A' ma cousine Fatima et tout ma famille

A' mes amies proches Aya et Marwa

A' Mes collègues avec qui j'ai partagé les moments difficiles
persévérance détermination et désir d'atteindre notre objectif.

Hayem

Je dédie ce travail .

Mes chers parents **Tahar** et **Djohar**, pour leurs sacrifices, le soutien et les encouragements qu'ils m'ont apportés.

Pour tout ce que vous m'avez donné dans cette vie, qu'Allah vous garde à moi.

J'espère qu'ils seront fiers de moi.

Mon très cher frère : **Ismail** je te souhaite tout le bonheur du monde et un avenir plein de succès.

Mes chères sœurs : **Lydia** , **Rana** , **Meriem** , **Aya** et **Rafif**.

Oncle **Hicham** : je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur et beaucoup de succès dans votre vie.

A mes amis **Hoyem**, **Rawya**, **Samar**, **Chaima** et **Rime**

Mes collègues de travail de fin d'étude **Romeissa**, **safa** et **hoyame**

Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin, directement ou indirectement à la réalisation de ce modeste travail.

A toute la promotion de la microbiologie appliquée

2024/2025

Chams ennahar

الحمد لله حبا وشكرا وامتنانا على البدء والختام.

بعد تعب و مشقة دامت سنوات في سبيل الحلم و العلم أصبح عنائي اليوم للعين قررة ها أنا اليوم
أقف على عتبة تخرجي و أقطف ثمار تعبي و أرفع قبعتي بكل فخر فاللهم لك الحمد قبل أن
ترضى و لك الحمد إذا رضيت و لك الحمد بعد الرضا ...

بكل حب أهدي ثمرة نجاحي و تخرجي لنفسي أولا ثم الى كل من سعى معي لإتمام هذه المسيرة
و دمتم لي سندا لا عمر له

الى من لا ينفصل اسمي عن اسمه ذلك الرجل العظيم ، رجل علمني أن الحياة كفاح و سلاحها
العلم و المعرفة و بدل كل ما بوسعه و لم يبخل داعمي الأول في مسيرتي و سندي و قوتي و
ملاذي بعد الله...

الى فخري و اعزازي: "والدي محمد "

الى من جعل الله الجنة تحت اقدامها الى و هج حياتي التي ظلت دعواها تضم اسمي دائما القلب
الحنون و الشمعة التي كانت في الليالي المظلمات معلمتي الاولى

سر قوتي و نجاحي جنتي: "والدتي الحنونة "

الى من شد الله بهم عضدي فكانو خير معين في الاوقات الصعبة لاصل الى ما أنا عليه الآن

" أختي الغالية سناء و إخواني الأعراء "

لكل من كان عوننا و سندا في هذا الطريق " أستاذتي الدكتورة الفاضلة بوسنة صبرين"
" عائلتي و أصدقائي "

اليوم هو يوم تحقيق الحلم و الإنجاز و نيل ثمرة نجاحي الذي لطالما تمنيت راجية من الله تعالى
أن ينفعني بما علمني و أن يعلمني ما أجهل و يجعله حجة لي لا علي ...

" فعلتها لأجل رمش عين أمي و كد يد أبي "

بوضفة صفاء

Table des matières

Résumés	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Listes des tableaux	
Introduction	01
Chapitre 01:Matériel et Méthodes	
Objectif.....	06
Cadre de l'étude.....	06
I. La préparation des extraits Brutes, extrait hydro-méthanolique et nanoparticule d'argent de <i>P.oceanica</i>	10
1. Matériel végétal « feuille détachées de <i>P.oceanica</i>	10
2. Récolte.....	10
1. Séchage et conservation	11
4.Préparation des extraits.....	12
4.1 Extrait Hydro-méthanolique.....	12
4.2 Les extraits bruts.....	13
4.3 Les nano particules D'argent (Silver).....	14
II. Activité anti microbienne des extraits (POD et POV).....	
1.Souches microbiennes.....	16
2. Les milieux de culture.....	19
3. Les extraits testés.....	19
4.Préparation des cultures jeunes.....	19
5. La mesure de la charge bactérienne.....	19
6. Observation microscopique.....	20
6.1. La coloration de Gram.....	20
a)Principe.....	20
b) Mode opératoire.....	20

7. Préparation de l'inoculum.....	20
8. Etude de l'activité antibactérienne des Extraits(hydro-méthanolique ; brut et Nanoparticule d'argent) de POD et POV.....	21
8.1 Méthode de diffusion des disques	21
8.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	22
8.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB)	24
1. Animal expérimental Poisson Tilapia <i>Oreochromis sp</i> « in vivo ».....	24
2. Echantillonnage et analyse bactériologique (eau et poisson d'essai).....	28
2.1. Contrôle de qualité microbiologique de l'eau d'aquarium	28
2.2. Contrôle de qualité microbiologique alimentaire	29
2.3 La coprologie.....	30
Chapitre 02 : Résultats et discussion	
1. Les caractéristiques organoleptiques des extraits de <i>P. oceanica</i>	31
2. Le rendement de l'extrait hydro-méthanolique, brut et nanoparticule <i>P. oceanica</i> ...	32
3. Caractérisation macroscopique des souches étudiées.....	34
4. Caractérisation microscopique des souches étudiées.....	34
4.1. Les bactéries.....	34
3. Résultats des témoins réalisés par la méthode de diffusion sur gélose.....	35
6. Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux extraits POV et POD.	36
6.1 Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'extrait hydro-méthanolique de POV et POD (<i>P. oceanica</i>)	36
6.2 Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'extrait Brut de POV et POD (<i>P. oceanica</i>).	39
6.3 Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à l'extrait Nanoparticule Silver de POV et POD (<i>P. oceanica</i>).	41
7. Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB).....	48
8. Résultats de Contrôle de qualité alimentaire d' <i>Oreochromis sp</i> « supplémenté par l'extrait hydro-méthanolique » et de l'eau expérimentale.....	51

8.1 Résultats de Contrôle de qualité alimentaire d'Oreochromis sp « supplémenté par l'extrait hydro-méthanolique »	51
8.1.2 Coliforme thermo tolérants (CTT).....	52
8.1.3 Anaérobies Sulfuro réducteurs (ASR)	54
8.1.5 Salmonella.....	55
8.2 Résultats des analyses microbiologiques de l'eau des aquariums	56
8.3 Résultats de coprologie	58
8.1.1 Interprétation.....	59
8.1.2 Actions recommandées	60
Conclusion et perspectives	61
Références Bibliographique	
Annexes	

Liste des tableaux

N° Tableau	Titre	page
Tableau 1	descriptif des différentes souches bactérienne utilisées (ATCC)	18
Tableau 2	Les milieux de cultures utilisés dans l'activité antimicrobienne.	19
Tableau 3	Ingrédients et composition approximative des régimes expérimentaux	28
Tableau 4	Protocole de prélèvement de la coproculture	30
Tableau 5	Propriétés organoleptiques des extraits hydro-méthanolique, brut et nanoparticules d'argent de POV et POD « <i>P. oceanica</i> »	31
Tableau 6	Le calcul de rendement	31
Tableau 7	La caractérisation macroscopique des souches étudiées	34
Tableau 8	La Caractérisation microscopiques des souches étudiées	35
Tableau 9	Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'extrait hydro-méthanolique de <i>P. oceanica</i> (POV et POD)vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées.	37
Tableau 10	Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'extrait Brut de <i>P. oceanica</i> (<i>POV et POD</i>) vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées.	40
Tableau 11	Résultats des diamètres d'inhibition en mm (moyenne \pm l'écart type) de l'extrait Nanoparticule Silver de <i>P.oceanica</i> (<i>POV et POD</i>) vis-à-vis des quatre souches bactériennes étudiées	42
Tableau 12	Détermination de la CMI et CMB des souches bactériennes vis-à-vis des extraits de <i>P. oceanica</i> (POV et POD).	48

Liste des abréviations

MDR	menace des bactéries multi-résistantes
XDR	les bactéries ultrarésistantes aux médicaments
PDR	les pan drug résistantes
IDSA	infectious Diseases Society of America
OMS	l'Organisation mondiale de la santé
FAO	l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
PAA	l'acide peracétique
ATB	Antibiotiques
BCPL	le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CTT	les coliformes thermo tolèrent
E. coli	Escherichia coli
EP	Eau physiologique
EPT	Eau peptone tamponnée
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
FMAT	Flore mésophile aérobie totale
GN	Gélose nutritive
H	heur
JORA	Journal Officiel Algérie
Lt	longueur totale
Min	Minute
MH	Muller Hinton
NPP	Nombre le plus probable
OMS	Organisation Mondial de la Santé
PCA	Giolitti Cantoni, Plate Count Agar
POD	Posidonie déchets
POV	Posidonie vert
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Bouillon Sélénite- cystéiné
SM	Solution mère
TSE	Tryptone sel eau
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	Unité Formant Colonie
VF	Viande foie
VRBL	Milieu lactose biliée au cristal violet
VRBG	Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre
BMH	Bouillon Muller Hinton
Aq_{pov} C	Aquarium Posidonie vert C
Aq_{pod} C	Aquarium Posidonie déchets C
Aq_{pov} b	Aquarium Posidonie vert b
Aq_{pod} b	Aquarium Posidonie déchets b
Wt	Poids totale
C°	Degré Celsius

C	Centimètre
g	gramme
Kg	Kilogramme
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
%	Pour cent

Introduction :

L'émergence continue de résistances bactériennes aux antibiotiques et les épidémies virales mortelles pouvant entraîner de graves pandémies nuisent gravement aux normes de santé humaine et animales dans le monde entier (Giske, C.G et al., 2008).

La menace des bactéries multi-résistantes (MDR) exerce déjà un impact significatif sur le bien-être humaine et animale, les ressources cliniques et les coûts associés. (Giske, C.G et al., 2008), (Rice, L.B. Federal. ,2008). Les bactéries MDR sont des souches bactériennes qui ne sont pas sensibles à un ou plusieurs antimicrobiens appartenant à au moins trois classes d'antimicrobiens différentes, telles que les bactéries ultrarésistantes aux médicaments (XDR) et les pan drug résistantes (PDR) (Magiorakos, A.-P et al.,2012). Les principaux représentants des pathogènes bactériens MDR, en dehors de l'agent causal de la tuberculose *Mycobacterium tuberculosis*, sont englobés dans un groupe appelé ESKAPE, c'est-à-dire *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Entérobactéries* , (Rice, L.B. Federal , 2008). En réponse à ce problème, de nombreuses agences et sociétés de santé, telles que l'**Infectious Diseases Society of America** (IDSA) et l'Organisation mondiale de la santé (OMS), ont attiré l'attention sur le manque de nouveaux antibiotiques et sur le besoin urgent de produits rentables traitements depuis des décennies (Spellberg, B et al.,2008), (Miethke et al.,2021) .

L'aquaculture mondiale s'est révélée être la source d'alimentation animale qui connaît la croissance la plus rapide pour l'augmentation de l'offre de poisson, avec une augmentation annuelle moyenne de 6 % par an (FAO ,2012), (M. Reverter et al.,2014). Ont indiqué que le poisson représentait 17 % des protéines animales et 6,5 % de l'ensemble des protéines consommées. Cependant, les maladies infectieuses dans la production aquacole mondiale représentent un intérêt considérable dans le monde entier, entraînant une perte totale ou partielle de la production (M.G. Bondad-Reantaso et al.,2005), (D. Ward, D.A. Bengtson et al.,2016).

Le poisson (la pisciculture), y compris les produits d'élevage, est une source précieuse et nutritionnellement importante de protéines animales (FAO. 2019). Le tilapia est le deuxième poisson d'élevage le plus élevé au monde après les carpes. Selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la production mondiale de tilapia a continué de croître, passant de 3,1 millions de tonnes en 2010 à 5,6 millions de tonnes en 2018 (FAO, 2020). Cela a mis en évidence la contribution significative de l'industrie du tilapia à

l'économie mondiale en tant que l'une des principales sources mondiales de protéines pour la consommation humaine (FAO, 2020).

L'impressionnante production mondiale de l'aquaculture est le résultat d'une large adoption de systèmes de production intensifs, qui sont associés à une productivité plus élevée par unité de surface en raison d'une densité d'élevage plus élevée (Basha et al., 2013).

Cependant, la densité d'élevage plus élevée dans les systèmes d'élevage intensif, associée à d'autres activités aquacoles générales telles que la manipulation, le transport et la récolte des poissons, peut être stressante pour les poissons. Cela peut par conséquent conduire à un certain nombre de conditions, y compris une faible capacité métabolique (Santos, et al 2010), une mauvaise qualité de la viande (Jittinandana et al., 2003), une sensibilité accrue aux maladies (Wu et al., 2013), et dans les cas extrêmes, conduire à la mort (Mckenzie et al., 2012).

Toutes ces contraintes font qu'il est difficile pour les pisciculteurs de convertir les avantages d'un rendement de production plus élevé associé aux systèmes de production intensifs en gains économiques. Depuis 2000, le taux d'augmentation moyen annuel est particulièrement élevé pour les poissons d'eau douce et les mollusques (FAO, 2018).

Afin de tirer un bénéfice économique des systèmes d'élevage intensif, les pisciculteurs ont commencé à utiliser des antibiotiques synthétiques et d'autres médicaments chimiothérapeutiques pour maintenir les poissons d'élevage en bonne santé. L'adoption de ces médicaments en aquaculture semble être uniquement motivée par le profit et non durable, car ils entraînent plusieurs autres contraintes telles que la résistance des poissons aux médicaments pathogènes, l'immunosuppression, la pollution de l'environnement et l'accumulation de résidus chimiques, qui peuvent être potentiellement dangereux pour la santé publique (Bulfon et al., 2013 ; WHO, 2006). De plus, les poissons traités avec des produits chimiques synthétiques ne sont pas facilement acceptés par les consommateurs pour des raisons de sécurité (Biswas et al., 2005 ; Reverter et al., 2014). Compte tenu des conséquences négatives susmentionnées, plusieurs pays interdisent l'utilisation d'hormones synthétiques pour la production d'aliments pour poissons (Chakraborty, Horn et Hancz, 2013).

Aujourd'hui, la nécessité de remplacer les antibiotiques et autres produits chimiques synthétiques, dans l'optique de chercher des alternatives et d'agents thérapeutiques, par des suppléments alimentaires ou des ingrédients capables de renforcer l'immunité des poissons, d'améliorer leur croissance, leur capacité d'utilisation des aliments et, en fin de

compte, d'assurer la sécurité et la bonne qualité des produits issus de l'aquaculture devient de plus en plus vitale ([Seyfried et al., 2013](#)).

Les écosystèmes marins ouvrent un vaste horizon avec un grand potentiel pour la découverte de nouveaux antimicrobiens d'origine biologique, principalement parce qu'ils constituent les habitats les plus étendus et les plus diversifiés sur le plan environnemental colonisés par des êtres vivants sur Terre. De plus, comme ils sont considérés comme les environnements les plus anciens à partir desquels la vie est née et s'est développée, ils abritent actuellement la plus grande biodiversité, ainsi que la biomasse ([Pomponi, S.A ,1999](#)).

En termes d'activité antimicrobienne, les constituants qui se distinguent sont ceux contenant des composés aromatiques oxygénés avec des groupes carbonyle (aldéhydes et cétones), des phénols, des éthers ou des acides, suivis par des terpènes aliphatiques oxygénés ([Nogueira JO et al.,2021](#)).

Les extraits de plantes contiennent également des composés phytochimiques intéressants. Ceux qui se démarquent, comme les composés phénoliques, ont des activités antioxydants et antimicrobiennes. Il existe notamment les tanins et les flavonoïdes qui peuvent être sous-classés en flavones, flavanones, flavonols, flavanonols, isoflavones, catéchines et anthocyanidines ([Difonzo G et al.,2021](#)), ([Pereira RJ et Cardoso MG.,2012](#)).

Dans ce contexte, Le présent travail a pour objectif de tester in vitro l'activité antibactérienne à base d'extrait hydro-méthanolique, , un éventuel effet de synergie vis-à-vis de différentes souches bactériennes pathogènes. De tester in vivo l'efficacité de notre chez le modèle biologique poisson tilapia *Oreochromis sp* et finalement, mesurer sur les performances sur le profil microbiologique nutritionnel chez l'espèce et l'eau d'élevage.

I. La préparation des extraits Brutes, extrait hydro-méthanolique et nanoparticule d'argent de *P.oceanica*

1. Matériel végétal

- **Effets antidiabétiques, antioxydants et vasoprotecteurs**
- **Richesse en molécules antioxydants et antibactérienne** (phénols naturels, dérivés du phénylméthane, dérivés du phényléthane, dérivés du phénylpropane et leurs esters, chalcones, flavonols)
- **Richesse en composés cosméceutiques**

2. Études antérieures : Ces dernières années, un nombre croissant d'études ont permis d'approfondir les connaissances faisant de ces herbiers une source potentielle utile de molécules antioxydantes, pour lutter contre le stress oxydatif, responsable de la formation de rides, du vieillissement cutané, du cancer et des maladies cardiovasculaires

3. Récolte

Au total, 10 kg de fascicules foliaires frais détachés (POV et POD), non encore déposés le long de la côte Est-Algérienne pour former des banquettes, ont été collectés pour des fins scientifiques



Figure 2. Collecte des échantillons (*Séchage et conservation*)

4. Préparation des extraits

Parallèlement nous avons préparé les trois (03) extraits de la plante *P. oceanica* (POV et POD).

4.1 Extrait Hydro-méthanolique

La préparation d'extrait hydro-méthanolique a été réalisée selon la méthode décrite par [\(Matkowski et Piotrowska, 2006\)](#), adaptée selon les moyens disponibles.

- Les feuilles (POD et POV) séchées ont été broyées à l'aide d'un broyeur électrique afin d'obtenir une poudre fine, puis la poudre de la plante a été conservée dans des petits sacs en papier kraft.
- Le tamisage de la poudre a été réalisé avec un tamis.
- 40 g de la poudre de la matière végétale ont été mesurés à l'aide d'un bécher et d'une balance.
- Dans une éprouvette graduée, 320 ml de méthanol ont été versés, et l'ajout a été poursuivi avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un volume total de 400 ml, en maintenant un rapport

méthanol-eau de 70/30 (v/v).

- 250g de la poudre POD est macéré dans 700ml du méthanol et 300ml d'eau distillé, le mélange est laissé dans une bêche couverte d'aluminium pendant 3 jours à température ambiante.
- Le macérât a été versé dans un flacon de verre teinté, placé sur un agitateur magnétique, et laissé sous agitation continue à température ambiante pendant 72 heures.
- Après 72 heures, l'extrait hydro-méthanolique a été filtré avec du papier filtre Wattman n°3.
- Le filtrat a été concentré à 80°C jusqu'à siccité dans un évaporateur rotatif (Buchi Rotavapor R-114) pour donner un résidu solide et les extraits séchés ont été conservés à l'obscurité dans des boîtes pétries à 4°C avant analyse.

II. Activité antimicrobienne des extraits (POD et POV)

1. Souches microbiennes

Les germes utilisés sont des souches de référence ATCC (American Type Culture Collection), ils constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles ou de synthèses. Ces souches sont conservées sur une gélose inclinée à 4°C (**Tab.1**).

Tableau 1 : Tableau descriptif des différentes souches bactérienne utilisées (ATCC)

Bactérie	Description	Pouvoir pathogène	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	<i>S. aureus</i> ATCC est un membre de la famille des <i>Micrococcaceae</i> . À l'examen microscopique, les organismes se présentent sous la forme de cocci à Gram positifs regroupés en grappes, diamètre moyen 0,8 à 1 µm. La grande majorité des souches de <i>S. aureus</i> sont capsulées, mais les souches peuvent perdre leur capsule après culture (Yves & Gantier, 2009).	Peut être à l'origine de toxi- infections alimentaires, entérocolites aiguës, syndrome de choc toxique, infection suppuratives, d'infection cutanées, des septicémies, sous-cutanées, muqueuses staphylococcies osseuses, pleuropulmonaires, urogénitales, neuroméningées et l'endocardite staphylococcique (Yves & Gantier, 2009).	ATCC 27853 Italie (l'enrichissement au laboratoire le CQA-Skikda)
<i>Escherichia coli</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC est une bactérie à Gram négative, appartenant à la famille des Entérobactéries. Elle possède des structures appelées fimbriaes ou pilis qui lui permettent de s'adhérer aux surfaces muqueuses des hôtes. La plupart des souches d' <i>E. coli</i> sont lactose positives et peuvent fermenter le lactose (Martak et al., 2013).	Les infections intestinales causées par <i>Escherichia coli</i> ATCC (<i>E. coli</i>) peuvent se présenter sous différentes formes. Tels que Les ETEC sont responsables de la diarrhée du voyageur, et l'EHEC qui entraîne une diarrhée sanglante. En dehors de l'intestin, <i>E. coli</i> est également responsable d'infections des voies urinaires, de méningites néonatales et d'infections nosocomiales telles que la septicémie, le choc endotoxique et la pneumonie (Martak et al., 2013)..	ATCC 25922 Italie (l'enrichissement au laboratoire le CQA-Skikda)

Bactérie	Description	Pouvoir pathogène	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC est une bactérie Gram-négative anaérobie en forme de bâtonnet, elle appartient à la famille des <i>Enterobacteriaceae</i> . C'est une commensale normale qui vit dans la bouche et les intestins. Cependant, lorsque <i>Klebsiella</i> est transportée ailleurs, elle devient pathogène et est souvent associée à des infections des voies urinaires, des plaies et des infections respiratoire (Toudji et al. 2018)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC provoque une pneumonie sévère, en particulier chez les patients ventilé (Toudji et al. 2018)Elle cause des infections des voies urinaires, des infections de plaies, des bactériémies et des méningites, et rarement des diarrhées(Toudji et al. 2018)	ATCC 25923 Italie (l'enrichissement au laboratoire le CQA-Skikda)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC C'est la seule espèce du genre <i>Listeria</i> pathogène pour l'homme. Ils sont saprophytes dans le sol, l'eau, les eaux usées et les plantes et Ils résistent aux effets de la congélation, du séchage, de la chaleur élevée, de la teneur élevée en sel et du pH élevé. C'est l'espèce de bactérie pathogène qui cause l'infection listériose. (Sagar Aryal 2021).	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC est une bactérie pathogène responsable de la listériose. Principalement transmise par des aliments contaminés.	ATCC 29212 Italie (l'enrichissement au laboratoire le CQA-Skikda)

2. Les milieux de culture

Les milieux de culture utilisés pour la revivification et l'étude de l'activité antimicrobienne sont présentés dans le **tableau 2**

Tableau 2 : Les milieux de cultures utilisés dans l'activité antimicrobienne.

Milieux	Utilisation
Gélose Chapman : <i>Staphylococcus aureus</i>	Préparation des cultures jeunes
Gélose Hektoen : <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Escherichia coli</i>	
Viande de foie : <i>Clostridium</i>	
Gélose Muller Hinton : Toutes les souches	Tests antimicrobiens

3. Les extraits testés

- Extraits hydro-méthanolique des feuilles de *P. ocaïca* (POD ; POV)
- Extraits Bruts des feuilles de *P. ocaïca* (POD ; POV)
- Extraits de Nanoparticule des feuilles de *P. ocaïca* (POD ; POV)

4. Préparation des cultures jeunes

L'activité antimicrobienne doit être réalisée sur des souches microbienne jeunes en phase de la croissance exponentielle.

La réactivation des cultures a été effectuée par repiquage sur trois milieux de cultures favorables à leur croissance (Chapman pour *Staphylococcus aureus* ; Hektoen pour *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae* et viande de foie pour *Clostridium*). Après préparation, les milieux ont été coulés dans des boîtes de Pétri, puis incubés après l'ensemencement à 37°C pendant 18 à 24 heures.

5. La mesure de la charge bactérienne

Nous avons utilisé la méthode de mise en suspension directement à partir des colonies en réalisant une suspension bactérienne en solution salée pour atteindre une turbidité équivalente à celle de l'étalon 0,5 de la gamme de McFarland, ce qui correspond à un inoculum d'environ

1 à 2×10^8 UFC/ml pour *Escherichia coli*. Cette méthode convient pour toutes les bactéries y compris à croissance lente.



Figure 6 : les tue de Macfarland (prise personnelle).

6. Observation microscopique

Les souches microbiennes ont été observées sous microscope optique pour déterminer leur aspect microbiologique (objectif X 100). La coloration de Gram a été réalisée pour les souches bactériennes en parallèle avec d'autres tests confirmatifs.

6.1 La coloration de Gram

a) Principe

La coloration de Gram fut développée en 1884 par le bactériologiste Danois Hans Christian Gram. Il s'agit d'une des procédures de coloration les plus utiles car elle permet de classer les bactéries en deux grands groupes : les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Komono et al., 2020).

b) Mode opératoire

- Une lame a été nettoyée à l'alcool, puis une goutte d'eau a été déposée sur la lame.
- À l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie a été prélevée puis délicatement mélangée dans la goutte d'eau. Ensuite, la lame a été passée 3 fois dans la petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.
- Quelques gouttes de solution du violet de Gentiane (cristal violet) ont été déposées sur le frottis fixé et laissées agir pendant 1 minute.
- Ensuite, la lame a été brièvement rincée en faisant couler de l'eau sur la lame au-dessus du frottis (pas directement sur le frottis).
- Puis quelques gouttes de Lugol ont été déposées sur le frottis. Après 1 minute, il a été

décoloré avec de l'alcool (pendant 5 à 10 secondes) puis rincé de nouveau avec de l'eau.

- Ensuite, la Fuchsine a été déposée pendant 1 minute, puis la lame a été rincée une dernière fois avec de l'eau avant de passer à l'observation microscopique (grossissement 100x ou, avec une goutte d'huile à immersion).

7. Préparation de l'inoculum

Pour préparer l'inoculum, trois à cinq colonies similaires bien isolées de chaque souche ont été déchargées dans des écouvillons stériles contenant 5 ml d'eau physiologique stérile (0,9%). Ensuite, la suspension bactérienne a été bien homogénéisée jusqu'à ce que son opacité soit équivalente à 0,5 McFarland, (El Atki et al., 2020). L'inoculum devait être ensemencé dans les 15 minutes suivant sa préparation.

8. Etude de l'activité antibactérienne des Extraits (hydro-méthanolique ; brut et Nanoparticule d'argent) de POD et POV

2.1 Méthode de diffusion des disques

Selon (Amara et al, 2017) :

Préparation de solution : Nous avons préparé une solution mère contenant 10 ml de DMSO et 1 ml d'extrait. Nous avons préparé des boîtes de Pétri en versant 20 ml de gélose Mueller Hinton (MH), qu'on a laissé solidifier et sécher pendant 30 minutes.

Ensemencement : Nous avons ensemencé les suspensions microbiennes standardisées à l'aide des écouvillons stériles.

Application des disques : Nous avons imprégné des disques de papier Wattman n°03 stérilisés de 6 mm de diamètre avec 10ml de solution mère pour obtenir des concentrations respectives de 2 et 4 mg/disque, puis on les a déposés sur la gélose. Nous avons préparé également des boîtes contenant des disques imprégnés de 10 µL de chaque extrait pur.

Nous avons utilisé des disques imprégnés de DMSO comme témoins négatifs dans les mêmes conditions.

Incubation : la lecture des résultats après la diffusion des extraits à 4°C pendant 3 heures, suivie d'une incubation de 24 heures à 37°C. Chaque essai est réalisé en deux répétitions.

La lecture : des résultats s'est faite par la mesure de diamètre de la zone d'inhibition (**Fig. 7**) selon (SFM., 2023 ; Ponce et al., 2003).

- **Non sensible (-)** ou résistante : diamètre moins de 8 mm
- **Sensible (+)** : diamètre entre 9 à 14 mm
- **Très sensible (++)** : diamètre compris entre 15 à 19 mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre plus de 20 mm

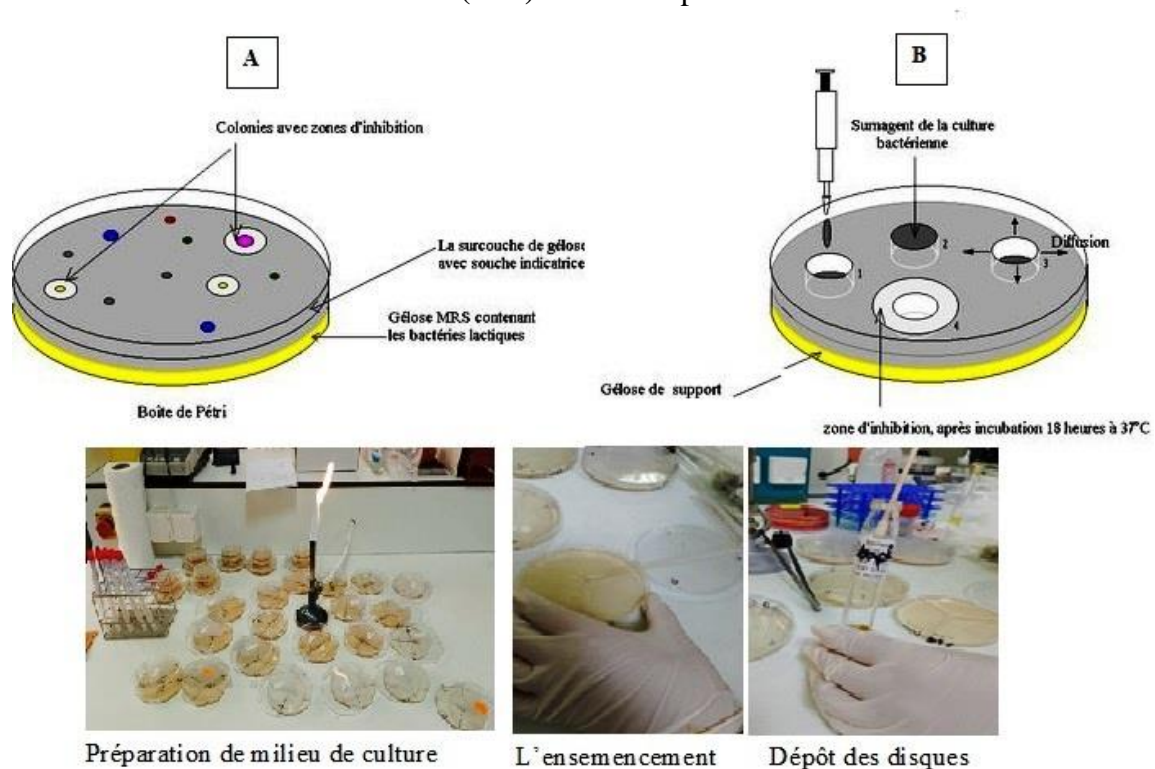


Figure 7 : Méthode de détermination des diamètres des zones d'inhibition des extraits (Photo personnelle).

2.2 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

C'est la plus faible concentration de la molécule à tester qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique et l'approche la plus utilisée pour évaluer *in vitro* l'activité bactériostatique d'une nouvelle molécule à activité antibactérienne (Carryn, 2013).

Préparations des dilutions des extraits : Nous avons réalisé une série de dilutions de chacun de nos extraits de (POV.POD) avec le DMSO en suivant la méthode de dilution spécifique à chaque extrait (1g /10ml) (**Fig.8**).

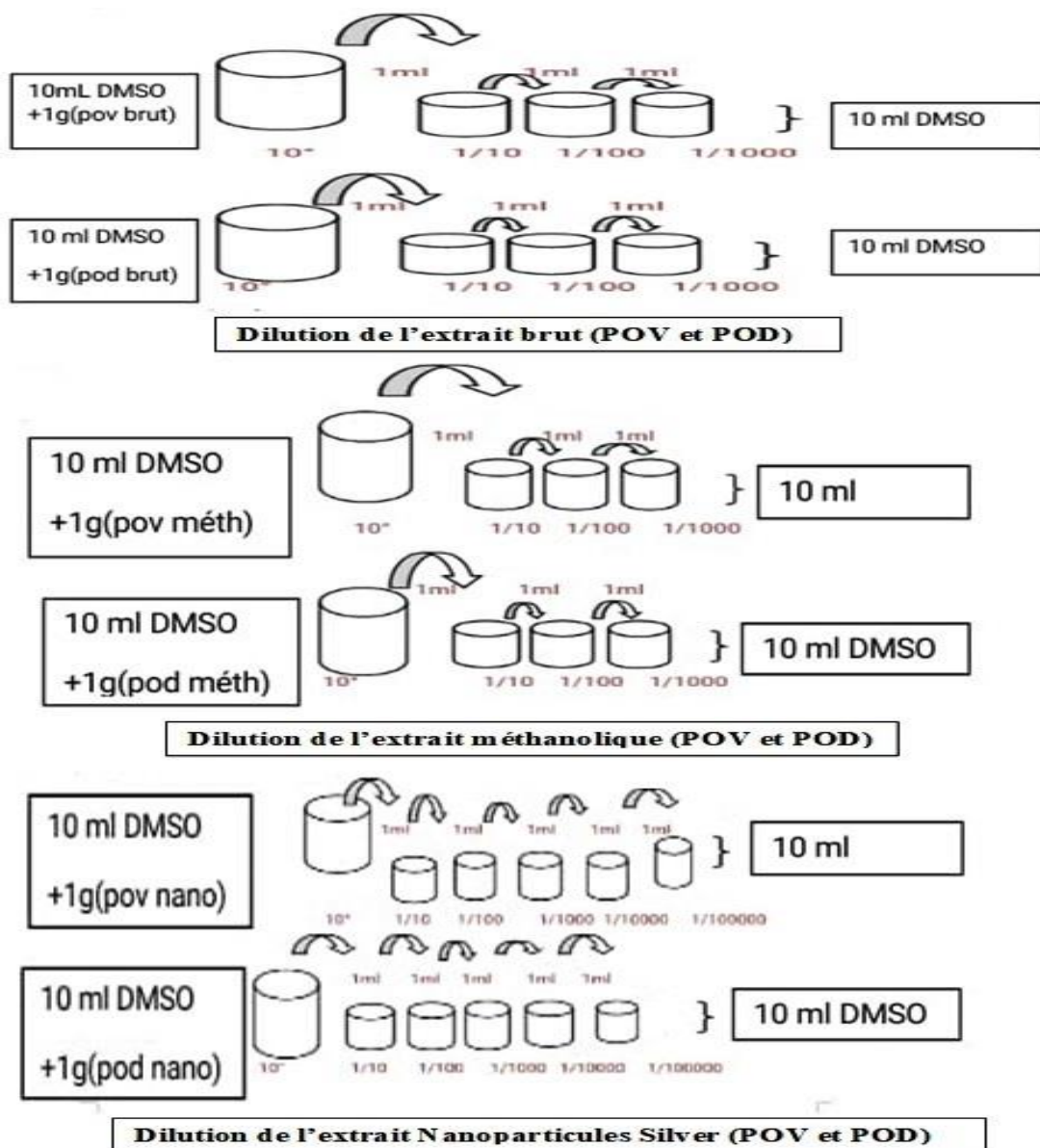


Figure 8. Préparation des dilutions d'extrait hydro-méthanolique.

Préparation D'inoculum : Pour préparer l'inoculum ,2 colonies bactériennes ont été prélevées à l'aide d'une pipette pasteur et émulsionnées dans un tube à essai contenant 10ml de bouillon Muller-Hinton stérile (BMH). Le mélange a été incubé à 37° pendant 3heures. Après ce temps d'incubation, un volume de 0,3 ml de cette pré-culture bactérienne a été prélevé, transféré dans 10ml bouillon Muller-Hinton stérile et homogénéisé à l'aide d'un vortex. La charge bactérienne de cet inoculum bactérien est de 10^6 UFC.

L'ensemencement

Selon la méthode de [Kumar \(2016\)](#)

Par écouvillonnage, nous avons trempé un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne et laisser s'imbiber. En l'essorant doucement sur la paroi. L'ensemencement de la boîte de Mueller-Hinton (gélose est de 22 mm), en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3 fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum. L'application en parallèle des dilutions des extraits (POD, POV) (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}). **(Fig.9).**

Lecture : La lecture après l'incubation des boîtes 37°C pendant 24 heures.

2.3 Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB)

Selon [\(CA-SFM, 1998\)](#)

Principe : C'est la plus faible concentration de la molécule à tester capable de tuer les bactéries après 24 h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique. On détermine la CMB en transférant un échantillon des tubes ne présentant pas de Croissance dans un milieu frais dépourvu des molécules à tester [\(Carryn, 2013\)](#). **(Fig.9).**

Méthode (bactéricide, bactériostatique) : Prélève à l'aide d'une anse de platine une colonie bactérienne bien isolée (colonie précisée) et mis la surface de la gélose MH coulé dans chaque boîte de pétrie. A l'aide d'une anse étalé la suspension bactérienne et devisé la surface de la gélose MH, laisse les boîtes de pétri. Séché pendant quelque minute. Nous avons Appliquer les disques à l'aide d'une pince préalablement flambée, en appuyant légèrement. Les disques doivent être parfaitement appliqués à plat sans glissement. Une distance minimale de 15 mm doit séparer un disque périphérique du bord de la boîte, et chaque disque doit être éloigné au minimum de 30 mm des autres ou bien Incuber les boîtes à 37°C pendant 24 heures, couvercle en bas.

Lecture : La lecture après l'incubation des boîtes 37°C pendant 24 heures.

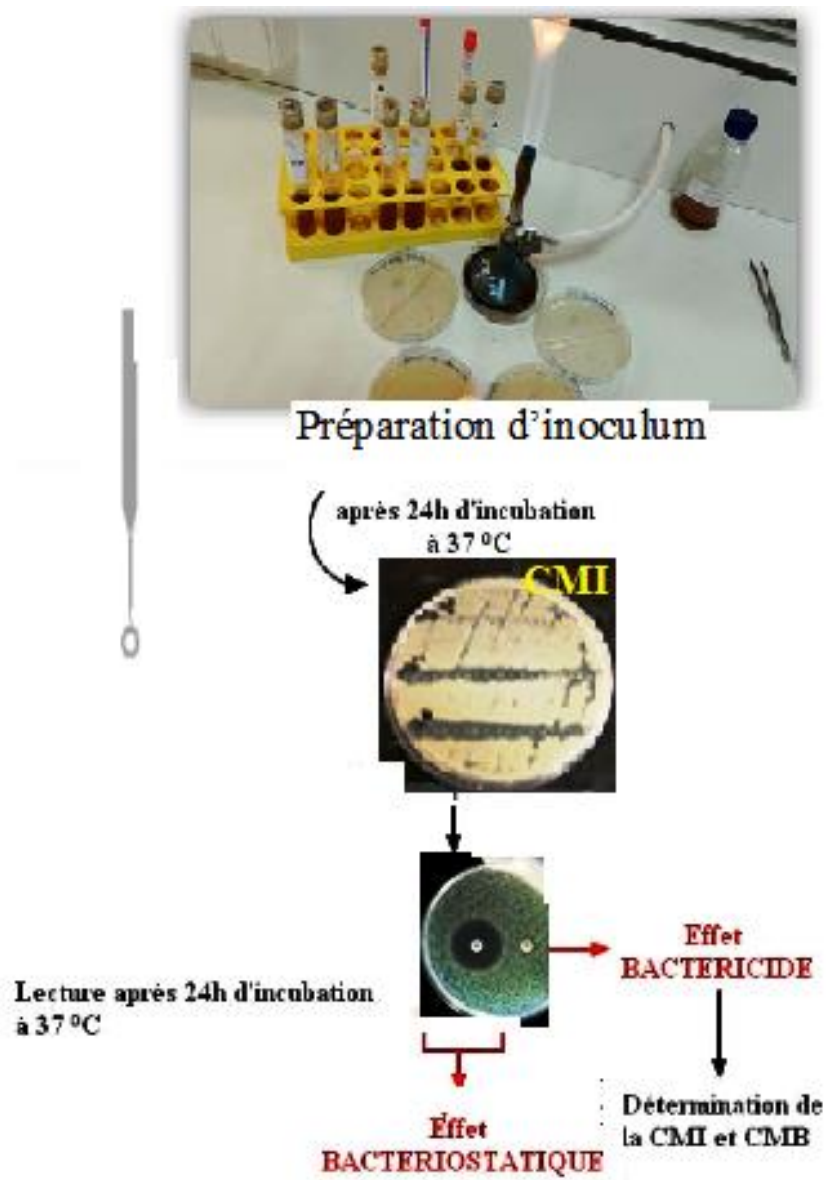


Figure : 9 Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide (CMI, CMB)

III. Animal expérimental Poisson Tilapia *Oreochromis sp* « in vivo »

L'espèce *Oreochromis sp.* (Tilapia Du Nil Hybride avec le tilapia rouge, Cichlidae) a été sélectionnée comme organisme modèle pour cette étude. Des spécimens de tilapia (*Oreochromis sp*) ont été collectés d'une station d'élevage au Nord de Skikda (c) et de la ferme aquacole au Sahara (b). Les poissons pesant entre. (50±30g). (Fig. 10).



Figure 10 : Animal expérimental Poisson Tilapia *Oreochromis sp* (photo personnel)

Aquari-experimentale

Au cours de notre travail, nous avons également rencontré des difficultés avec l'adaptation des Bioessaies cause de quoi nous avons enregistré la mort de ces derniers jusqu'à ce que nous parvenions à ajuster leur nature appropriée. Après l'acclimatation des Bioessaies, En premier lieu, nous avons réalisé suit :

- Un contrôle macroscopique quotidien des poissons d'aquarium
- Les différentes mensurations (biométrie, taille, Poids, sexe)
- Un prélèvement quotidien des paramètres physico-chimiques de l'eau des aquariums
- Un diagnostic de la flore bactériologique Initial

Lors de cette étude, La formulation des aliments à base **d'extrait hydro-méthanolique** de *P.oceanica* (POV et POD) est réalisée sur la base de ces données et des besoins nutritionnels du tilapia du Nil. (Jauncey, K.; Ross, B. 1982) . Par la suite, Nous avons nourris nos bioessaies comme le mentionne le tableau (3) ci-dessous.

1. Echantillonnage et analyse bactériologique (eau et poisson d'essai)

2.1 Contrôle de qualité microbiologique de l'eau d'aquarium

L'échantillon destiné à l'analyse de l'eau est prélevé de façon à être le plus exactement possible représentatif du milieu d'où il provient. Dans ce travail, nous avons fait trois (03) prélèvements avant et après traitement (Témoin, POV, POD). Nous avons effectué l'étude des paramètres bactériologiques de l'eau d'élevage selon la méthode de nombre le plus probable (NPP) appelée aussi la colimétrie.

Un choix de techniques appliquées à la recherche des bactéries indicatrices de pollution et d'efficacité de traitement (bactéries aérobies revivifiables, *coliformes totaux*, *coliformes fécaux*, *streptocoques fécaux*, anaérobies sulfite-réducteurs), (AZIZI DJAMAL,2021).

Nous avons aussi réalisé la recherche des bactéries spécifiques, pathogènes strictes ou pathogènes opportunistes. (AZIZI DJAMAL,2021) l'ensemble des protocoles microbiologiques de l'eau réalisées sont mentionnés en **annexe 1**

Prélèvement

Selon travaux pratiques assurés par : (AZIZI DJAMAL,2021)

- Nous avons utilisé des flacons en verre de 100, 250, 500 ou 1000 ml
- Avant l'usage, ces flacons doivent être soigneusement lavés, puis rincés car il ne doit rester aucune trace d'un éventuel détergent ou antiseptique.
- Stériliser soit à l'autoclave (120 °C) durant 15 minutes, soit au four Pasteur (170 °C) durant 1 heure.

Transport : les prélèvements de l'eau sont transportés dans des glacières 4 à 6 °C.

2.2 Contrôle de qualité microbiologique alimentaire

Des prélèvements des poissons frais du Tilapia *Oreochromis sp* (témoin et supplémenté) ont été effectués du Février jusqu'au Mars 2024, Au total nous avons réalisé deux (02) prélèvements (avant et après traitement).

Une fois prélevés, les échantillons sont acheminés directement dans des glaciers ($T^{\circ}4^{\circ}C$) vers du laboratoire d'hygiène (unité alimentaire) de wilaya de Skikda. **Selon la réglementation Algérienne de contrôle de qualité alimentaire des produits aquacole (JORADP, 2017) (Fig. 11).** L'ensemble des protocoles microbiologiques de la qualité de la chair des poissons réalisées sont mentionnés en **annexe 2**

MINISTÈRE DU COMMERCE					
Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.					
5- Produits de la pêche et de l'aquaculture					
Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Produits de la pêche et de l'aquaculture fabriqués à partir d'espèces de poissons associés à une grande quantité d'histidine (1) (2)	Histamine	9	2	100 mg/kg	200 mg/kg
Produits de la pêche et de l'aquaculture ayant subi un traitement de maturation aux enzymes dans la saumure, fabriqués à partir d'espèces de poissons associés à une grande quantité d'histidine à l'exception de sauce de poisson (1)	Histamine	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg
Sauce de poisson produite par fermentation de produits de la pêche et de l'aquaculture	Histamine	1	—	400 mg/kg	
Poissons, céphalopodes et mollusques crus (sauf mollusques bivalves vivants) (3)	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10^6	10^7
	Coliformes thermotolérants	5	2	10	10^2
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10^2	10^3
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 g	

Figure :11 Critères microbiologiques des denrées alimentaires produits de pêches (JORADP.2017).

1. Le rendement de l'extrait hydro-méthanolique, brut et nanoparticule *P. oceanica*

Le rendement de la matière végétale de *Posidonia oceanica* dépend de sa structure chimique, de la taille des particules constituant l'échantillon, du temps, des conditions de stockage, ainsi que de la présence d'interférences (Smith *et al.*, 2021). Dans notre cas, avant de procéder à l'extraction, nous avons d'abord séché le matériel végétal à l'air libre et à l'abri de la lumière, conformément aux recommandations de (Lopez et Hernandez, 2019), afin d'éviter la dégradation de certains composés phénoliques sous l'effet des hydrolases présentes dans le matériel végétal frais.

Tableau 6 : Le calcul de rendement

Type d'extrait	Le rendement	
	POV	POD
Extrait hydro-méthanolique	13,5%	5%

Aamir Hussain Dar, Newsheeba Rashid, Ishrat Majid, Shafat Hussain & Muneer Ahmed Dar (2019): Nanotechnology interventions in aquaculture and seafood preservation, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI: 10.1080/10408398.2019.1617232.

Abdelmohsen, M. M., Hassanein, H. D., Hassan, R. A., Abreu, A. C., Simões, M., Nazif, N. M., & Abou-Setta, L. M. (2016). Phytochemical analysis, in vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of phenolic extracts from *Posidonia oceanica* (L.) Delile leaves. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 8(6), 449-457.

Ahmad, S. A., Das, S. S., Khatoon, A., Ansari, M. T., Afzal, M., Hasnain, M. S., & Nayak, A. K. (2020). Bactericidal activity of silver nanoparticles: A mechanistic review. *Materials Science for Energy Technologies*, 3, 756-769.

Alkan, D., Yemenicioglu, A., 2016. Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film technology against bacterial plant pathogens. *Food Hydrocolloids* 55, 1–10.

Alothman, M.; Bhat, R.; Karim, A.A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. *Food Chem.* 2009, 115, 785–788. [CrossRef]

Amara, N., Boughérara, Y. (2017). Activité antibactérienne de l'huile essentielle du Cyprès vert (*Cupressus Sempervirens* L.). *Algerian Journal of Natural Products*. 5(2): 455-462.

Anwar, F.; Kalsoom, U.; Sultana, B.; Mushtaq, M.; Mehmood, T.; Arshad, H.A. Effect of drying method and extraction solvent on the total phenolics and antioxidant activity of cauliflower (*Brassica oleracea* L.) Extracts. *Int. Food Res. J.* 2013, 20, 653–659.

AZIZI DJAMAL,2021) travaux pratiques assures □ Laboratoire de la santé de la Wilaya (Cité Frères Bouhadja, SKIKDA

Ballesteros E, Martin D, Uriz J. Biological activity of extracts from some Mediterranean Macrophytes. *Botanica Marina* 1992;35:481-485.

Basha, K. A., Raman, R. P., Pradsad, K. P., Kumar, K., Nilavan, E., & Kumar, S. (2013). Effect of dietary supplemented andrographolide on growth, non-specific immune parameters and resistance against *Aeromonas hydrophila* in *Labeo rohita* (Hamilton). *Fish & Shellfish Immunology*, 35, 1433–1441. doi:10.1016/j.fsi.2013.08.005. mémoire de master, université 20 AOUT 1955- SKIKDA.

Bassetti, M.; Merelli, M.; Temperoni, C.; Astilean, A. New antibiotics for bad bugs: Where are we? *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2013, 12, 22. [CrossRef]

