REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEURE ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DE MEDEA

FACULTE DES SCIENCES

Mémoire

Présenté pour obtenir le diplôme de **Master**

En Sciences de la nature et de la vie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Par :

KHELIL CHERFI Safaa

Thème :

Comparaison de la physiologie des communautés bactériennes associées aux copépodes isolées de différents environnements marins

Soutenue publiquement le : 28 / 06 / 2025. Devant le jury composé de :

RAHAL M.	**MCA**	U. Médéa	Président
FOUDIL M.	**MAA**	U. Médéa	Examinateur
CHAOUADI M.	**MCB**	U. Médéa	Encadreur
BOUHERAMA A.	**MCB**	USTHB	Co-Encadreur

Année universitaire 2024/2025

RESUME

Ce mémoire explore la diversité et la physiologie des communautés bactériennes associées à deux espèces de copépodes marins, *Acartia tonsa* et *Centropages typicus*, prélevées respectivement près d'une station de dessalement et d'une ferme aquacole en Algérie. L'étude vise à comprendre comment les pressions anthropiques influencent les interactions hôte-microbiome dans ces environnements côtiers. Une série d'analyses microbiologiques a été conduite sur les compartiments endo- et exo-biotiques des copépodes : dénombrement bactérien, caractérisation phénotypique, tests enzymatiques (protéase, uréase, phosphatase, amylase), coloration de Gram, test de catalase et tolérance à la salinité.

Les résultats montrent une diversité significative de communautés bactériennes associées à *Centropages typicus* et *Acartia tonsa*, avec des adaptations morphologiques et physiologiques spécifiques aux environnements endobiotiques et exobiotiques. Une densité bactérienne plus élevée chez *C. typicus*, particulièrement au niveau exo-biotique, tandis que les bactéries associées à *A. tonsa* montrent une plus grande tolérance à la salinité, en cohérence avec son habitat plus variable. Les analyses enzymatiques ont mis en évidence des capacités métaboliques différenciées entre les isolats, avec une activité amylasique plus fréquente et une production d'uréase significative dans certaines souches. La majorité des isolats étaient Gram-positifs, à morphologie coccobacillaire. Cette étude souligne l'influence de l'environnement sur la composition et les propriétés fonctionnelles des microbiomes copépodiques, apportant un éclairage pertinent sur leur rôle écologique et leur potentiel biotechnologique dans les écosystèmes marins méditerranéens.

Mots clés : copépodes, bactéries planctonique, biodiversité, endobiotique, exobiotique,

Abstract

This thesis explores the diversity and physiology of bacterial communities associated with two species of marine copepods *Acartia tonsa* and Centropages *typicus*, sampled near a desalination plant and an aquaculture farm in Algeria, respectively. The study aims to understand how anthropogenic pressures influence host-microbiome interactions in these coastal environments. A series of microbiological analyses was conducted on the endo- and exo-biotic compartments of the copepods: bacterial counts, phenotypic characterization, enzymatic assays (protease, urease, phosphatase, amylase), Gram staining, catalase test, and salinity tolerance.

Results reveal a significant diversity of bacterial communities associated with Centropages *typicus* and Acartia *tonsa*, with specific morphological and physiological adaptations to endo- and exo-biotic environments. A higher bacterial density was observed in *C. typicus*, particularly in the exo-biotic compartment, while bacteria associated with *A. tonsa* showed greater salinity tolerance, consistent with its more variable habitat. Enzymatic analyses highlighted differentiated metabolic capacities among the isolates, with more frequent amylase activity and significant urease production in some strains. The majority of isolates were Gram-positive, with coccobacillary morphology.

This study underscores the influence of the environment on the composition and functional properties of copepod microbiomes, providing relevant insight into their ecological roles and biotechnological potential in Mediterranean marine ecosystems.

Keywords: copepods, planktonic bacteria, biodiversity, exo-biotic, endo-biotic,

ملخص

يستكشف هذا البحث تنوع وظائف المجتمعات البكتيرية المرتبطة بنوعين من القشريات البحرية, *Acartia tonsa* و Centropages *typicus* , المأخوذة من عينات قريبة من محطة لتحلية المياه ومزرعة سمكية في الجزائر, على التوالي. ويهدف البحث إلى فهم كيفية تأثير الضغوط البشرية على التفاعلات بين العائل و الميكروبيوم في هذه البيئات الساحلية. و قد أجريت سلسلة من التحليلات الميكروبيولوجية على المقاطع الداخلية و الخارجية من القشريات : تعداد البكتيريا, و الوصف الظاهري, واختبارات إنزيمية (البروتياز, اليورياز, الفوسفاتاز, الأميلاز), وصبغ جرام, واختبار الكاتلاز, وتحمل الملوحة.

أظهرت النتائج تنوعا كبيرا في المجتمعات البكتيرية المرتبطة بكل من Centropages *typicus* و Acartia *tonsa* مع تكيفات شكلية وظيفية خاصة بالبيئات الداخلية و الخارجية. و قد لوحت كثافة بكتيرية أعلى في *C. typicus*, *خاصة* في الجزء الخارجي, بينما أظهرت البكتيريا المرتبطة ب*A. tonsa* تحملا أكبر للملوحة, بما يتوافق مع بيئتها الأكثر تنوعا, أبرزت التحليلات الإنزيمية قدرات أيضية متباينة بين العزلات, مع نشاط أميلازي أكثر تواترا و انتاجا كبيرا لليورياز في بعض السلالات. وكانت غالبية العزلات موجبة جرام, ذات شكل عصوي كروي.

يسلط هذا البحث الضوء على تأثير البيئة على تركيب وخصائص وظائف ميكروبيومات القشريات, مما يوفر فهما دقيقا لأدوارها البيئية و إمكانياتها التكنولوجية الحيوية في النظم البيئية البحرية المتوسطية.

الكلمات المفتاحية : القشريات, البكتيريا العوالق, التنوع البيولوجي, المقاطع الداخلية من القشريات, المقاطع الخارجية من القشريات .

REMERCIMENTS

Avant d'entamer l'étude systématique des différentes parties de ce mémoire, j'ai tenons de remercier Allah, le tout-puissant d'avoir éclaire ma chemin de la science. je tenons à remercier monsieur **CHAOUADI Mustapha et Mme BOUHERAMA Amina** Docteurs à université "Yahia Farés" d'accepter de ma encadrer, et de ma avoir consacré le temps nécessaire pour la réalisation de ce travail. Ainsi pour sa gentillesse, ses encouragements et ses précieux conseils.

Mon remerciement s'adresse aussi à tous les membres du jury :

-Monsieur **RAHAL Mohamed** qui m'a fait le plaisir de présider ce jury, qu'il trouve ici mon profond respect.

-**monsieur FOUDIL Mohamed** pour avoir accepté d'examiner ce mémoire.
-j'ai remercié tout **le directeur du laboratoire pédagogique** de mettre à mon disposition les moyens et les produits nécessaires pour accomplir ce travail.
Enfin, j'ai remercié **les enseignants du département «Sciences de la nature et de la vie»** ainsi que toute personne ayant participé à l'élaboration de ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie cet humble travail avec amour, sincérité et fierté, à :

Mes chers ***parents*** *pour leur confiance, sacrifices et efforts.*

Mes chères sœurs : ***Zineb*** *,* ***Marwa*** *ainsi que mes frères* ***Hocine****,* ***Youcef*** *et* ***Mouhamed****, pour leur compréhension et encouragement.*

Les familles ***KHELIL CHERFI*** *et* ***BOUKHELKHEL.***

Mes chères amies ***Kaouther, Samah, Amina, Lina, aya , Fella, Khadija et monia***

pour tous les moments que ma partagé durant les années d'étude et amitié .

Tous ceux qui connaissent ***Safaa*** *de près ou de loin.*

Safaa...

Liste des abréviations

H_2O_2 : Eau oxygénée.

°C : Degrés Celsius.

CO_2 : Dioxyde de carbone.

DO : densité optique

H : Hydrogène.

h : Heure

H_2O : eau

H_2O_2 : Eau oxygénée.

ISP : L'indice de solubilisation.

LB : lysogène broth**.**

ml : Millilitre.

NaCl : chlorure de sodium

NH_3 : Ammoniac.

nm : Nanometre**.**

O_2 : oxygène

Ph : Potentiel Hydrogène.

TSA : Trypticase soy agar.

TSB : Trypticase soy bouillon.

µm: Micromètre

Sommaire

Introduction ……1

Chapitre I. Généralités

I. 1. Les Copépodes et leur Rôle Écologique 4
I. 1. 2. Stratégies d'alimentation des copépodes et leurs rôles dans le réseau trophique pélagique 4
I. 1. 3. Rôle dans les cycles biogéochimiques 5
I. 2. La communauté bactérienne marine 6
I. 2. 1. Diversité et structure 6
I. 2. 1. 1. Les communautés bactériennes benthique 6
I. 2. 1. 2. Les communautés bactériennes pélagiques 6
I. 2. 2. Fonctions des bactéries 7
I. 2. 3. Les interactions entre les bactéries planctoniques et les copépodes 8
I. 2. 3. 1. Associations endo-biotiques 8
I. 2. 3. 2. Associations exo biotiques 10
I. 2. 3. 3. Bactéries pathogènes liées aux copépodes 11

Chapitre II. Matériel & Méthodes

II. 1. Matériel 13
II. 1. 1 Matériel non biologique 13
II. 1. 2. Matériel biologique 13
II. 1. 2. 1. Echantillonnage 13
II. 1. 2. 2. Identification des espèces copépodes 15
II. 1. 2. 3. Les communautés bactériennes associées 15
II. 2. Méthodes 16
II. 2. 1. Dénombrement de la flore bactérienne 16
II. 2. 2. Criblage de l'activité enzymatique 16
II. 2. 2. 1. Protéase 16
II. 2. 2. 2. Uréase 17
II. 2. 2. 3. Phosphatase 17
II. 2. 2. 4. Amylase 18
II. 2. 3. Identification phénotypique 18
II. 2. 3. 1. Etude macroscopique 18
II. 2. 3. 2. Etude microscopique (Coloration de Gram) 18
II. 2. 4. Caractérisation physiologique 19

Chapitre III. Résultats & Discussion

III. 1. Densité bactérienne 21
III. 2. Etude de la diversité phénotypique des isolats 23

III. 3. Criblage de l'activité enzymatique 25
III. 3. 1. Protéase 25
III. 3. 2. Uréase 26
III. 3. 3. Phosphatase 28
III. 3. 4. Amylase 29
III. 4. La caractérisation phénotypique 31
III. 4. 1. Aspect microscopique 31
III. 4. 2. Catalase 33
III. 5. Caractérisation physiologique (Tolérance à la salinité) 35
III.6. Etude comparative : Analyse des profils biochimiques de souches bactériennes isolées de deux espèces de copépodes marins 38
Conclusion 41
Références bibliographiques 43

Liste des figures

Figure 1. Chaine trophique pélagique Sugier, K. (2019) 5
Figure 2. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les grands groupes incultivés parmi les souches cultivées en 2000 (Giovannoni et Rappé 2000) 6
Figure 3. Classification taxonomique de Centropages typicus et d'Acartia tonsa.....14
Figure 4. Localisation géographique des stations d'échantillonnage 14
Figure 5. Filet WORKING Party II (Tranter & Fraser, 1968).....15
Figure 6. Densité de la microflore associée à Centropages typicus 22
Figure 7. Densité de la microflore associée à Acartia tonsa.....23
Figure 8. Aspect macroscopique des différents morphotypes des isolats associés à Centropages typicus (a, b, c et d) et Acartia tonsa (e,f, g et h).....24
Figure 9. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de la protéase.....25
Figure 10. Mise en évidence de la production des protéases sur gélose au lait écrémé (a : colonie non productrice de protéase ; b : colonie productrice de protéase).....26
Figure 11. Mise en évidence de la production de l'uréase sur milieu à base de peptone 27
Figure 12. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de l'uréase.....27
Figure 13. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de phosphatase.....29
Figure 14. Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu NBRIP 29
Figure 15. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis l'amylase.....30
Figure 16. Colonie productrice d'amylase.....31
Figure 17. Aspect macroscopique des isolats 32
Figure 18. Aspect microscopique des isolats (coloration de gram) ……...…32
Figure 19. Nombre des souches Gram + et Gram - issues des copépodes CT et AT 33
Figure 20. Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase 34
Figure 21. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis le catalase.....34
Figure 22. Résultats par compartiment de la réaction vis à vis le catalase.....35
Figure 23. Influence de la salinité (Nacl = 100 mM) sur l'activité bactérienne 36
Figure 24. Influence de la salinité (Nacl = 200 mM) sur l'activité bactérienne 36
Figure 25. Influence de la salinité (Nacl = 300 mM) sur l'activité bactérienne 37
Figure 26. Dendrogramme et heatmap des activités enzymatiques bactériennes chez Acartia tonsa et Centropages typicus 39

Introduction

Introduction

Les écosystèmes marins méditerranéens se caractérisent par une biodiversité remarquable et des interactions biologiques complexes, particulièrement sensibles aux perturbations anthropiques (Coll et al., 2010 ; Lejeusne et al., 2010). Au cœur de ces écosystèmes, les copépodes (qui sont de petits crustacés aquatiques) constituent un maillon fondamental des réseaux trophiques pélagiques, assurant le transfert énergétique entre les producteurs primaires et les niveaux trophiques supérieurs (Siokou-Frangou et al., 2010 ; Calbet & Saiz, 2005). Ces organismes zooplanctoniques, largement distribués dans les eaux côtières méditerranéennes, hébergent des communautés bactériennes diversifiées (Tang et al., 2010 ; Grossart et al., 2010) dont les fonctions écologiques et les adaptations physiologiques demeurent encore mal comprises (Moisander et al., 2015).

Les copépodes constituent des hots pots pour des microorganismes adaptables, qui jouent un rôle central dans les cycles biogéochimiques (Feng et al., 2023). Les copépodes sont colonisés par des bactéries, particulièrement autour de la région orale et de l'anus ainsi que des appendices corporels, des parties intersegmentaires et de l'intestin (Bass et al., 2021). Les copépodes hébergent des communautés bactériennes diverses, qui réalisent collectivement des transformations biogéochimiques clés dans l'océan (Shoemaker et al., 2019), tandis que la variabilité observée dans le microbiome des copépodes marins révèle des associations stables masquées par la variabilité temporelle (Stock et al., 2014).

Le littoral algérien, s'étendant sur 1622 kilomètres le long de la Méditerranée occidentale, présente une diversité d'habitats marins soumis à des pressions anthropiques croissantes. L'intensification des activités aquacoles méditerranéennes s'accompagne d'impacts environnementaux significatifs. Cette pratique peut causer la propagation de résidus d'antibiotiques dans l'environnement marin, augmentant les taux de résistance aux antibiotiques chez les bactéries aquatiques et transférant cette résistance aux pathogènes humains (Tang et al., 2009). Les résidus d'antimicrobiens et les bactéries résistantes aux antimicrobiens sont souvent trouvés dans les environnements aquacoles. Ces derniers sont des réservoirs efficaces de bactéries résistantes aux antimicrobiens provenant de différentes sources (Calbet et al., 2007). L'aquaculture intensive constitue une source importante de déchets organiques et d'antibiotiques dans l'environnement marin, bien que leurs impacts sur les écosystèmes marins benthiques soient mal compris (Ianora & di Carlo, 1988).

Parallèlement, le milieu marin abrite des groupes bactériens distincts de ceux que l'on trouve dans les habitats terrestres ou d'eau douce. Certains de ces groupes sont constamment présents dans les océans, tandis que d'autres n'apparaissent qu'occasionnellement, en fonction de l'endroit ou de la saison (Polain, 2016).

Les bactéries jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des écosystèmes. Elles décomposent la matière organique provenant des niveaux trophiques supérieurs en carbone et en nutriments, rendant ainsi ces éléments à nouveau disponibles pour les autres organismes (Rossi, 2008). Le phytoplancton et les bactéries régulent de nombreuses fonctions essentielles dans les écosystèmes aquatiques. En tant que producteurs primaires et décomposeurs primaires de l'environnement aquatique, ils forment le sommet et la base de la chaîne alimentaire (Azzem et al., 1983 ; Petrou, 2023). Comprendre la relation entre les bactéries et les copépodes revêt donc une importance capitale dans le domaine biologique pour éclairer la dynamique de ces écosystèmes marins.

Le développement rapide des infrastructures de dessalement en Algérie répond aux défis hydriques nationaux mais génère des impacts environnementaux préoccupants sur les écosystèmes marins côtiers. L'étude comparative de la physiologie des communautés bactériennes associées aux copépodes provenant de deux environnements différents (fermes aquacoles et zones de rejet de dessalement) le long des côtes algériennes, représente un enjeu scientifique majeur pour la compréhension des mécanismes adaptatifs microbiens face aux perturbations anthropiques. Le potentiel biosynthétique des microorganismes dans l'océan ouvert reste largement inexploré en raison des limitations dans l'analyse des données résolues au niveau génomique à l'échelle globale (Shoemaker et al., 2019).

Cette étude vise à explorer la diversité bactérienne associée aux copépodes de la région algéroise à éclaircir les variations physiologiques et métaboliques des assemblages bactériens copépodiques en réponse aux gradients environnementaux induits par ces deux types d'activités humaines, contribuant ainsi à une meilleure compréhension des interactions hôte-microbiome dans les écosystèmes marins méditerranéens anthropisés. En utilisant les approches traditionnelles de la microbiologie ce qui implique d'identifier les différentes espèces bactériennes dans leur environnement, d'évaluer les interactions spécifiques avec les copépodes (comme la symbiose, le commensalisme ou la prédation), et d'analyser les facteurs environnementaux et biologiques influençant leur composition et abondance. Pour cela, nous commençons par observer la diversité et la densité des communautés bactériennes associées à *Acartia tensa* (AT) et *Centropages typicus* (CT). Ensuite, nous réalisons une étude

phénotypique pour caractériser morphologiquement ces communautés, en examinant des aspects tels que la taille, la couleur, l'aspect et la surface des colonies bactériennes. Dans le cadre de la caractérisation physiologique, nous évaluons la tolérance à la salinité des bactéries pour comprendre leur adaptation à différents environnements. En parallèle, un criblage de l'activité enzymatique est effectué, incluant des enzymes telles que la protéase, l'uréase, la phosphatase, et l'amylase.

Les recherches sont complétées par une étude de la coloration de Gram, une technique de classification différentielle qui permet de distinguer les bactéries selon les propriétés structurales de leur paroi cellulaire, ce qui a un impact sur leur physiologie et leur capacité à interagir avec les copépodes et d'autres organismes présents dans l'écosystème marin (Beveridge, 1981 ; Silhavy et al., 2010). Grâce à cette méthode intégrée, nous pourrons approfondir notre compréhension des relations phylogénétiques et fonctionnelles entre les différents groupes bactériens associés aux copépodes, ainsi que de leur rôle différentiel dans la dynamique écologique des milieux marins (Madigan et al., 2019).

Dans le domaine de la biologie, il est essentiel de saisir la variété bactérienne liée aux copépodes et à ses interactions avec ces crustacés en Algérie afin de mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes marins locaux et de développer des stratégies de préservation et de gestion durable face aux pressions environnementales actuelles.

CHAPITRE I

Généralités

I. 1. Les Copépodes et leur Rôle Écologique

Les copépodes, appartenant à la sous-classe des Copepoda, sont des crustacés qui dominent le zooplancton marin (Benedetti, 2016), représentant 55 à 95 % de son abondance (Longhurst, 1985) et détiennent plus de 70% des biomasses zooplanctoniques (Razouls *et al.,* 2005-2025). Les copépodes surpassent probablement en nombre l'ensemble des autres métazoaires combinés, suivis par les insectes et les nématodes (Humes, 1994). La forte abondance en copépodes se manifeste dans une grande diversité d'écosystèmes aquatiques, caractérisés par des variations importantes de salinité, de température, de pH et de latitude.

Ils occupent divers habitats aquatiques. Leur adaptabilité leur permet de coloniser des environnements variés, des eaux hypersalines aux abysses océaniques. Environ un tiers des espèces de copépodes connues sont des parasites, infectant divers hôtes tels que les éponges, les mammifères, les reptiles et les poissons (Selden et al., 2010).

I. 1. 2. Stratégies d'alimentation des copépodes et leurs rôles dans le réseau trophique pélagique

Les copépodes ont des comportements alimentaires différentes : ils peuvent être des herbivores (phytophages), carnivores (prédateurs) ou bien des omnivores (alternent entre les deux comportements). Ils développent plusieurs stratégies afin de s'alimenter : alimentation par embuscade active (Active Ambush Feeding) ; alimentation par croisière (Cruise Feeding) ; alimentation par filtration (Filter Feeding) et alimentation mixte (Mixed Feeding). Dans le cas de cette dernière stratégie, les espèces passent d'une stratégie d'alimentation à une autre (Kiørboe, 2011).

Les copépodes, grâce à leurs teneurs élevés en protéines (44-52%) et en acides aminés, représentent une source naturelle de nourriture essentielle pour les larves de poissons marins. Ils sont largement utilisés en aquaculture, fournissant une nourriture pour les nauplii d'Artemia et des rotifères (O'tiryen & Mars, 2005).

Les copépodes sont des organismes clés dans les réseaux trophiques pélagiques en tant que liens avec les niveaux trophiques supérieurs (Zamora Terol, 2013). Ils occupent une place dans la chaîne alimentaire en tant que proie pour des organismes situés à des niveaux trophiques plus élevés (Fig. 1).

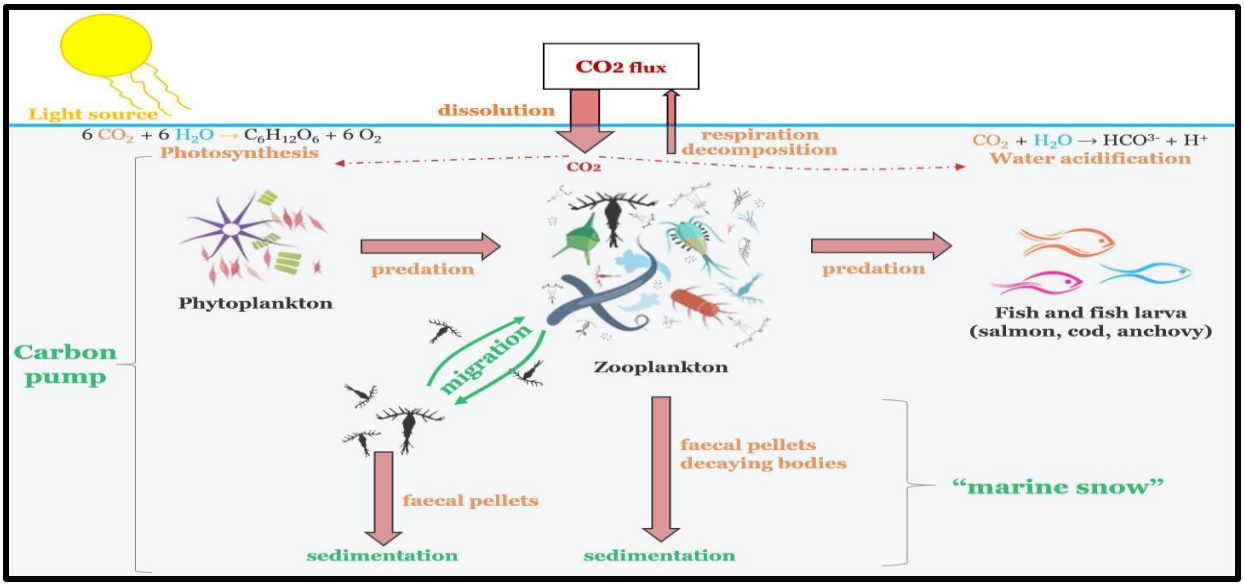


Figure 1. Chaine trophique pélagique Sugier, K. (2019)

Parmi leurs prédateurs figurent les larves de poissons à intérêt commercial telles que la sardine, le saumon et l'anchois (Sugier, 2019). En tant que maillons importants de la chaîne alimentaire, les copépodes jouent un rôle crucial dans le transfert d'énergie des producteurs primaires aux niveaux trophiques supérieurs.

I. 1. 3. Rôle dans les cycles biogéochimiques

Au sein du zooplancton, les copépodes jouent un rôle important dans le recyclage des nutriments dans les cycles biogéochimiques des océans, ils participent activement aux processus biogéochimiques de l'océan, notamment en influençant la dynamique du CO2 et le cycle des éléments grâce à leurs flux d'excrétion et de production de pellets fécaux (Zamora Terol, 2013).

Les copépodes jouent un rôle crucial dans les écosystèmes marins en tant que puits de carbone significatif et transporteurs actifs de nutriments essentiels tels que l'azote et le phosphore dans les océans profonds. Cela est principalement facilité par deux mécanismes principaux : la respiration et l'excrétion, notamment chez les espèces qui migrent à plus de 200 mètres de profondeur, accumulant des réserves lipidiques et entrant en diapause dans les eaux profondes, et la contribution à la formation de la neige marine, qui transporte efficacement du carbone et des nutriments vers les couches plus profondes de l'océan. Dans l'Atlantique Nord, les copépodes contribuent de manière significative à la pompe biologique du carbone. (Sugier, 2019).

I. 2. La communauté bactérienne marine

I. 2. 1. Diversité et structure

Le milieu marin héberge des groupes bactériens dont certains sont présents en permanence dans les océans, tandis que d'autres apparaissent de manière saisonnière ou ponctuelle. Elles sont majoritairement composées d'Alphaproteobacteria, Gammaproteobacteria et Bacteroidetes. Cependant, la composition peut varier selon qu'il s'agit de communautés bactériennes benthiques ou pélagiques (Polain, 2016) (Fig. 2).

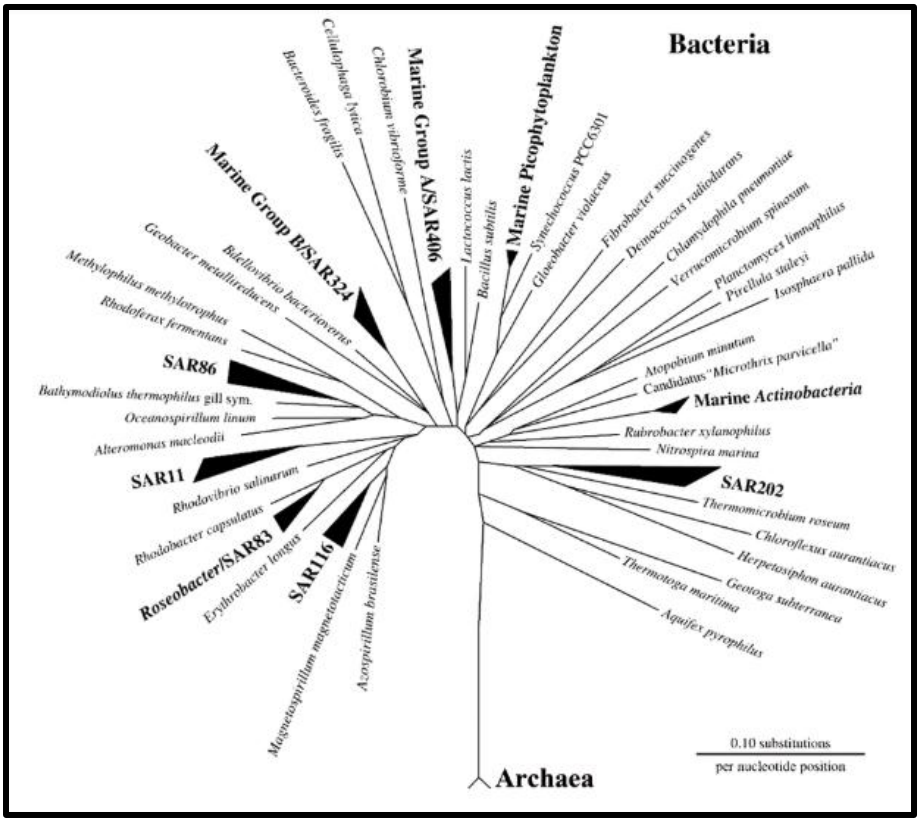


Figure 2. Illustration schématique des relations phylogénétiques entre les grands groupes incultivés parmi les souches cultivées en 2000 (Giovannoni et Rappé 2000)

I. 2. 1. 1. Les communautés bactériennes benthique

Se trouvent dans les couches de sédiments et sur les surfaces solides du fond de l'eau. Elles jouent un rôle crucial dans la décomposition de la matière organique, la transformation des éléments nutritifs et la régulation de la qualité de l'eau.

I. 2. 1. 2. Les communautés bactériennes pélagiques

Sont présentes dans la colonne d'eau, loin du fond. Elles peuvent être associées aux particules en suspension ou se trouver librement dans l'eau. Ces bactéries sont souvent

impliquées dans le cycle biogéochimique des éléments, la production de matière organique et la régulation de la composition chimique de l'eau.

Les études de la diversité bactérienne dans l'océan global, par clonage-séquençage (Pommier et al. 2007) ou par pyroséquençage (Venter et al., 2004, Rusch et al., 2007, Yooseph et al., 2010, Zinger et al., 2011), ont mis en évidence la présence d'un petit nombre d'espèces cosmopolites (Des espèces qui sont retrouvées dans tous les échantillons) très abondantes, distribuées suivant un modèle log-normale (Curtis et al., 2002).

I. 2. 2. Fonctions des bactéries

Les bactéries jouent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes en décomposant la matière organique issue des niveaux trophiques supérieurs en carbone et en nutriments biodisponibles. Cette observation a conduit à proposer la notion de boucle microbienne pour mettre en évidence l'importance écologique des communautés bactériennes (Rossi, 2008).

Dans un milieu oligotrophe, le compartiment bactérien assume un rôle de lien trophique direct, tandis que dans un milieu eutrophe, son rôle prépondérant est celui de reminéralisation. Cette distinction soulignée met en lumière l'importance de la boucle microbienne dans les écosystèmes (Rossi, 2008).

En outre, les prokaryotes jouent un rôle important dans la respiration océanique (Del Giorgio & Duarte, 2002).

Leur rôle dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du soufre et d'autres éléments joue un rôle essentiel dans la régulation des flux de matière à travers les écosystèmes marins. (Gasol & Kirchman, 2018). Ces processus jouent un rôle direct dans la production de matière organique particulaire et sa conversion, ce qui facilite le transfert efficace de carbone et de nutriments à travers les différents niveaux trophiques marins. Selon (Azam et al., 1983 ; Farooq, 1998 ; Fenchel, 2008).

I. 2. 3. Les interactions entre les bactéries planctoniques et les copépodes

La relation entre les microorganismes et les autres organismes vivants est une interaction complexe et dynamique, sujette à des évolutions et influencée par de multiples facteurs.

Les planctons, selon Tang et al. (2010), représentent des microhabitats (hôtes) particuliers abritant des communautés bactériennes au sein des écosystèmes aquatiques. Les copépodes marins, décrits par Tang, possèdent également des structures corporelles complexes et des surfaces étendues propices à l'attachement des bactéries. La présence de certaines bactéries qui se fixent directement sur l'exosquelette chitineux (bactéries de surface jouant un rôle protecteur ou de nettoyage) et le tube digestif des zooplanctons (bactéries intestinales facilitant la digestion) souligne le rôle crucial de ces derniers en tant que microhabitats pour les bactéries (Bickel & Tang, 2014).
Il est crucial de saisir l'impact environnemental des microorganismes liés aux copépodes afin de mieux appréhender les processus écologiques et les fonctions des écosystèmes aquatiques. La relation entre les copépodes et les bactéries peut être essentiellement catégorisée en deux types principaux : les associations endo-biotiques et exo-biotiques (Feng et al, 2023)

I. 2. 3. 1. Associations endo-biotiques

Les associations endo-biotiques entre les copépodes et les bactéries intestinales, dites endobiontes, sont cruciales pour la digestion de la matière organique complexe, comme le phytoplancton. Ces bactéries aident à décomposer les substances en formes plus digestibles pour les copépodes, qui fournissent en retour un environnement protégé et nutritif. Les associations varient selon les espèces de copépodes, les conditions environnementales et les stades de vie. Ces interactions sont essentielles pour comprendre l'écologie des copépodes, leur rôle dans les réseaux trophiques marins et leurs interactions avec les communautés microbiennes des écosystèmes aquatiques. Les études montrent que les copépodes sont principalement liés à certains taxons bactériens, avec des variations régionales significatives dans la composition microbienne des intestins, mettant en lumière les différences dans les réseaux trophiques pélagiques (Feng et al, 2023).

Les communautés bactériennes qui peuplent des milieux riches en éléments nutritifs peuvent contribuer à divers cycles biogéochimiques dans l'océan, tels que la

méthanogenèse, la dénitrification, la formation de méthylmercure, la reminéralisation du fer et la dégradation des composés organiques (Steinberg et al, 2017)

- **Interaction parasitaire**

Les endobiontes des copépodes peuvent entrer en compétition pour les nutriments, ce qui peut réduire leur absorption et affecter leur croissance, leur reproduction et leur condition physique. Certains endobiontes peuvent aussi perturber la reproduction des copépodes en détournant l'énergie et en affaiblissant leur système immunitaire, les rendant plus sensibles aux maladies. De plus, ils peuvent produire des toxines qui endommagent les tissus et altèrent les processus physiologiques, affectant ainsi la survie des copépodes. En perturbant le comportement des copépodes, ces endobiontes peuvent également les rendre plus vulnérables à la prédation. Ces effets négatifs peuvent avoir des conséquences sur les populations de copépodes et leur rôle dans les écosystèmes aquatiques (Feng et al, 2023).

- **Interaction commensalisme**

Les copépodes tirent des avantages métaboliques des communautés bactériennes présentes dans leurs intestins, comme l'a démontré une étude de Tang (2005) sur l'impact de leur alimentation sur ces bactéries. Les résultats indiquent un équilibre entre la croissance des bactéries stimulée par l'alimentation des copépodes et leur perte par la défécation. Les copépodes hébergent une population bactérienne nettement plus élevée que les bactéries marines libres. Après avoir mangé, la quantité de bactéries à l'intérieur des copépodes augmente, avec un taux de croissance supérieur à celui des bactéries libres. Différents régimes alimentaires influencent la croissance des bactéries associées aux copépodes, suggérant que ces régimes peuvent modeler les communautés bactériennes dans ces hôtes (Tang, 2005).

- **Interaction symbiotique**

Le système digestif des copépodes crée un environnement peu oxygéné propice à la croissance de bactéries bénéfiques. Ces bactéries décomposent les matières organiques complexes (détritus et le phytoplancton) en nutriments assimilables. Par fermentation et dégradation enzymatique, elles libèrent des nutriments essentiels et de l'énergie, favorisant la croissance, la reproduction et la survie des copépodes. Leur présence améliore également l'efficacité de l'absorption des nutriments par les copépodes à partir

de leur nourriture, contribuant ainsi à leur bien-être général dans les écosystèmes aquatiques (Feng et al, 2023).

Les bactéries produisent des enzymes absents chez les copépodes, facilitant l'accès à des nutriments difficiles à obtenir autrement. Cette symbiose garantit une absorption optimale des nutriments par les copépodes. Cette relation symbiotique entre les copépodes et les bactéries garantit que les copépodes peuvent maximiser leur efficacité d'absorption des nutriments et optimiser leur statut nutritionnel. De plus, les bactéries présentes dans l'intestin des copépodes peuvent fournir d'autres avantages aux copépodes, tels que la synthèse de vitamines essentielles et de cofacteurs qui peuvent faire défaut dans leur alimentation. En fournissant aux copépodes les micronutriments essentiels, les bactéries contribuent à la santé générale et à la forme physique de la population de copépodes (Tang, 2005, Gorokhova et al, 2021).

I. 2. 3. 2. Associations exo biotiques

Dans les associations exobiotiques, les bactéries résident à la surface externe des copépodes, incluant leurs exosquelettes chitineux et leurs appendices, établissant des relations bénéfiques ou commensales. (Midya et al, 2019). En général, la plupart des bactéries externes se trouvent près de la bouche, entre les segments et autour de l'anus, là où l'approvisionnement en substrats organiques produits par l'activité alimentaire des copépodes est le plus élevé (Møller et al, 2007).

- **Association bénéfique**

Les bactéries bénéfiques agissent soit en dissuadant les pathogènes nocifs, soit en renforçant les défenses naturelles des copépodes. De plus, certaines bactéries exobiotiques produisent des composés antimicrobiens qui protègent les copépodes contre les pathogènes, les parasites et les contaminants. Par exemple, des études ont identifié des bactéries spécifiques sur les exosquelettes des copépodes (Calanus spp) qui produisent des composés empêchant l'adhérence et la croissance des contaminants, contribuant ainsi à maintenir la propreté des surfaces des copépodes (Midya et al, 2019).

Les microbiomes des copépodes, présents à leur surface externe, offrent des avantages environnementaux essentiels en participant activement au cycle des nutriments dans les milieux aquatiques. En décomposant la matière organique, ils libèrent des éléments nutritifs tels que l'azote et le phosphore, favorisant ainsi la croissance du phytoplancton, pilier fondamental de la chaîne alimentaire aquatique (Feng et al, 2023).

- **Association commensale**

Les copépodes interagissent avec des associations exobiotiques où certaines bactéries agissent comme des agents de nettoyage, réduisant l'accumulation de débris sur leur surface et améliorant ainsi leur capacité de nage (Nagasawa, 1989).
Les exosquelettes des copépodes sont colonisés par des bactéries telles qu'Acinetobacter, Bacillus et Flavobacterium, et cette colonisation est associée à une accumulation significative de débris alimentaires de phytoplancton entre leurs appendices et dans leurs crevasses abdominales (Holland et al, 1981).

I. 2. 3. 3. Bactéries pathogènes liées aux copépodes

En raison de leur présence rare et de la difficulté à les détecter et à les quantifier avec précision dans le milieu naturel, les bactéries pathogènes posent souvent un défi pour la surveillance de la qualité de l'eau. Ainsi, pour pallier cette difficulté, les scientifiques se tournent vers l'utilisation d'organismes indicateurs qui cohabitent avec les pathogènes dans le même environnement. Cette approche, recommandée par Savichtcheva & Okabe (2006), permet une évaluation indirecte mais pratique de la présence potentielle de contaminants pathogènes dans l'eau. Leur présence peut entraîner des changements dans la dynamique des populations de copépodes et d'autres espèces, ce qui peut avoir des répercussions sur la structure de la communauté et le fonctionnement global de l'écosystème (Feng et al., 2023).

Les conséquences nocives des agents pathogènes sur les copépodes sont mises en lumière par Kaneko & Colwell (1975). Ces derniers ont observé que Vibrio parahaemolyticus adhère aux particules de chitine et aux copépodes, cette adhérence étant influencée par des facteurs tels que le pH, la concentration de NaCl et d'autres ions dans l'eau de mer. Ils ont constaté que l'efficacité d'adsorption était maximale dans les échantillons d'eau de la baie de Chesapeake, tandis qu'elle était minimale dans les échantillons d'eau de mer ouverte.

L'étude de Huq et al. (1983) a mis en lumière le fait que Vibrio cholerae se fixe aux copépodes vivants, ce qui prolonge leur survie dans l'eau. Leur recherche a porté sur l'interaction écologique entre V. cholerae et les copépodes, identifiant les sites spécifiques d'attachement de V. cholerae, principalement dans la cavité buccale et les sacs à œufs des copépodes, grâce à la microscopie électronique à balayage. L'adhérence aux copépodes vivants prolonge la durée de vie de Vibrio dans l'eau. À l'inverse, d'autres souches

bactériennes telles que Pseudomonas fluorescens et Escherichia coli n'ont pas montré d'adhérence aux copépodes, qu'ils soient vivants ou morts.

CHAPITRE II

Matériel

&

Méthodes

II. 1. Matériel

II. 1. 1 Matériel non biologique

L'étude a été réalisée au sein du laboratoire de pédagogie de la Faculté des Sciences de l'Université Yahia Farès à Médéa, de février à mai 2025. Les équipements (Annexe 1), solutions (Annexe 2) et milieux de culture (Annexe 3) ont été utilisés.

II. 1. 2. Matériel biologique

II. 1. 2. 1. Echantillonnage

Pour la réalisation de cette étude, deux espèces de copépodes, *Centropages typicus* (CT) et *Acartia tonsa* (AT) (des crustacés minuscules appartenant à l'ordre des copépodes), ont été collectées (Fig. 3) :

- Les échantillons de *Centropages typicus* provient de la ferme aquacole (Cultemare, coordonnées : 36°35'44'' N, 2°30'44'' E). Le prélèvement a été réalisé à une profondeur de 10 mètres à l'aide d'un filet a plancton (wp2) de 200 µm de vide de maille (Fig. 5).

- Les échantillons d'*Acartia tonsa* provient de la station de dessalement (El Marsa : 36°48'45'' N, 3°15'77'' E). Le prélèvement a été réalisé à une profondeur de 5 mètres à l'aide d'un filet a plancton (wp2) de 200 µm de vide de maille (Fig. 5).

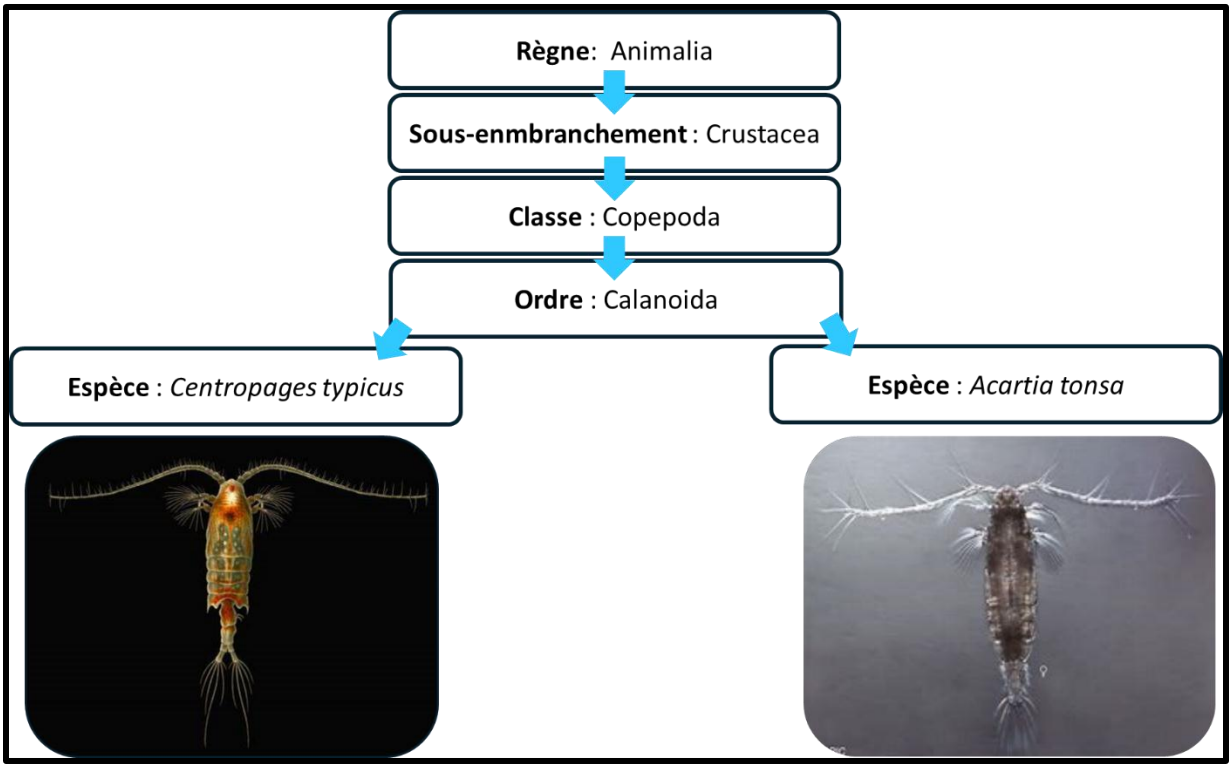


Figure 3. Classification taxonomique de Centropages typicus et d'Acartia tonsa

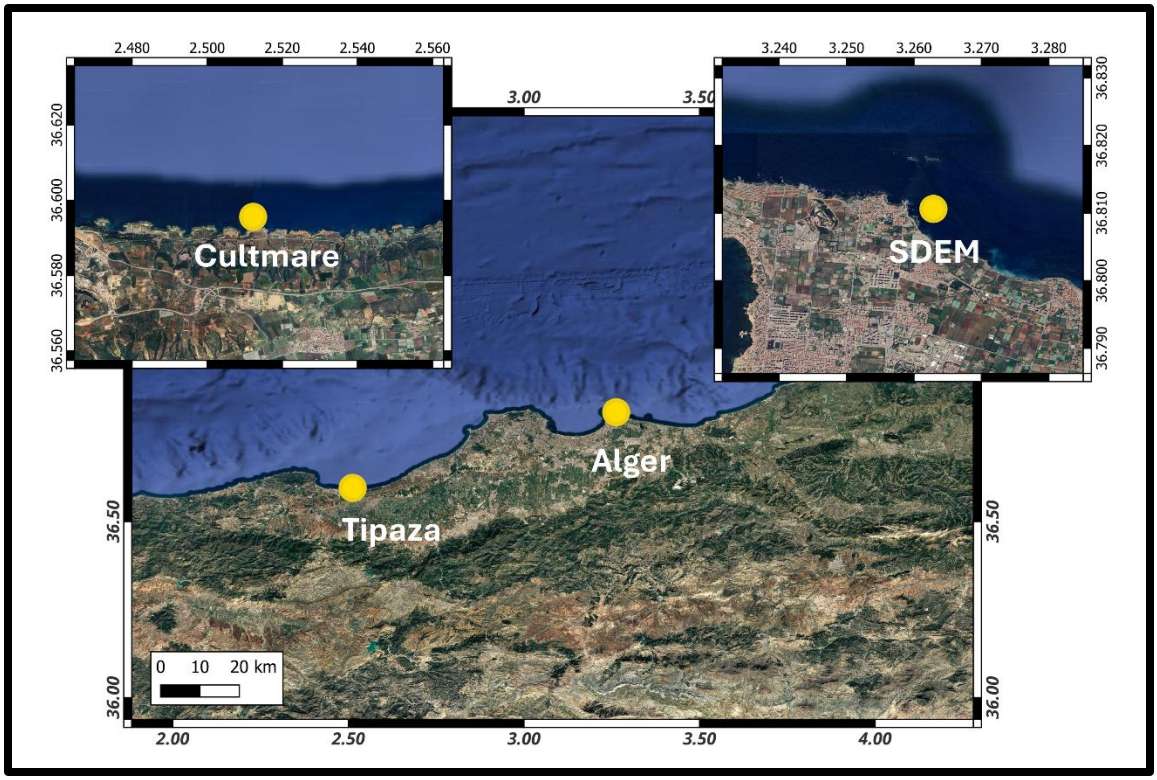


Figure 4. Localisation géographique des stations d'échantillonnage

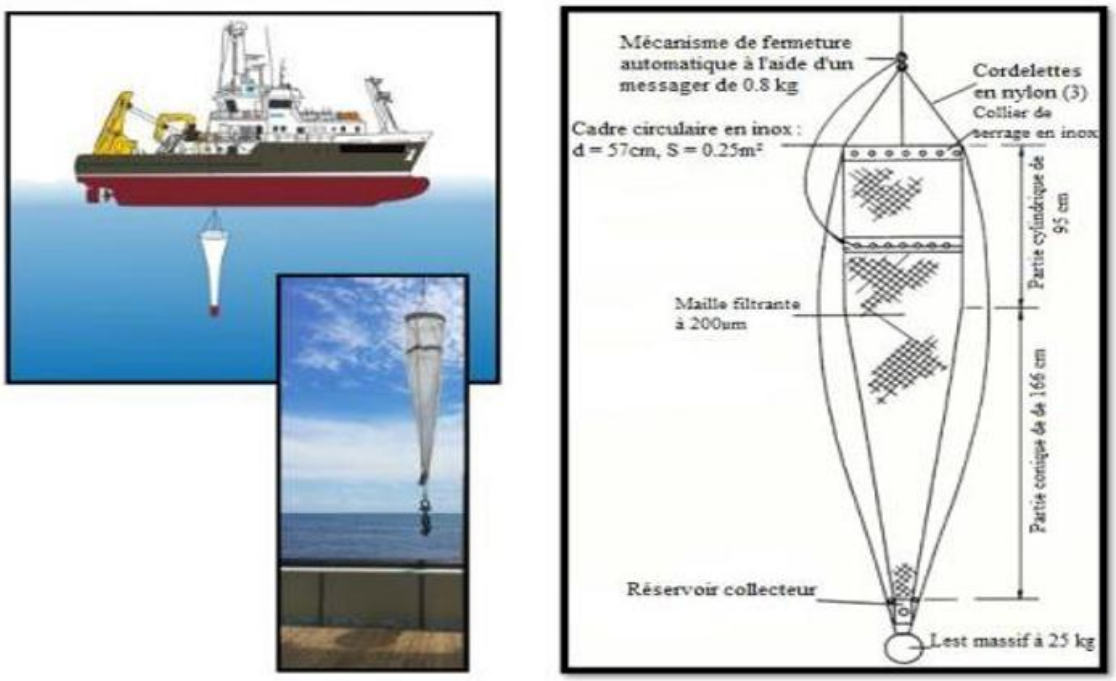


Figure 5. Filet WORKING Party II (Tranter & Fraser, 1968)

II. 1. 2. 2. Identification des espèces copépodes

A son arrivée à bord, le filet est rincé et la totalité de sa capture, retenue dans son collecteur a son extrémité, est récupérée et placé dans des bouteilles de 1 litre. Les échantillons ont été transporté dans les conditions de froid (+4°C) au laboratoire d'écosystème pélagique (FSB-USTHB) et stockés à 4°C pour un traitement ultérieur.

Une identification a été réalisé en se basant sur la morphologie des espèces récoltées et en utilisant les clés d'identification de ROSE (1933). Trégouboff & Rose (1957) ; Mauchline (1998) ; Al-Yamani et al. (2011) et Conway (2012). Deux espèces ont été retenues pour cette étude : *Acartia tonsa (AT)* et *Centropages typicus (CT)*.

II. 1. 2. 3. Les communautés bactériennes associées

Au cours de cette étude, nous nous sommes intéressés au deux compartiments exo-biotique et endo-biotique qui hébergent les bactéries exobiontes et endobiontes respectivement.

L'eau de mer contenant les deux espèces séparées ont été filtré par des filtre stériles de 0.45 um de diamètre puis lavées plusieurs fois avec l'eau distillée stérile. L'eau de lavage a été collectée et considérée comme le compartiment exo-biotique, et un code a été attribué à chaque espèce comme (AT EN et CT EX).

La surface des deux espèces, séparément, a été par la suite stérilisée par des bains successifs d'alcool (Ethanol 96°), suivi d'une série de lavage avec l'eau distillée stérile. Dans un mortier, les individus de chaque espèce ont été broyé manuellement dans une solution saline (PBS). Deux codes ont été attribués aux broyats obtenus et qui sont considérés comme étant le compartiment endo-biotique (AT EN et CT EX).

II. 2. Méthodes

II. 2. 1. Dénombrement de la flore bactérienne

Pour l'isolement des bactéries présentent au niveau de l'endo-biotique et de l'exo-biotique des deux espèces (TS et CT), les solutions obtenues ont été considéré comme étant la solution mère (10^0) et une série de dilution a été réalisé. 50µl de la solution mère et des dilutions 10^{-2} et 10^{-3} ont été étalé à la surface des boites de Petri contenant le milieu TSA 1/10 en raison de trois répétitions pour chaque milieu et pour chaque dilution 10^0, 10^{-1} et 10^{-2}).

Le dénombrement de la microflore bactérienne totale sur les boites contenant du milieu TSA1/10 a été réalisé chaque deux jours et sur une période d'incubation de 15 jours à 28 ± 2°C. Le nombre de colonies de la flore totale des endobiontes et exobiontes (UFC.mL^{-1}) a été calculé avec la loi de kass.

A partir des colonies formées une série de repiquages a été effectuée suivant la méthode des stries d'épuisement jusqu'à l'obtention de cultures pures. Un code a été attribué à chaque isolat de chaque compartiment et conservées dans du TSB avec du glycérol 40% à -20°C.

La détermination des morphotypes présent est basés sur la couleur et la forme de l'isolat.

II. 2. 2. Criblage de l'activité enzymatique

Les différentes activités enzymatiques des isolats retenus ont été mises en évidence par l'utilisation des milieux spécifiques contenant le substrat à dégrader (Ariffin et al., 2006).

II. 2. 2. 1. Protéase

Les protéases jouent un rôle significatif dans la minéralisation de l'azote dans le sol. C'est un processus important dans la disponibilité de l'azote et donc dans la croissance des plantes. (Petit & Jobin, 2005 ; Nannipieri et al., 2011). Ils jouent également un rôle

important dans la lyse de la paroi cellulaire des champignons phytopathogènes (Elad & Kapat ,1999).

La révélation de l'activité protéasique des isolats a été déterminée par ensemencement par spot des bactéries sur un milieu de culture additionné de lait écrémé.

Après 48 h d'incubation à 28°C, l'apparition d'un halo transparent autour des colonies reflète la présence d'une activité hydrolytique protéolytique (Bach & Munch, 2000).

II. 2. 2. 2. Uréase

L'uréase est une enzyme responsable de l'hydrolyse de l'urée pour produire le CO_2 et l'ammoniac (NH_3), ce qui augmente la disponibilité de l'azote pour les plantes (Byrnes & Amberger, 1989 ; Van & Wang, 1991). Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol, car sa concentration est en fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et al., 2010).

Afin de vérifier la présence de l'uréase chez nos souches, nous avons préparé un milieu à base de peptone et d'un volume de 950 ml (Annexe 1), le milieu a été ajusté à pH 6,8. Après autoclavage, 50 ml d'une solution d'urée à 40%, préalablement stérilisée par filtration (0.22 µm), a été ajoutée.

Après ensemencement par spot de nos isolats l'activité uréasique est traduite par la présence d'un halo rose autour des colonies (Christensen, 1946).

II. 2. 2. 3. Phosphatase

La solubilisation de phosphate inorganique a été déterminée sur le milieu NBRIP (National Botanicalb Research Institut's Phosphate), contenant 0,5% du phosphate tricalcique ($Ca_3(PO_4)_2$) comme seule source de phosphate insoluble (Nautiyal, 1999).

Les isolats bactériens fraîches et âgées de 24h, ont été ensemencées par spot sur la surface du milieu NBRIP à raison de cinq souches par boîte de Petri, puis incubées à 30°C pendent 14 j. Un résultat positif se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies (Mehta & Nautiyal, 2001).

L'estimation de l'activité de solubilisation a été déterminé par le calcul de l'indice de solubilisation (ISP) calculé selon la formule suivante (Edi Premono et al., 2007) :

$$S_i = \frac{\text{Diamètre de la colonie} + \text{Diamètre de la zone claire}}{\text{Diamètre de la colonie}}$$

II. 2. 2. 4. Amylase

L'amylase est l'enzyme qui a la capacité d'hydrolyser l'amidon. La synthèse des enzymes amylasiques par les bactéries permet une dégradation de la matière organique dans la nature et fournir des éléments minéraux que les plantes vont utiliser pour leur croissance (Burhan et al., 2003).

La recherche de la présence de l'enzyme amylase chez nos isolats a été détectée sur milieu solide TSA additionnée d'amidon à 1%. Après un ensemencement des isolats par spot, les boites ont été incubées à 25°C pendant 5 jours. La révélation se fait par l'inondation des boites par une solution iodée (Lugol). L'hydrolyse de l'amidon se traduit par un halo clair autour de la colonie, contrairement aux zones contenant de l'amidon qui se colorent en bleu (Delarras, 2014). Le diamètre du halo d'hydrolyse est obtenu en soustrayant le diamètre de la colonie de celui diamètre total pour chaque isolat.

II. 2. 3. Identification phénotypique

II. 2. 3. 1. Etude macroscopique

Les colonies obtenues sur milieu solide ont été observées à l'oeil nu. L'étude macroscopique permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification, elle est basée sur les éléments d'identification donnés par Joffin et Leyral (2006) : la forme, la taille, l'opacité, l'élévation et l'aspect de contour et de surface.

II. 2. 3. 2. Etude microscopique (Coloration de Gram)

La coloration de Gram est une coloration différentielle de base permet de distinguer deux grands groupes bactériens en fonction de la composition de leurs parois et de leurs affinités aux différents colorants : des bactéries à Gram positifs colorées en violette et Gram à négatifs en rose, et elle permet aussi de déterminer la forme, la taille, l'arrangement, la nature biochimique de la paroi des cellules bactériennes, la vérification de la pureté de l'isolat et de visualiser et permet de visualiser les endospores bactériennes leurs formes et leurs positionnements. La coloration de Gram a été réalisée selon la méthode de Hans Christian Gram (1884).

A partir des souches jeunes et pures, un frottis fixé à la chaleur a été réalisé puis recouvert par le violet de Gentiane pendant une minute, il a été ensuite rincé à l'eau distillée et traité pendant une minute par une solution de Lugol, et de nouveau rincé à l'eau distillée. Le frottis a été ensuite décoloré avec de l'éthanol 95% pendant 15 à 30 secondes, à ce stade, les cellules Gram négatives seront incolores et les cellules Gram positives violettes, puis rincé à l'eau distillée. Ensuite, une contre coloration de 30 secondes à la fuchsine a été réalisée pour colorer les cellules Gram négative présentes.

Après un bref rinçage, le frottis a été séché au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen, puis examiné sous microscope optique aux grossissements X40 et X100 après l'ajout de l'huile à immersion.

II. 2. 4. Caractérisation physiologique

L'identification physiologique des isolats a été mise en évidence par l'étude de la tolérance à la salinité, un paramètre clé dans les environnements extrêmes tels que les milieux marins, hypersalins ou contaminés.

Cette méthode repose sur l'analyse de la croissance bactérienne en présence de concentrations croissantes de chlorure de sodium (NaCl), comprises entre 10 %, 20 % et 30%. Les résultats permettent de distinguer les bactéries halotolérantes, capables de survivre à de fortes concentrations salines sans en dépendre, des bactéries halophiles, pour lesquelles une certaine concentration de sel est nécessaire à la croissance (Ventosa et al., 1998 ; Kushner, 1978). Chaque isolat a été cultivé sur des milieux solides ou liquides supplémentés en NaCl afin de déterminer son profil de tolérance osmotique. Cette caractérisation fournit des informations physiologiques précieuses, qui complètent les analyses morphologiques et biochimiques classiques, et permet de mieux comprendre l'adaptation microbienne aux contraintes environnementales (Oren, 2006 ; DasSarma & Arora, 2001). Elle est particulièrement pertinente dans le contexte de l'écologie microbienne des milieux salins et dans les études visant à valoriser des souches pour des applications biotechnologiques en conditions extrêmes

CHAPITRE III

Résultats

&

Discussion

III. 1. Densité bactérienne

La détermination de la microflore totale des bactéries associées aux copépodes a été effectué après une incubation de nos boites à 28 ± 2°C pendant 15 jours avec un dénombrement des colonies chaque 48h (Tab. 1).

Le nombre de colonies totale est similaire pour les deux espèces (CT et AT), il est de 250 et 152 colonies successivement.

Tableau 1. Densité de la flore bactérienne provenant des deux espèces de copépodes

Code	Dénombrement des colonies (10^7.UFC.ml^{-1})			
	48h (rapide)	96h (intermédiaire)	15 jours (lente)	Total
CT	24	54	172	250
CT EN	14	30	12	56
CT EX	10	24	160	194
AT	70	55	27	152
AT EN	48	35	25	108
AT EX	22	20	2	44

La microflore associée à *Centropages typicus* est dominée par les bactéries à croissance lente (68.8% du total). Cependant, *Acartia tonsa* est peuplée majoritairement par une microflore bactérienne à croissance rapide (46.05% du total) et intermédiaire (36.18% du total).

Le dénombrement des colonies par compartiment a montré que la majorité des bactéries associées au *Centropages typicus* provient de la partie exo-biotique (CT EX = 194 colonies) contre 56 colonies seulement dénombrées au niveau du compartiment endo-biotique (CT EN = 56 colonies) (Fig. 6).

Pour les échantillons collectés de CT EN, nous avons dénombré14*10^7 UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, 30*10^7 UFC.ml^{-1} après 96h d'incubation et 12*10^7 UFC.ml^{-1} après 15 jours d'incubation (Fig. 6). La diminution du nombre de bactéries après 96h d'incubation pourrait être expliquer par l'épuisement des ressources disponibles dans le milieu de culture.

Au niveau de compartiment exo-biotique de l'espèce *Centropages typicus* (CT EX), le nombre de bactéries augmente progressivement. Nous avons dénombré 10*10^7 UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, puis24*10^7 UFC.ml^{-1} après 96h et 160*10^7 UFC.ml^{-1} après 15

jours d'incubation (Fig. 6). Cela pourrait s'expliquer par une disponibilité constante des nutriments ou des conditions de culture favorables, permettant une croissance bactérienne soutenue.

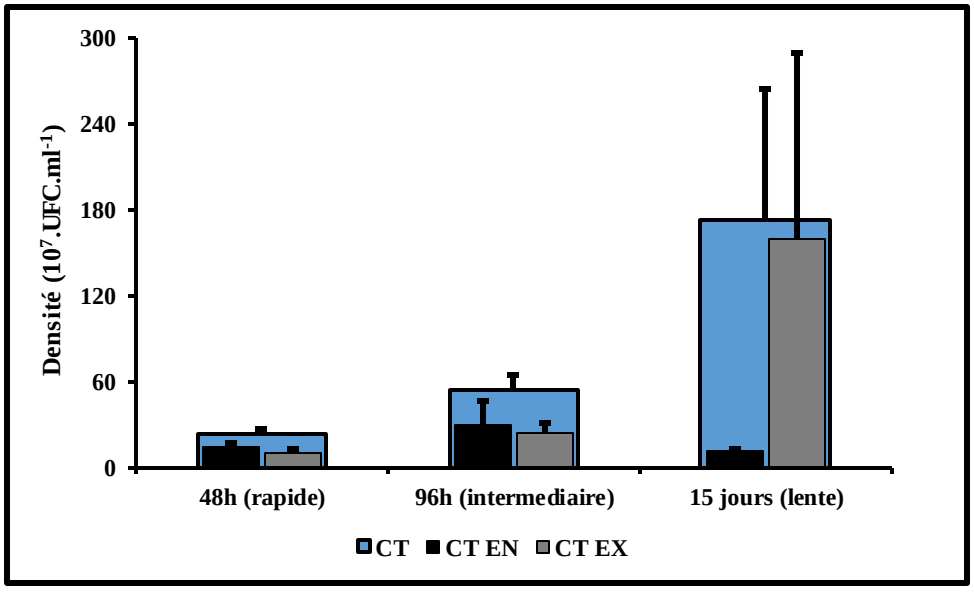


Figure 6. Densité de la microflore associée à Centropages typicus

Tandis que pour l'espèces *Acartia tonsa,* 108 colonies proviennent du compartiment endo-biotique (AT EN) contre 44 colonies seulement recensées au sein du compartiment exo-biotique (TS EX).

Le dénombrement des colonies obtenues à partir de compartiment endo-biotique de l'espèce *Acartia tonsa* a donné les résultats suivants : 70.10^7 UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, 55.10^7 UFC.ml^{-1} après 96h d'incubation et 27.10^7 UFC.ml^{-1} après 15 jours d'incubation (Fig. 7). Cette allure pourrait indiquer une dynamique complexe où la population bactérienne atteint rapidement un pic, puis diminue possiblement à cause de la compétition ou de facteurs de stress, avant d'augmenter à nouveau et de se stabiliser à un niveau inférieur mais encore élevé.

Les échantillons collectés du compartiment exo-biotique d'*Acartia tonsa* (AT EX) ont permis de dénombrer 22.10^7 UFC.ml^{-1} après 48h d'incubation, 20.10^7 UFC.ml^{-1} après 96h d'incubation et 2.10^7 UFC.ml^{-1} après 15 jours d'incubation (Fig. 7). Il se peut que cela suggère que les conditions deviennent désagréables pour la flore bactérienne après 96 heures, ce qui entraîne une diminution graduelle de la population bactérienne.

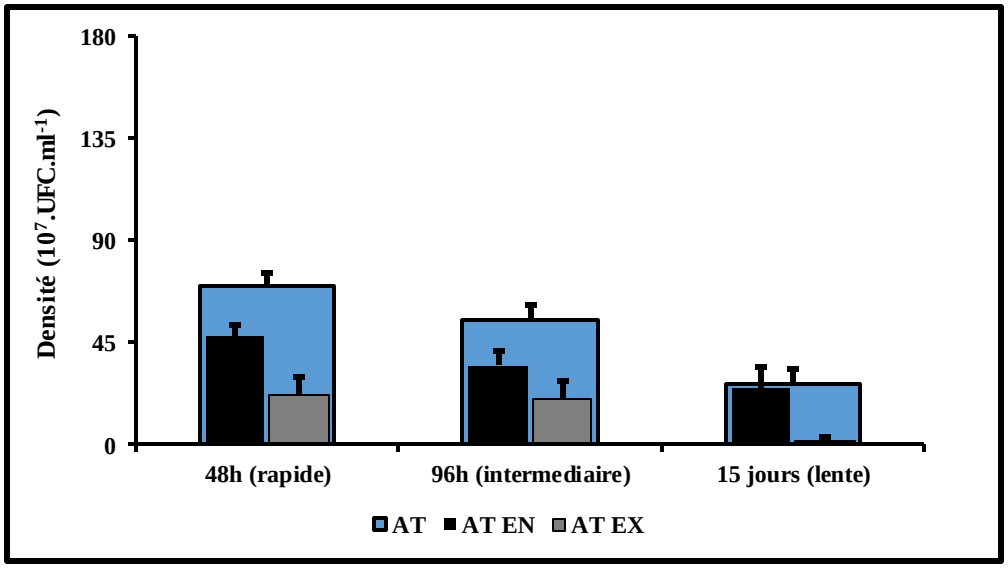


Figure 7. Densité de la microflore associée à Acartia tonsa

III. 2. Etude de la diversité phénotypique des isolats

La couleur et l'aspect des colonies bactériennes isolées à partir des deux espèces de copépodes *Centropages typicus* et *Acartia tonsa* étudiés nous a permis de classer les bactéries en plus de 20 différents morphotypes (Fig. 8). Cette diversité de l'aspect phénotypique peut nous informer sur une diversité bactérienne associée aux copépodes étudiés.

L'observation macroscopique des colonies nous a permis de classer les bactéries de couleur noir et de couleur blanche comme les deux morphotypes les plus fréquents avec 25 colonies chacun (29% du total). Pour les deux morphotypes, c'est l'espèce CT qui a présenté la majeure des bactéries avec 12 isolats blanche et 22 isolats noir. Les couleurs jaune, blanche clair, blanche crème et orange ont aussi été très fréquentes au sein de nos isolats.

Avec une densité moins importante, les morphotypes rose clair, orange clair et jaune clair sont représentés par 9, 9 et 11 isolats respectivement. La même remarque a été notée, la dominance de ces morphotypes chez l'espèce CT.

Les couleurs : jaune orange (3 isolats), jaune transparent (4 isolats), jaune vert (4 isolats), jaune foncé (3 isolats), orange foncé (6 isolats) et le rose foncé (4 isolats) sont des morphotypes qui ne se présentent que chez l'espèce CT. En effet, les morphotypes jaunes foncé, orange foncé et le rose foncé sont présent dans le compartiment exo-biotique alors

que les morphotypes jaune orange, jaune transparent et jaune vert sont présent dans le compartiment endo-biotique. Tandis que les couleurs vert (7isolats), gris (3isolats), beige (6 isolats), marron (1 isolat) et transparent (5isolats). Seul le morphotype vert est dominant dans le compartiment exo-biotique et le reste ont été isolé à partir du compartiment endo-biotique.

Cette étude a permis de caractériser divers morphotypes bactériens isolés à partir de différents compartiments de copépodes, en se basant sur la couleur et l'aspect des colonies. L'observation macroscopique reste un outil essentiel pour l'identification préliminaire des bactéries inconnues, fournissant une base solide pour des analyses futures plus détaillées et une identification plus précise et doit être couplé à l'observation microscopique (Coloration de Gram).

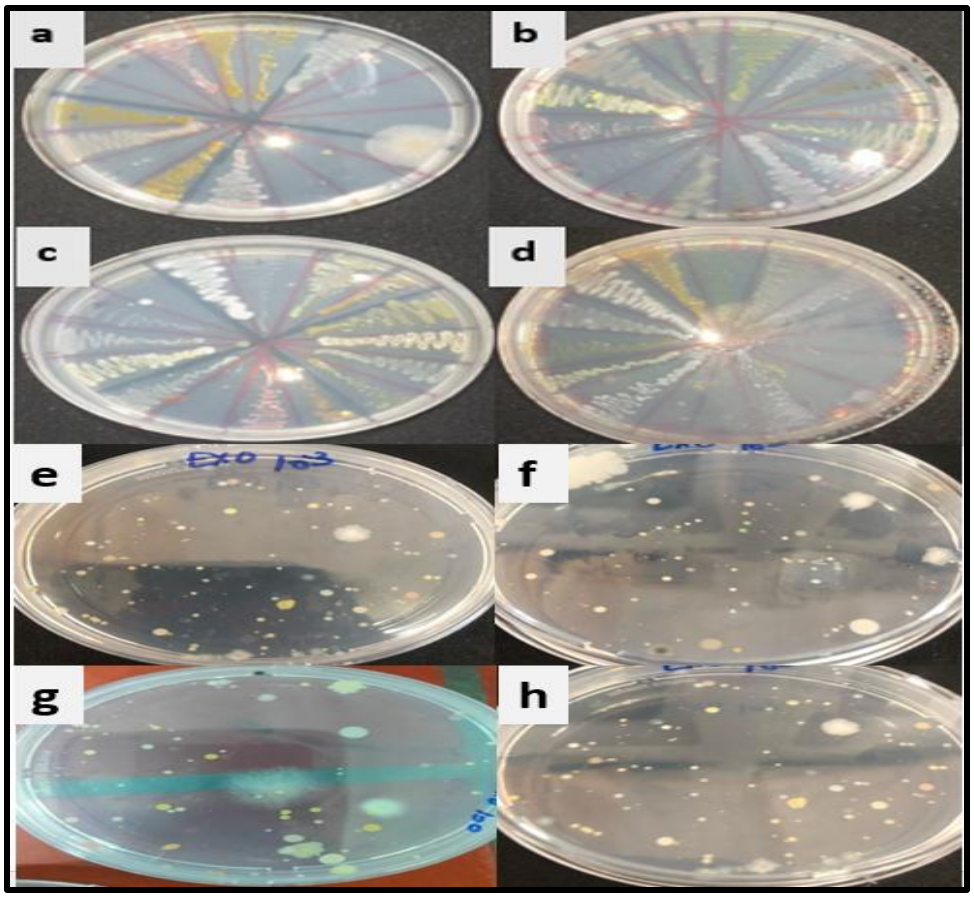


Figure 8. Aspect macroscopique des différents morphotypes des isolats associés à Centropages typicus (a, b, c et d) et Acartia tonsa (e,f, g et h)

III. 3. Criblage de l'activité enzymatique

A partir de notre souchier (62 isolats), nous avons sélectionné sur la base des morphotypes des bactéries appartenant à chaque espèce et chaque compartiment. En effet, 28 isolats associés à CT avec 08 endobiontes et 20 exobiontes et 34 isolats associés à AT avec 15 endobiontes et 19 exobiontes. Ces isolats ont fait l'objet de l'étude du criblage de l'activité enzymatique.

III. 3. 1. Protéase

Les protéases d'origine microbienne sont parmi les enzymes les plus secrétées (Ningthoujam et al., 2009). Les souches protéolytiques sont reconnues par la formation des halos translucides au tour des colonies.

Sur l'ensemble des isolats examinés, tous à l'exception de trois ont présenté un résultat négatif, c'est-à-dire aucune formation de la zone d'inhibition autour des colonies (Fig. 9). Pour les trois isolats capables de synthétiser la protéase (Fig.10) la zone d'inhibition est de 11±1mm pour l'isolat CT EX 53, de 13 mm ±1 mm pour l'isolat CT EX 54 et de 10.4±2mm pour l'isolat AT EX 9. Deux isolats ont été isolé du compartiment exo-biotique de *Centropages typicus* et un isolat a été isolé du compartiment exo-biotique de *Acartia tonsa*.

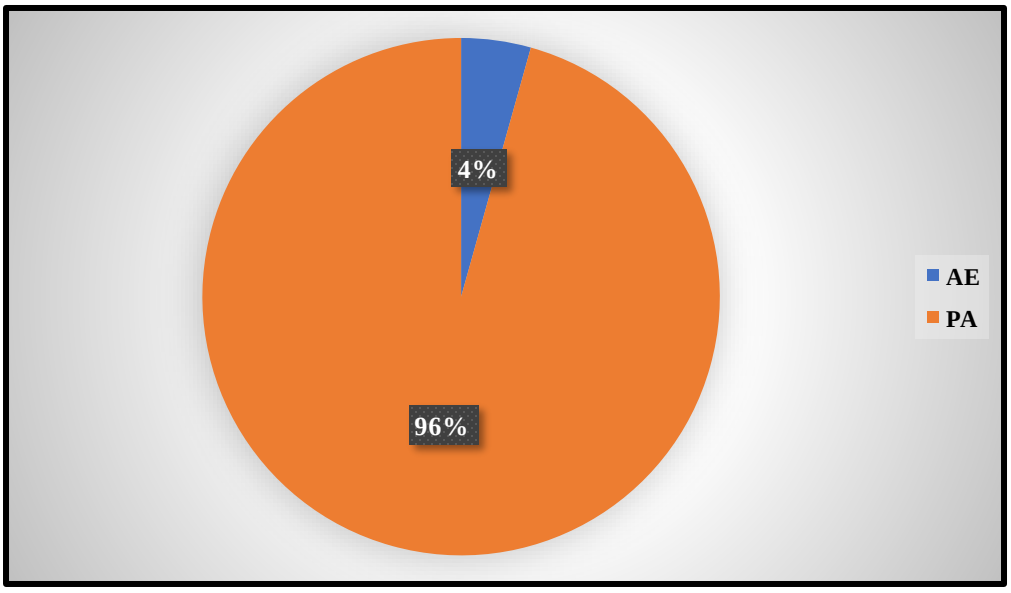


Figure 9. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de la protéase

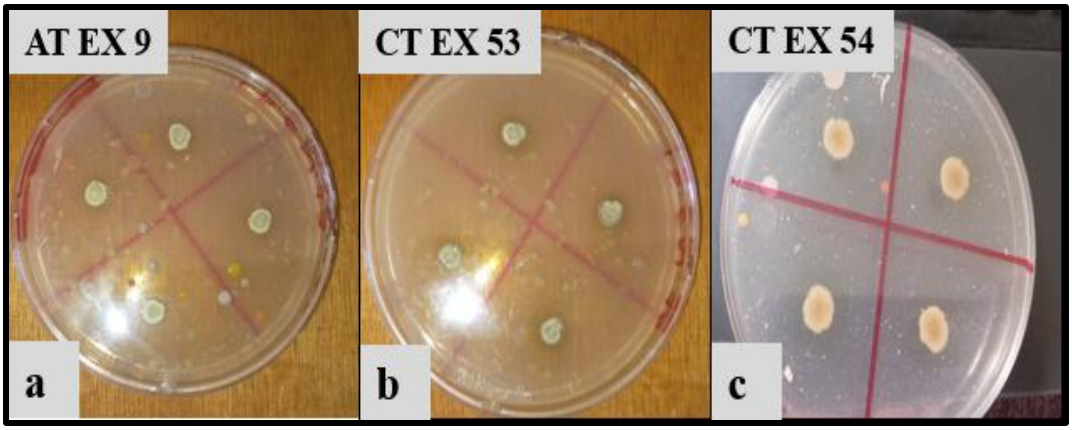


Figure 10. Mise en évidence de la production des protéases sur gélose au lait écrémé (a : colonie non productrice de protéase ; b : colonie productrice de protéase)

Nos résultats ne concordent pas avec d'autres études déjà réalisé sur les copépodes. Les travaux de Grossart et al. (2005) ont trouvé que plusieurs bactéries du genre Vibrio et Pseudomonas qui vivent en association avec les copépodes sont capables de produire des protéases. Aussi, une étude réalisée par Tang et al. (2010) a montré la présence des bactéries capables de dégrader les protéines dans les intestins du copépode *Calanus finmarchicus*.

L'absence d'activité de dégradation des protéines chez les bactéries associées à nos copépodes peut être attribuée à une combinaison de facteurs écologiques, génétiques et méthodologiques. Comprendre ces facteurs nécessite une approche globale incluant l'analyse environnementale, le profilage des communautés microbiennes et les tests fonctionnels.

III. 3. 2. Uréase

L'enzyme uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée en ammoniac et carbamate, qui est alors spontanément hydrolysé pour former une molécule d'acide carbonique ainsi qu'une seconde molécule d'ammoniac. L'acide carbonique se dissocie à pH physiologique, et les molécules d'ammoniac s'équilibrent alors avec l'eau pour être protonées, Il en résulte une nette augmentation du pH. Elle est utilisée comme indicateur de la qualité du sol car sa concentration est fonction du taux de la matière organique (Martinez-Salgado et *al.*, 2010).

Nos observations indiquent que 16 isolats soit un pourcentage de 23.18% sont des productrices d'uréase (Fig. 11) dont 14 isolats sont originaires du CT avec une répartition non équitable car 11 isolats sont des exo-biontes et seulement 3 isolats sont des endo-

biontes. Contrairement à l'espèce AT, ou nous avons seulement productrices d'uréas issus du compartiment exo- biotique (Fig. 12).

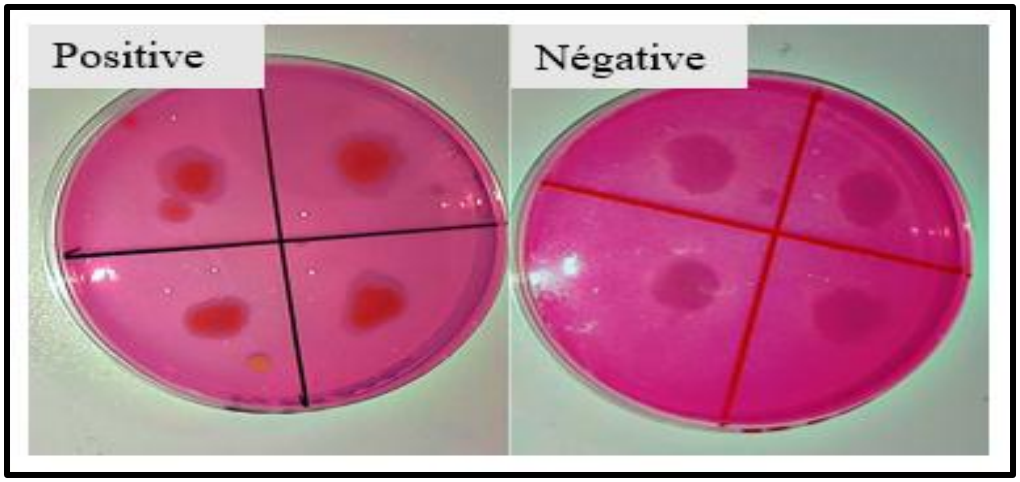


Figure 11. Mise en évidence de la production de l'uréase sur milieu à base de peptone

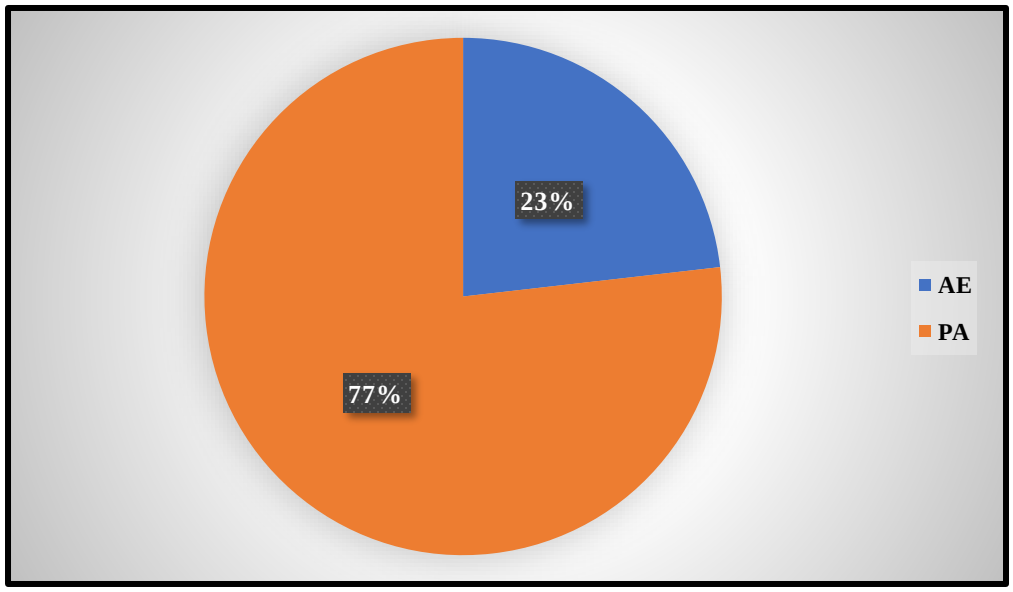


Figure 12. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de l'uréase

Le calcul du diamètre du halo de dégradation nous a permis de constater que les isolats CT EN 84 (32 mm), CT EN 128 (26.33 mm), CT EX 03 (16 mm), TS EN 14 (16mm) ont une forte capacité de la production d'uréase par rapport aux autres isolats. Tandis que CT EX 19 (2.8 mm) et CT EX 02 (3mm) ont une faible capacité.

Les espèces endogènes tendent à former des colonies plus grandes que les espèces exogènes, ce qui pourrait indiquer une meilleure adaptation aux conditions

environnementales spécifiques. Ces observations fournissent des informations précieuses sur la compétitivité des différentes espèces microbiennes.

Plusieurs études (Grossart et al., 2009; Smith et al., 2018) ont signalé la capacité des bactéries associées aux copépodes de produire de l'uréase, bien que la prévalence et l'importance de cette activité enzymatique puissent varier en fonction des espèces de copépodes et des conditions environnementales. Les recherches utilisant des techniques de séquençage de l'ADN métagénomique et des analyses biochimiques fournissent des preuves solides de la capacité des microbiomes de copépodes *(Calanus finmarchicus)* à participer au cycle de l'azote via la production d'uréase (Ackson et al., 2021). Ces études contribuent à une meilleure compréhension des interactions complexes entre les copépodes et leurs microbiomes associés, et du rôle écologique de ces interactions dans les écosystèmes aquatiques.

III. 3. 3. Phosphatase

Le phosphate est un élément essentiel dans les écosystèmes marins, jouant un rôle crucial dans la croissance et la productivité des organismes aquatiques. En tant que composant clé de l'ADN, de l'ARN et de l'ATP, le phosphate est indispensable à de nombreux processus biologiques. Est un nutriment limitant pour la croissance du phytoplancton, qui constitue la base de la chaîne alimentaire marine et également crucial pour la synthèse des acides nucléiques et des membranes cellulaires.

D'après nos résultats, seulement 19 isolats (28%) sont capables de dégrader le phosphate tricalcique sur milieu NBRIP solide contre 50 isolats soit 72% qui ont présentés une réaction négative (Fig. 13). Sur les 19 isolats, 7 isolats sont associés à l'espèce *Centropages typicus* et 12 isolats sont associés à l'espèce *Acartia tonsa*. La répartition des isolats entre les 2 compartiments (endo et exo) de l'espèce CT est équitable (4 et 3 isolats, successivement). Pour AT, 7 des 12 isolats sont originaires du compartiment endo-biotique.

La solubilisation du phosphate s'est traduite par la formation d'un halo autour de la colonie bactérienne (Fig. 14)

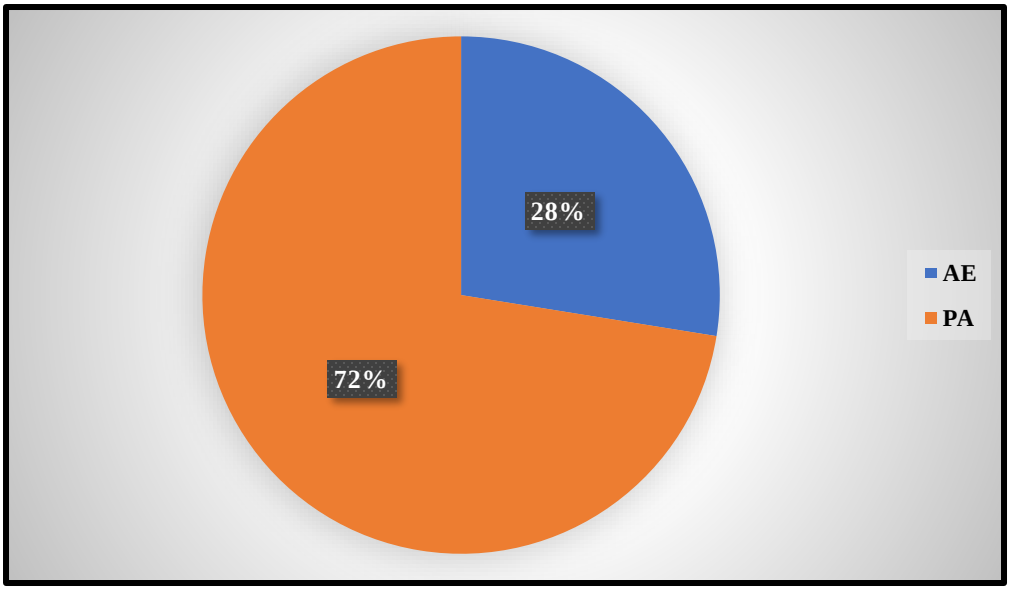


Figure 13. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis de phosphatase

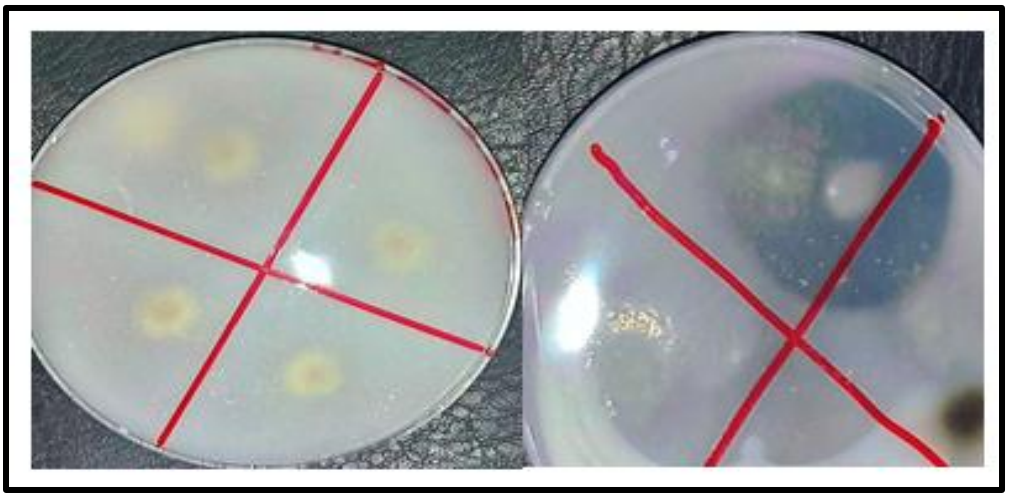


Figure 14. Mise en évidence de la production de phosphatase sur milieu NBRIP

Les résultats que nous avons obtenus montrent une faible capaciter de solubiliser les phosphates. Ses résultats ne concordent pas avec les résultats qui ont révélé que les microbiomes des copépodes contiennent des bactéries capables de solubiliser et de minéraliser le phosphate (Tang et al.,2009). Aussi, les travaux ont montré que les bactéries associées aux copépodes sont capables de solubiliser le phosphate par une acidification du milieu et aussi la sécrétion des phosphatases (López-Pérez et al. (2016).

III. 3. 4. Amylase

Les copépodes sont des zooplanctons marins qui jouent un rôle crucial dans les écosystèmes aquatiques en reliant les producteurs primaires aux niveaux trophiques supérieurs. Leurs microbiomes comprennent des bactéries capables de dégrader divers

polysaccharides, dont l'amidon. Les amylases sont des enzymes qui hydrolysent l'amidon en sucres simples, facilitant ainsi la digestion des matières organiques par les copépodes.

La recherche de l'activité amylolytique chez nos isolats sur un milieu solide contenant de l'amidon comme substrat a montré que 34 d'entre eux, soit 49% des isolats, ont présentées une réaction positive (Fig. 15 et 16). Parmi ces isolats, *Centropages typicus* était représenté par neuf isolats dans le compartiment exobiotique et quatre isolats dans le compartiment endobiotique. En revanche, pour l'espèce *Acartia tonsa*, onze isolats ont été trouvés dans le compartiment exobiotique et dix isolats dans le compartiment endobiotique.

L'isolat AT EN 10 possède la meilleure activité enzymatique, comme en témoigne un diamètre d'halo de 25 mm autour des colonies. Cette mesure indique une dégradation efficace de l'amidon par l'amylase produite par cet isolat.

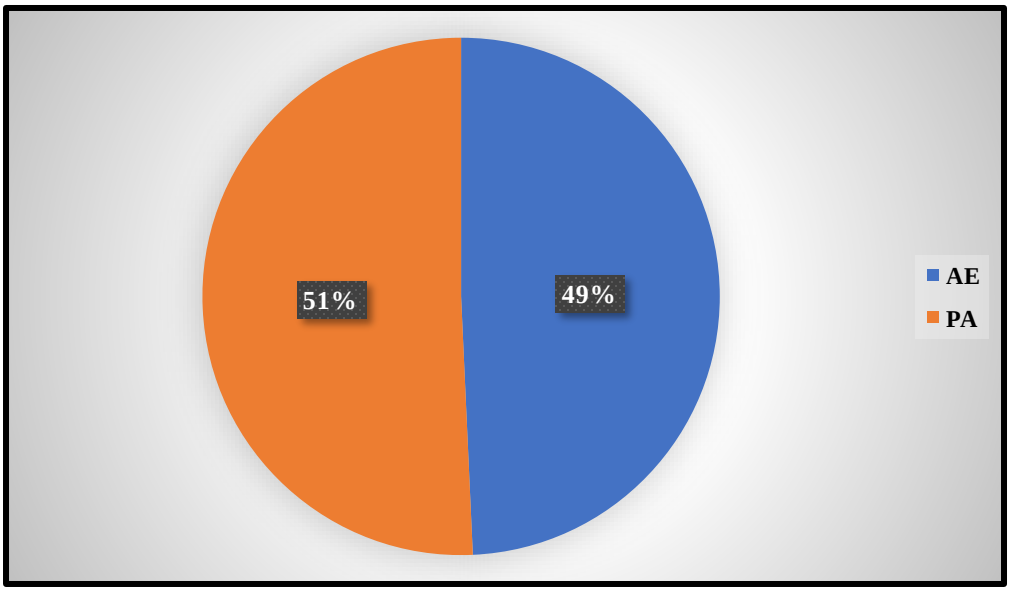


Figure 15. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis l'amylase

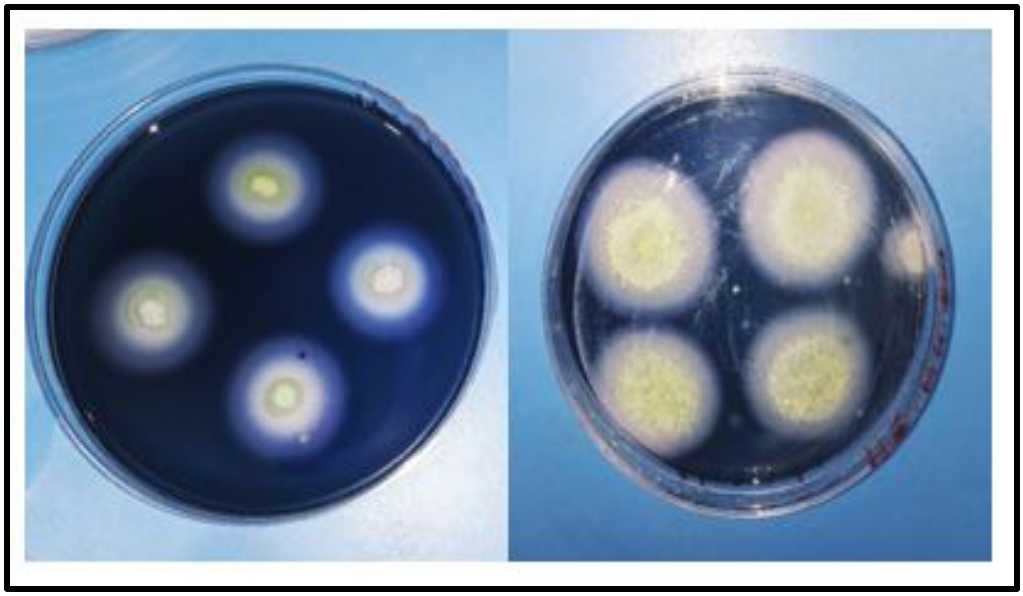


Figure 16. Colonie productrice d'amylase

Les bactéries associées aux copépodes, telles que les espèces de Vibrio, Alteromonas, Pseudoalteromonas, et Pseudomonas, sont connues pour produire des amylases, jouant un rôle crucial dans la dégradation de l'amidon dans les écosystèmes marins. Ces bactéries contribuent à la nutrition des copépodes et au cycle des nutriments, favorisant la santé et la productivité des écosystèmes marins (Zhao et al., 2011).

III. 4. La caractérisation phénotypique

A partir de notre collection de souches (17 isolats), nous avons sélectionné les bactéries possédant deux enzymes ou plus. Parmi celles-ci, il y a 09 isolats associés à CT avec 02 endobiontes et 07 exobiontes, ainsi que 8 isolats associés à AT avec 04 endobiontes et 04 exobiontes.

III. 4. 1. Aspect microscopique

L'aspect microscopique est visualisé après coloration de Gram, cette dernière représente une étape fondamentale dans la caractérisation morphologique et physiologique des bactéries, permettant de distinguer les bactéries à paroi épaisse riche en peptidoglycane (Gram-positives) de celles à paroi mince et à membrane externe (Gram-négatives) (Madigan et al., 2018). Dans notre étude, l'observation microscopique post-coloration de Gram a révélé que 14 isolats présentaient une morphologie coccobacillaire avec une coloration (mauve), ce qui nous renseigne que ces souches sont des bactéries Gram-

positives. À l'inverse, un seul isolat (AT EN 15) présente une coloration rose, suggérant une nature potentiellement Gram-négative (Fig.18).

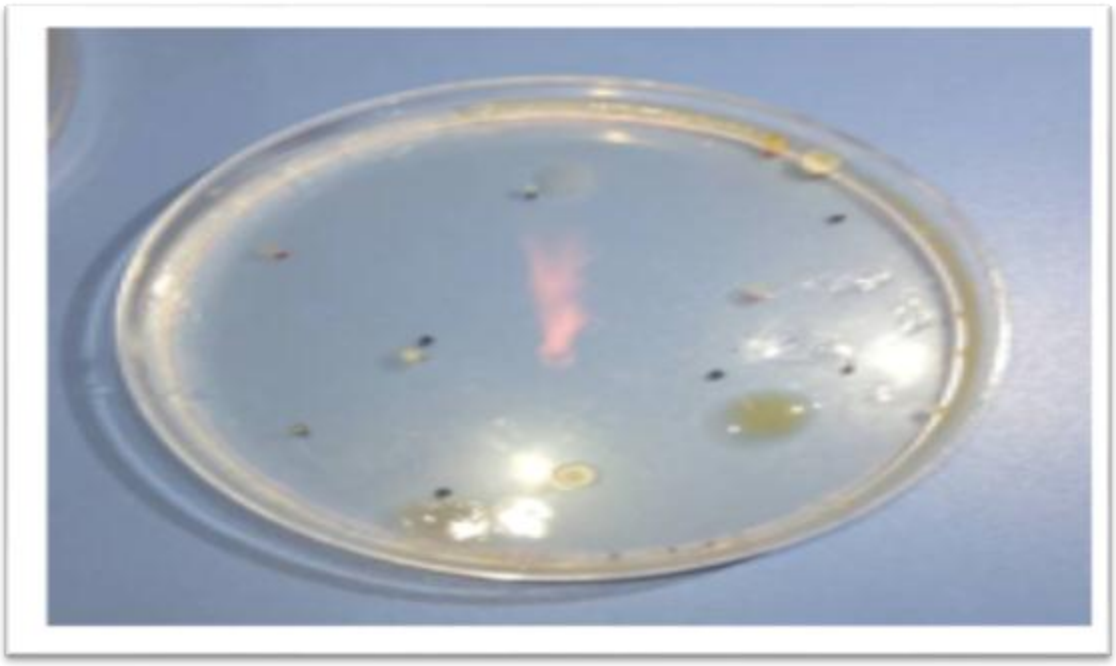


Figure 17. Aspect macroscopique des isolats

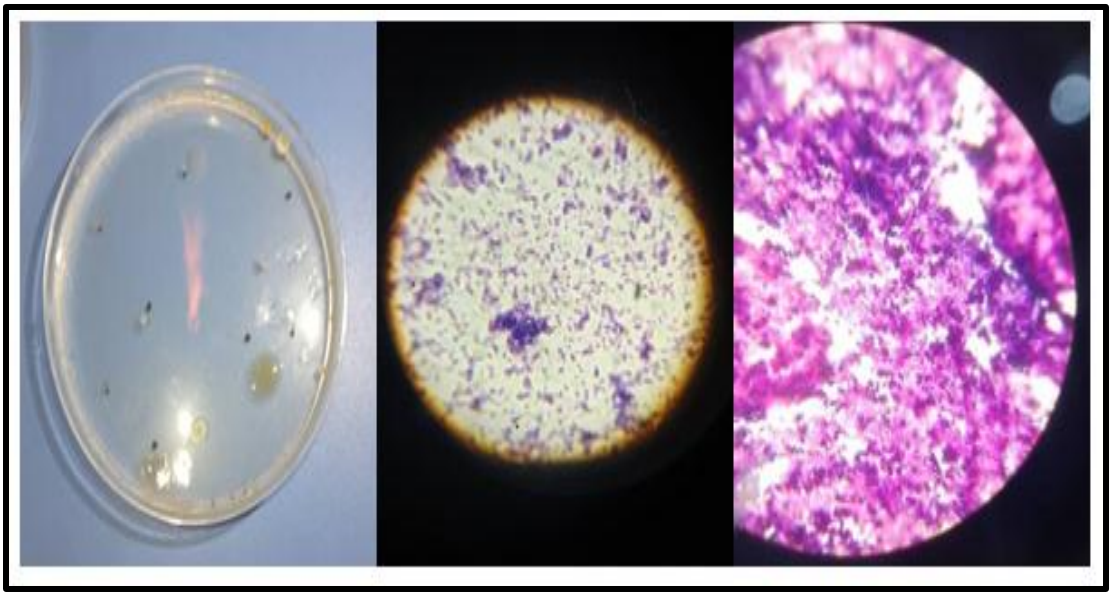


Figure18. Aspect microscopique des isolats (coloration de gram)

Ces caractères morphologiques observés sont en accord avec ceux d'écrits dans la littérature pour des bactéries associées aux copépodes marins, où les communautés microbiennes comprennent à la fois des Gram-positives (notamment des genres comme *Bacillus* ou *Staphylococcus*) et des Gram-négatives (comme *Vibrio* ou *Pseudomonas*)

(Shoemaker & Moisander, 2017 ; Tang et al., 2010). Ainsi, l'analyse par coloration de Gram, bien que simple, constitue un outil fiable pour initier l'identification des isolats bactériens issus d'organismes marins ou d'écosystèmes complexes.

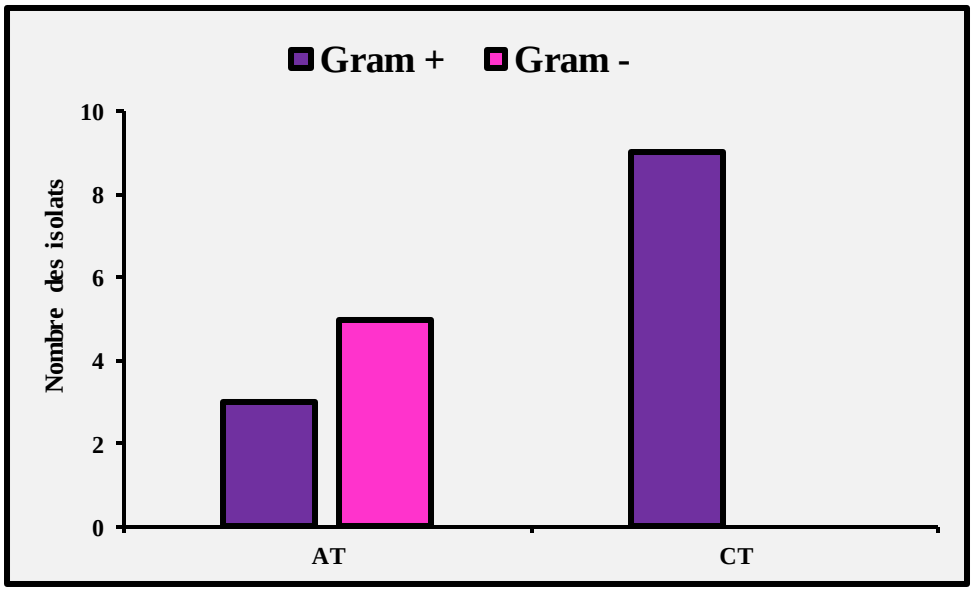


Figure19. Nombre des souches Gram + et Gram - issues des copépodes CT et AT

III. 4. 2. Catalase

La catalase est une enzyme présente chez la majorité des bactéries aérobies strictes et des anaérobies facultatifs. Elle catalyse la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en dioxygène (Fig.20).

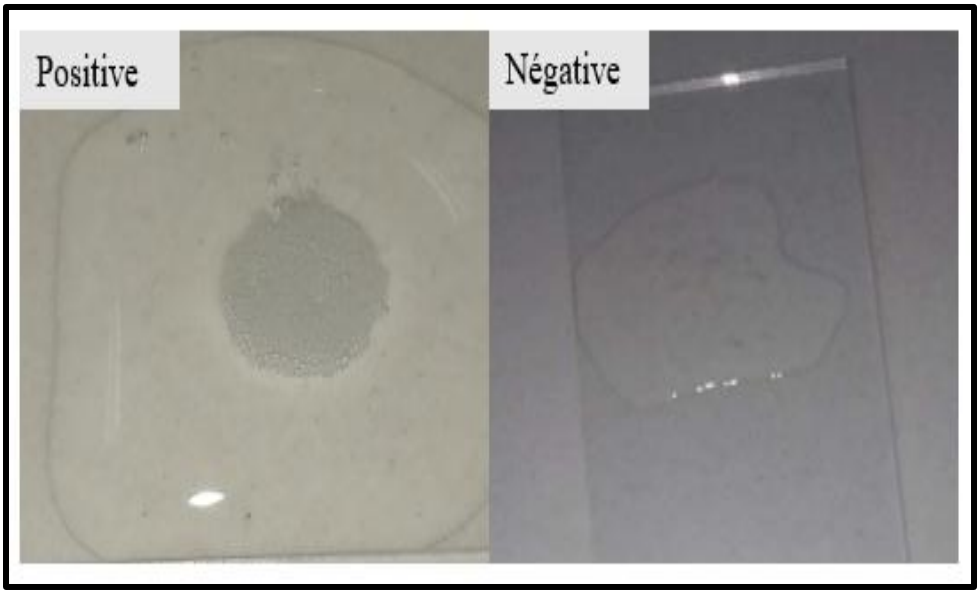


Figure20. Mise en évidence de la réaction gazeuse catalysée par l'enzyme Catalase

Nos résultats indiquent que 46 isolats soit une proportion de 70.77% présentent un test de catalase positif (27 et 19 isolats pour chaque espèce ; AT et CT, successivement), ce qui suggère qu'elles sont principalement des aéro-anaérobies facultatives (Fig. 21). Seulement 19 isolats (29.23%) obtenues des deux espèces de copépodes présentent un test de catalase négatif (7 isolats provenant d'AT et 12 isolats provient de CT) (Fig. 21).

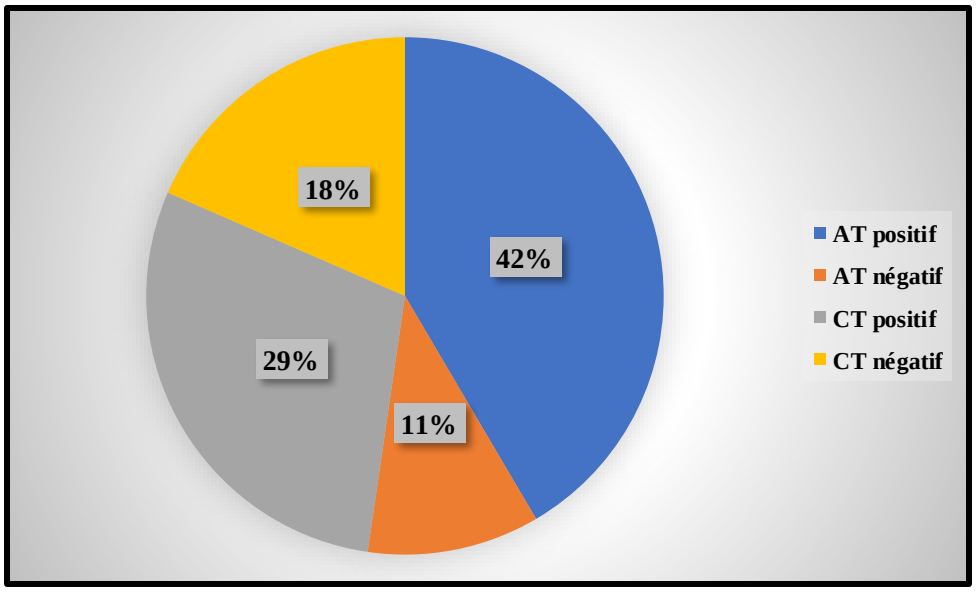


Figure21. Répartition en pourcentage des isolats selon leurs activités vis-à-vis le catalase

L'étude par compartiment a montré que pour l'espèce *Acartia tonsa*, sept isolats présentent une réaction négative vis-à-vis la catalase ; 3 isolats provient du compartiment exo-biotique et 4 isolats provient du compartiment endo-biotique. Le reste des isolats présentent une réaction positive, 11 isolats provenant du compartiment endo-biotique et 16 isolats provenant du compartiment exo-biotique (Fig. 22).

Concernant *Centropages typicus*, l'ensembles des isolats provenant du compartiment endo-biotique sont positifs. La répartition des isolats positifs et négatifs issus du comportement exo-biotique est équitable (11 positifs et 12 négatifs) (Fig. 22).

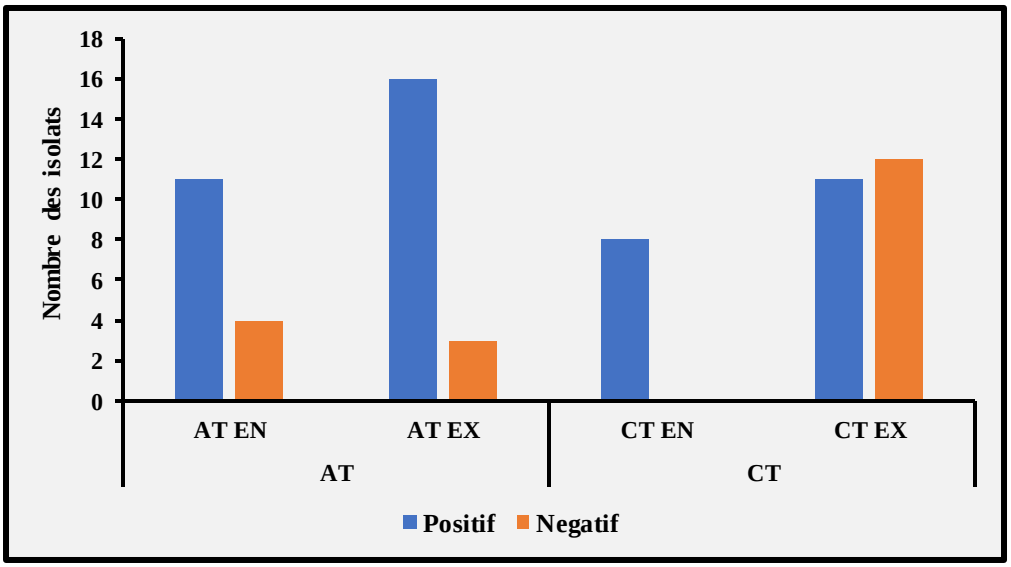


Figure22. Résultats par compartiment de la réaction vis à vis le catalase

III. 5. Caractérisation physiologique (Tolérance à la salinité)

Les résultats du test physiologique que nous avons réalisés pour évaluer la tolérance de nos souches à la salinité indiquent que les 17 isolats testés possèdent une croissance à tous les niveaux de stress salin provoqué par le Nacl.

A une concentration de 100 mM, la plupart des isolats montrent une bonne croissance à cette concentration, avec une densité optique (DO) comprise entre 0,845 et 1,244. La majorité des isolats ont une DO supérieure à 1, ce qui indique une très bonne croissance. Quelques isolats présentent des valeurs de DO légèrement inférieures à 1, mais toujours au-dessus de 0,8, suggérant une tolérance modérée (Fig. 23).

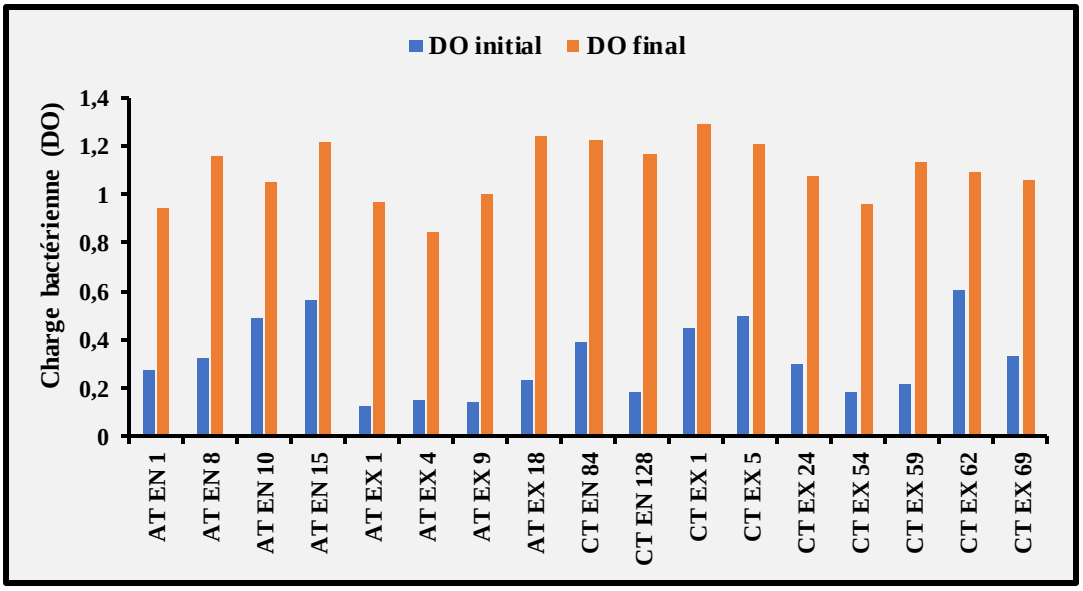


Figure23. Influence de la salinité (Nacl = 100 mM) sur l'activité bactérienne

A une concentration de 200 mM, les isolats montrent une tolérance variable. La plupart des isolats ont une DO comprise entre 0.612 et 1.115 indiquant une bonne croissance. Quelques isolats montrent une sensibilité accrue avec des valeurs de DO inférieures à 0.5, comme 0.434 et 0.495 (Fig. 24).

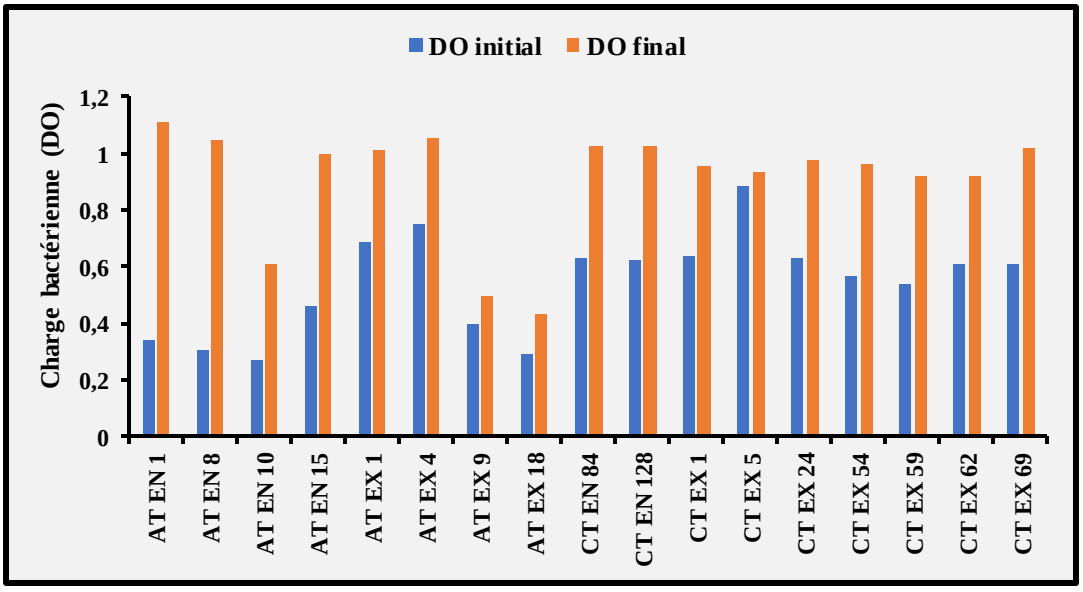


Figure24. Influence de la salinité (Nacl = 200 mM) sur l'activité bactérienne

A une concentration plus élevée (300 mM), les isolats montrent des réponses variées. Environ 53% des isolats (9 sur 17) montrent une bonne croissance avec une DO supérieure à 0.5. Certains isolats montrent une sensibilité accrue avec des valeurs de DO inférieures à 0.3, indiquant une faible tolérance à cette concentration (Fig. 25).

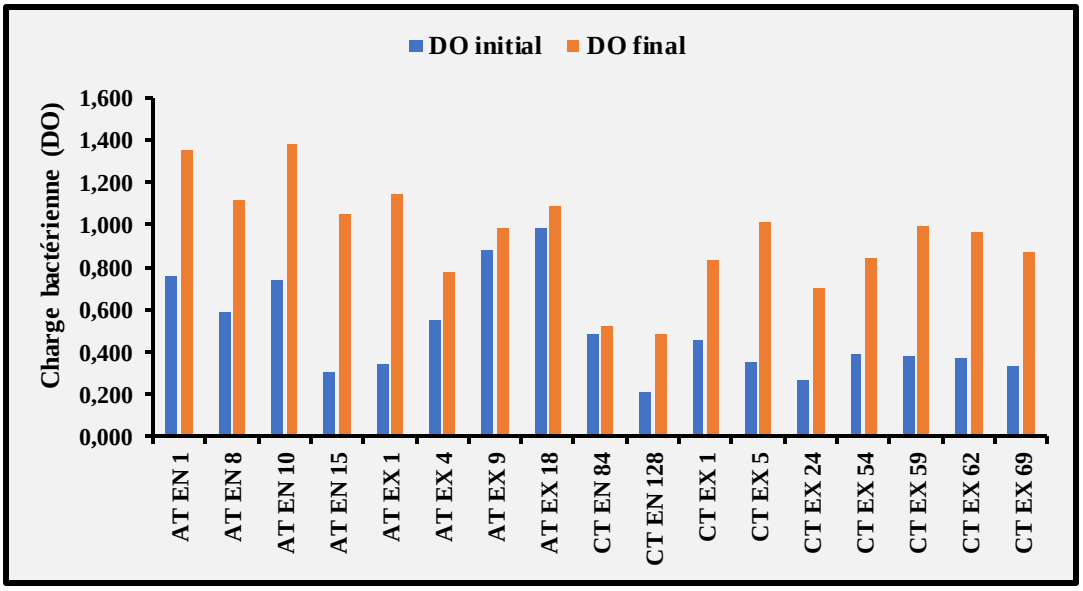


Figure25. Influence de la salinité (Nacl = 300 mM) sur l'activité bactérienne

Il ressort du test de l'effet de la salinité sur la croissance et le développement de nos isolats que la plupart possèdent une bonne croissance à toutes les concentrations (100 mM et 200 mM) avec une densité optique comprise entre 0.5 et 0.9, à l'exception des souches AT EX 04, AT EX 09 et CT EX 05, qui ont montré une sensibilité aux concentrations de 100 mM et 200 mM avec une croissance bactérienne comprise entre 0.052 et 0.202.

Par la comparaison des souches par rapport à l'effet de la salinité sur différentes concentrations, on remarque une proportion de 70.58% soit 12 isolats qui ont une bonne croissance pour une concentration de 100 mm, contre 11.77% soit 2 isolats seulement pour une concentration de 200 mM et 35.30% soit 6 isolats pour une concentration de 300 mM (Tab. 2).

Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent que les bactéries provenant de l'espèce *Acartia tonsa* (station de dessalement) tolèrent mieux les variations de salinité par rapport aux souches associées à l'espèce *Centropages typicus* (ferme aquacole). Cette différence peut s'expliquer par l'écologie particulière d'*A. tonsa*, une espèce de copépode reconnue pour sa remarquable adaptabilité aux environnements caractérisés par une large gamme de salinité (Lee et al., 2003). Cette espèce est connue pour être bien adaptée aux environnements aquatiques caractérisés par une large gamme de salinité, ce qui pourrait favoriser l'association avec des communautés bactériennes présentant des mécanismes de tolérance au sel plus développés. Il a été démontré que les microorganismes peuvent endurer le stress de salinité via soit la stratégie "salt-in", impliquant l'absorption d'ions inorganiques, soit la stratégie "salt-out", s'appuyant sur des solutés compatibles. Cette

capacité à tolérer des niveaux élevés de salinité indique que ces isolats peuvent être adaptés à des environnements stressants et variés, ce qui est cohérent avec les études récentes sur la diversité cryptique et la différenciation écologique des copépodes estuariens, qui démontrent l'importance des adaptations microbiennes dans les écosystèmes à gradient de salinité (Ventsel et al., 2023; Wu et al., 2024).

Tableau 2. Croissance bactérienne à différentes concentrations de NaCl chez les souches isolées d'Acartia tonsa (AT) et Centropages typicus (CT)

	Salinité		
Souches	100 mM	200 mM	300 mM
AT EN 1	0.667	0.773	0.600
AT EN 8	0.834	0.742	0.527
AT EN 10	0.567	0.344	0.634
AT EN 15	0.648	0.537	0.753
AT EX 1	0.838	0.326	0.800
AT EX 4	0.690	0.298	0.220
AT EX 9	0.861	0.101	0.108
AT EX 18	1.009	0.142	0.100
CT EN 84	0.836	0.402	0.037
CT EN 128	0.984	0.404	0.277
CT EX 24	0.781	0.346	0.435
CT EX 69	0.731	0.409	0.536
CT EX 1	0.844	0.323	0.383
CT EX 54	0.780	0.399	0.454
CT EX 59	0.918	0.380	0.612
CT EX 62	0.481	0.313	0.599
CT EX 5	0.710	0.052	0.665

III.6. Etude comparative : Analyse des profils biochimiques de souches bactériennes isolées de deux espèces de copépodes marins

L'étude comparative des profils biochimiques des bactéries isolées de deux espèces de copépodes largement répondues, *Acartia tonsa* et *Centropages typicus*, provenant respectivement de fermes aquacoles et de rejets de dessalement, offre une opportunité unique d'élucider l'influence de l'environnement d'origine sur les capacités métaboliques des communautés bactériennes associées (Rodríguez-Salazar et al., 2021). *Acartia tonsa*, espèce cosmopolite d'importance écologique majeure, présente une plasticité remarquable face aux variations environnementales (Zhao et al., 2024), tandis que *Centropages typicus*, copépode calanoide typique des eaux tempérées, constitue un

modèle d'étude privilégié pour les interactions biotiques marines (Selander et al., 2020). Le copépode estuarien *Acartia tonsa* porte naturellement diverses souches de bactéries sur son corps (Tang et al., 2009), et des études récentes ont démontré que ces associations peuvent varier selon les conditions trophiques et chimiques du milieu (Sadaiappan et al., 2021 ; Feng et al., 2023). L'analyse des activités enzymatiques bactériennes, incluant les phosphatases, uréases, amylases, protéases et catalases, permet de caractériser les capacités métaboliques de ces communautés et leur potentiel d'adaptation aux stress environnementaux (Arnosti, 2011). La compréhension des profils enzymatiques de ces communautés dans différents contextes environnementaux, particulièrement en milieux anthropisés comme les installations aquacoles et les rejets industriels, peut éclairer les processus écologiques régissant les interactions hôte-microbiome face aux perturbations anthropiques et aux changements globaux (Apprill, 2017 ; Parfrey et al., 2018).

L'analyse des profils biochimiques des souches bactériennes isolées de deux espèces de copépodes (*Acartia tonsa* et *Centropages typicus*) par dendrogramme (clusterneatmap) révèle que ces souches se regroupent selon leurs capacités métaboliques plutôt que selon leur espèce hôte d'origine, en accord avec les travaux de Lloyd et al. (2022) sur la variabilité enzymatique des communautés bactériennes planctoniques.

Trois clusters principaux sont identifiés : un cluster supérieur (groupe A) dominé par les souches isolées de *Centropages typicus* (CT EX 1, CT EX 59 et CT EX 62) présentant une activité positive pour la majorité des tests, un cluster intermédiaire (groupe B) composé d'un mélange de souches provenant des deux espèces de copépodes aux profils variables, c'est un groupe des souches qui dégrade le phosphate mais elles présentent un test de catalase négatif. Enfin, un cluster inférieur (groupe C) regroupant des souches aux profils plus spécifiques, il s'agit des souches présentent un test de catalase positif (aéro-anaérobies facultatives) (Fig. 26).

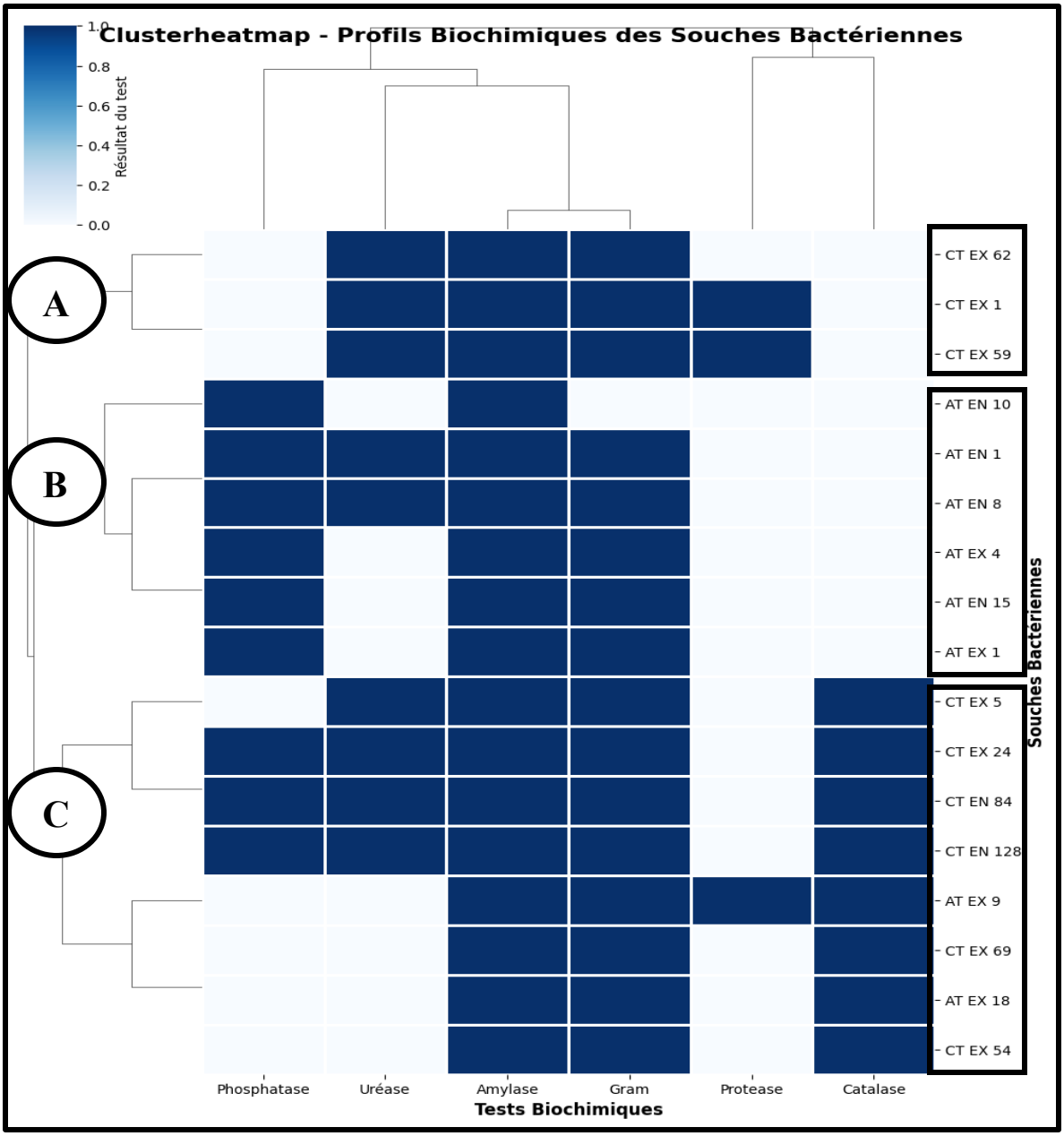


Figure26. Dendrogramme et heatmap des activités enzymatiques bactériennes chez Acartia tonsa et Centropages typicus

Conclusion

Conclusion

L'étude de la diversité et de la fonction des bactéries associées aux copépodes *Acartia tonsa* et *Centropages typicus* de la région algéroise a révélé des aspects clés de l'interaction entre ces crustacés marins et leur microbiome.

La densité bactérienne totale des deux espèces ne sont pas similaires, avec 250 colonies pour *Centropages typicus* et 238 colonies pour *Acartia tonsa*. Cependant, les bactéries de *Centropages typicus* sont principalement à croissance lente (68,8%), tandis que *Acartia tonsa* est peuplé principalement par des bactéries à croissance rapide (46,05%) et intermédiaire (36.18%). De plus, les bactéries de *Centropages typicus* sont majoritairement exobiotiques contrairement à celles de *Acartia tonsa qui* sont essentiellement endobiotiques. L'analyse des morphologies bactériennes a révélé l'existence de 20 morphotypes distincts basés sur la couleur et l'aspect macroscopique des colonies bactériennes, avec une prédominance notable des colonies noires et blanches. Cette diversité morphologique pourrait refléter des adaptations spécifiques au microenvironnement des copépodes et pourrait avoir des implications pour leur fitness et leur interaction avec leur environnement

L'étude de l'activité enzymatique des bactéries associées aux copépodes *Centropages typicus* (CT) et *Acartia tonsa* (AT) a révélé des différences significatives dans les profils enzymatiques entre ces deux espèces ainsi qu'entre leurs compartiments endobiotiques et exobiotiques. Au niveau de compartiment endobiotique, une augmentation de l'activité de l'uréase et de la gélatinase a été observée chez AT tandis que des profils inversés ont été notés chez CT pour des enzymes telles que la phosphatase et l'amylase respectivement. Ces observations mettent en évidence une variété de fonctions adaptatives qui sont influencées par des facteurs écologiques et évolutifs complexes, tels que la composition chimique du milieu interne des copépodes et les interactions spécifiques entre les bactéries et leur hôte.

L'étude physiologique des bactéries isolées met en évidence une grande variété en ce qui concerne leur tolérance à la salinité. La plupart de ces isolats démontrent une bonne capacité à se développer dans des milieux salins modérés. La capacite physiologique joue un rôle crucial dans la préservation de l'environnement dans les écosystèmes marins.

Cette étude offre une compréhension approfondie des relations symbiotiques, commensalistes et prédatrices entre les bactéries et les copépodes, tout en mettant en lumière les adaptations bactériennes à divers facteurs environnementaux. Les résultats

obtenus peuvent non seulement enrichir notre connaissance des écosystèmes marins, mais aussi contribuer à élaborer des stratégies de conservation et de gestion durable, essentielles pour faire face aux défis environnementaux actuels.

À l'issue de cette étude, plusieurs axes de développement et recommandations se dessinent :

Exploration de la diversité fonctionnelle continue

Investigation approfondie des divers profils enzymatiques

Recherche sur les interactions biofilm-environnement

Références bibliographiques

Almada, A. A., & Tarrant, A. M. (2016). Vibrio elicits targeted transcriptional responses from copepod hosts. FEMS microbiology ecology, 92(6), fiw072.

Analytik Jena, Allemagne. (n.d.). *SPECORD 50* [Manuel d'utilisation]. Disponible sur : www.analytik-jena.com

Apprill, A. (2017). Marine animal microbiomes: toward understanding host–microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science*, *4*, 222.

Ariffin, H., Abdullah, N., Md Shah, U. K., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2006). Production and characterization of cellulases by Bacillus pumilus EB3. International Journal of Engineering and Technology, 3(1), 47-53.

Arnosti, C. (2011). Microbial extracellular enzymes and the marine carbon cycle. *Annual review of marine science*, *3*(1), 401-425.

Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., & Thingstad, F. (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. Marine Ecology Progress Series, 10, 257-263.

Bass, D., Rueckert, S., Stern, R., Cleary, A. C., Taylor, J. D., Ward, G. M., & Huys, R. (2021). Parasites, pathogens, and other symbionts of copepods. *Trends in Parasitology*, *37*(10), 875-889.

Benedetti, F. (2016). "Impacts du changement climatique sur la diversité fonctionnelle du zooplancton, le cas des copépodes planctoniques de mer Méditerranée." Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, École doctorale de Biologie à l'École Normale Supérieure, spécialité Écologie, Environnement.

Beveridge, T. J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *International review of cytology*, *72*, 229-317.

Bickel, S. L., & Tang, K. W. (2014). Zooplankton-associated and free-living bacteria in the York River, Chesapeake Bay: comparison of seasonal variations and controlling factors. Hydrobiologia, 722, 305-318.

Bradford-Grieve, Janet M. 2004. "Deep-Sea Benthopelagic Calanoid Copepods and Their Colonization of the Near-Bottom Environment." Zoological Studies 43 (2): 276–91. http://www.sinica.edu.tw/zool/zoolstud/43.2/276.

Brown, Michael D., Brian H. Kay, and Joan K. Hendrikz. 1991. "Evaluation of Australian Mesocyclops (Cyclopoida: Cyclopidae) for Mosquito Control." Journal of Medical Entomology 28 (5): 618–23. https://doi.org/10.1093/jmedent/28.5.618.

Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., & Osman, G. (2003). Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic Bacillus sp. isolate ANT-6. *Process Biochemistry*, *38*(10), 1397-1403.

Calbet, A., & Saiz, E. (2005). The ciliate-copepod link in marine ecosystems. *Aquatic Microbial Ecology*, *38*(2), 157-167.

Calbet, A., Carlotti, F., & Gaudy, R. (2007). The feeding ecology of the copepod Centropages typicus (Kröyer). *Progress in Oceanography*, *72*(2-3), 137-150.

Camastra, S., Gastaldelli, A., Mari, A., Bonuccelli, S., Scartabelli, G., Frascerra, S., ... & Ferrannini, E. (2011). Early and longer term effects of gastric bypass surgery on tissue-specific insulin sensitivity and beta cell function in morbidly obese patients with and without type 2 diabetes. Diabetologia, 54, 2093-2102.

Christensen, W. B. (1946). Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella types. *Journal of bacteriology*, *52*(4), 461-466.

Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., ... & Voultsiadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: estimates, patterns, and threats. *PloS one*, *5*(8), e11842.

DasSarma, S. Arora, P., (2001). Halophiles. Encyclopedia of Life Sciences.

De Magny, G. C., Mozumder, P. K., Grim, C. J., Hasan, N. A., Naser, M. N., Alam, M., ... & Colwell, R. R. (2011). Role of zooplankton diversity in Vibrio cholerae population dynamics and in the incidence of cholera in the Bangladesh Sundarbans. Applied and environmental microbiology, 77(17), 6125-6132.

Del Giorgio, P. A., & Duarte, C. M. (2002). Respiration in the open ocean. Nature, 420(6914), 379-384.

Delarras, C. (2014). Pratique en microbiologie de laboratoire : Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier, Technique et Documentation.

Edi Premono, M., Moawad, A. M., & Vlek, P. L. G. (1996). Effect of phosphate-solublizing Pseudomonas putida on the growth of maize and its survival in the rhizosphere.

Elad, Y., & Kapat, A. (1999). The role of Trichoderma harzianum protease in the biocontrol of Botrytis cinerea. European Journal of plant pathology, 105, 177-189.

Farooq, S. (1998). Role of marine microorganisms in the global carbon cycle. Oceanography and Marine Biology: An Annual Review, 36, 49-94.

Fenchel, T. (2008). The microbial loop – 25 years later. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 366(1-2), 99-103.

Feng, J., Mazzei, M., Di Gregorio, S., Niccolini, L., Vitiello, V., Ye, Y., ... & Buttino, I. (2023). Marine Copepods as a Microbiome Hotspot: Revealing Their Interactions and Biotechnological Applications. Water, 15(24), 4203.

Gasol, J. M., & Kirchman, D. L. (2018). Marine microbiology: Time to embrace ecology in considering the role of microorganisms in the ocean. Nature Microbiology, 3(8), 825-831.

Gorokhova, E.; El-Shehawy, R.; Lehtiniemi, M.; Garbaras, A. (2021). How Copepods Can Eat Toxins Without Getting Sick: Gut Bacteria Help Zooplankton to Feed in Cyanobacteria Blooms. Front. Microbiol, 11, 589816.

Gram, H. C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. Fortschritte der Medizin, 2, 185-189.

Grossart, H. P., Dziallas, C., Leunert, F., & Tang, K. W. (2010). Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(26), 11959-11964.

Holland, R. S., & Hergenrader, G. L. (1981). Bacterial epibionts of diaptomid copepods. Transactions of the American Microscopical Society, 56-65.

Humes, Arthur G. (1994). "How Many Copepods?" Hydrobiologia 292–293 (1): 1–7., https://doi.org/10.1007/BF00229916.

Huq, A., Small, E. B., West, P. A., Huq, M. I., Rahman, R., & Colwell, R. R. (1983). Ecological relationships between Vibrio cholerae and planktonic crustacean copepods. Applied and environmental microbiology, 45(1), 275-283.

Ianora, A., & di Carlo, B. S. (1988). Observations on egg production rates and seasonal changes in the internal morphology of Mediterranean populations of Acartia clausi and Centropages typicus. *Hydrobiologia*, *167*, 247-253.

Joffin, J. N., & Leyral, G. (2006). Microbiologie technique tome 1 dictionnaire des techniques. *Bordeaux, France, centre régional de documentation d'Aquitaine*.

Kaneko, T., & Colwell, R. R. (1975). Adsorption of Vibrio parahaemolyticus onto chitin and copepods. Applied microbiology, 29(2), 269-274.

Kour, D., Rana, K. L., Kaur, T., Yadav, N., Halder, S. K., Yadav, A. N., ... & Saxena, A. K. (2020). Potassium solubilizing and mobilizing microbes: biodiversity, mechanisms of solubilization, and biotechnological implication for alleviations of abiotic stress. In New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering (pp. 177-202). Elsevier.

Kushner, D. J. (1978). Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria. *Microbial life in extreme environments*, 317-368.

Lee, C. E., Remfert, J. L., & Gelembiuk, G. W. (2003). Evolutionary origins of invasive populations. *Evolution*, 57(12), 2827-2838.

Lejeusne, C., Chevaldonné, P., Pergent-Martini, C., Boudouresque, C. F., & Pérez, T. (2010). Climate change effects on a miniature ocean: the highly diverse, highly impacted Mediterranean Sea. *Trends in ecology & evolution*, *25*(4), 250-260.

Lloyd, C. C., Brown, S., Balmonte, J. P., Hoarfrost, A., Ghobrial, S., & Arnosti, C. (2022). Particles act as 'specialty centers' with expanded enzymatic function throughout the water column in the western North Atlantic. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 882333.

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2018). Brock Biology of Microorganisms 15th edn, 71–74.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (1997). Brock biology of microorganisms (Vol. 11). Upper Saddle River, NJ: Prentice hall.

Marten, Gerald G. 2001. Human Ecology: Basic Concepts for Sustainable Development. Earthscan Publications.

Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current microbiology*, *43*, 51-56.

Meyer, A., Deiana, J., & Bernard, A. (2004). *Cours de microbiologie générale : avec problèmes et exercices corrigés*. Wolters Kluwer France. Midya, S., Ganguly, R. K., Islam, S. S., & Chakraborty, S. K. (2019). Attachment and antimicrobial susceptibility of bacterial associates

of zooplanktonic copepod: Lesson for environmental safety. Ecotoxicology and Environmental Safety, 180, 749-755.

Midya, S., Ganguly, R. K., Islam, S. S., & Chakraborty, S. K. (2019). Attachment and antimicrobial susceptibility of bacterial associates of zooplanktonic copepod: Lesson for environmental safety. Ecotoxicology and Environmental Safety, 180, 749-755.

Milne-Edwards, H. (1840). Histoire Naturelle Des Crustacés : Comprenant l'anatomie, La Physiologie et La Classification de Ces Animaux. Paris : Librairie encyclopédique de Roret. https://www.biodiversitylibrary.org/item/54604.

Moisander, P. H., Sexton, A. D., & Daley, M. C. (2015). Stable associations masked by temporal variability in the marine copepod microbiome. *PLoS one*, *10*(9), e0138967.

Møller, E. F., Riemann, L., & Søndergaard, M. (2007). Bacteria associated with copepods: Abundance, activity and community composition. Aquatic Microbial Ecology, 47, 99–106.

Nagasawa, S. (1989). Épibiontes bactériennes de copépodes. Progrès scientifique, 73(2), 169- 176. https://www.jstor.org/stable/43421029

Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS microbiology Letters, 170(1), 265-270. http://dx.doi.org/10.1111/j.1574- 6968.1999.tb13383.x.

Oren, A. (2006). *Halophilic microorganisms and their environments* (Vol. 5). Springer science & business media.

Parfrey, L. W., Moreau, C. S., & Russell, J. A. (2018). Introduction: The host-associated microbiome: Pattern, process and function. *Molecular ecology*, *27*(8).

Pérès, J., Devèze, L. (1963). La vie pélagique. Paris : Presses Universitaires de France.

Petit, J. et Jobin, P. (2005). La fertilisation organique des cultures. FABQ, Québec,49p.

Petrou, K. (2023). Phytoplankton–Bacteria Interactions 1.0. *Microorganisms*, *11*(5), 1188.

Polain, S. (2016). Étude de la communauté bactérienne planctonique et suivi de deux bioindicateurs de l'état de santé du milieu dans la Baie de la Revellata (Corse). Dissertation de doctorat, Université de Liège, Département de Biologie, Écologie et Évolution, Laboratoire d'Écologie Animale et d'Écotoxicologie, Unité d'Écologie Marine.

Rawlings, T. K., Ruiz, G. M., & Colwell, R. R. (2007). Association of Vibrio cholerae O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods Acartia tonsa and Eurytemora affinis. Applied and environmental microbiology, 73(24), 7926-7933.

Rodríguez-Salazar, J., Loza, A., Ornelas-Ocampo, K., Gutierrez-Rios, R. M., & Pardo-López, L. (2021). Bacteria from the Southern Gulf of Mexico: baseline, diversity, hydrocarbon-degrading potential and future applications. *Frontiers in Marine Science*, *8*, 625477.

Rossi, N. (2008). Écologie des communautés planctoniques méditerranéennes et étude des métaux lourds (Cuivre, Plomb, Cadmium) dans différents compartiments de deux écosystèmes côtiers (Toulon, France) (Doctoral dissertation, Université du Sud Toulon Var).

Sadaiappan, B., PrasannaKumar, C., Nambiar, V. U., Subramanian, M., & Gauns, M. U. (2021). Meta-analysis cum machine learning approaches address the structure and biogeochemical potential of marine copepod associated bacteriobiomes. *Scientific Reports*, *11*(1), 3312.

Savage, R.-L. (2020). "Characterizing the diversity of the eukaryotic microbiome in marine crustacean zooplankton." Thèse de maîtrise, The University of Western Ontario, Electronic Thesis and Dissertation Repository, 7442. https://ir.lib.uwo.ca/etd/7442.

Savichtcheva, O., & Okabe, S. (2006). Alternative indicators of fecal pollution: Relations with pathogens and conventional indicators, current methodologies for direct pathogen monitoring and future application perspectives. Department of Urban and Environmental Engineering, Graduate School of Engineering, Hokkaido University, North-13, West-8, Kita-ku, 060-8628 Sapporo, Japan. Water Research, 40(14), 3327-3339. https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.040

Selander, E., Fredriksson, S. T., & Arneborg, L. (2020). Chemical Signaling in the Turbulent Ocean—Hide and Seek at the Kolmogorov Scale. *Fluids*, *5*(2), 54.

Selden, P. A., Huys, R., Stephenson, M. H., Heward, A. P., & Taylor, P. N. (2010). Crustaceans from bitumen clast in Carboniferous glacial diamictite extend fossil record of copepods. Nature Communications, 1(1), 50. https://doi.org/10.1038/ncomms1049

Shoemaker, K. M., & Moisander, P. H. (2017). Seasonal variation in the copepod gut microbiome in the subtropical North Atlantic Ocean. *Environmental microbiology*, *19*(8), 3087-3097.

Shoemaker, K. M., Duhamel, S., & Moisander, P. H. (2019). Copepods promote bacterial community changes in surrounding seawater through farming and nutrient enrichment. *Environmental microbiology*, *21*(10), 3737-3750.

Sigma-Aldrich, Allemagne. (n.d.). *Acide acétique 33% (v/v)* [Fiche technique]. Disponible sur : www.sigmaaldrich.com

Sigma-Aldrich, Allemagne. (n.d.). *Ethanol 96%* [Fiche technique]. Disponible sur : www.sigmaaldrich.com

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(5), a000414.

Simon, M., Grossart, H., Schweitzer, B., & Ploug, H. (2002). "Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems." Aquatic Microbial Ecology, 28, 175–211.

Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera d'Alcalá, M., Vaqué, D., & Zingone, A. (2010). Plankton in the open Mediterranean Sea: a review. *Biogeosciences*, *7*(5), 1543-1586.

Steinberg, D. K., & Landry, M. R. (2017). Zooplankton and the ocean carbon cycle. Annual review of marine science, 9, 413-444.

Stock, W., Heylen, K., Sabbe, K., Willems, A., & De Troch, M. (2014). Interactions between benthic copepods, bacteria and diatoms promote nitrogen retention in intertidal marine sediments. *PLoS One*, *9*(10), e111001.

Sugier, K. (2019). "Molecular and anatomical study of the epipelagic copepod Oithona nana (Crustacea; Cyclopoida)." Thèse de doctorat, NMT : 2019SACLE045, Université Paris-Saclay, préparée à l'Université Evry Val d'Essonne et au CEA-Genoscope. École doctorale n° 577 Structure et dynamiques des systèmes vivants (SDSV), Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie et de la Santé. Thèse présentée et soutenue à Evry, le 12/12/2019.

Tang, K. W., Turk, V., & Grossart, H. P. (2010). Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*, *61*(3), 261-277.

Tang, K., Dziallas, C., Hutalle-Schmelzer, K., & Grossart, H. P. (2009). Effects of food on bacterial community composition associated with the copepod Acartia tonsa Dana. *Biology Letters*, *5*(4), 549-553.

Tang, K.W. (2005). Copepods as microbial hotspots in the ocean: Effects of host feeding activities on attached bacteria. Aquat. Microb.Ecol. 38, 31–40.

Tang, K.W.; Turk, V. (2010). Grossart, H.P. Linkage between crustacean zooplankton and aquatic bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 61, 261–277.

Thomas, K.U.; Joseph, N.; Raveendran, O. (2006) Nair, S. Salinity-induced survival strategy of Vibrio cholerae associated with copepods in Cochin backwaters. Mar. Pollut. Bull. 52, 1425–1430.

Van der Jagt, H., Wiedmann, I., Hildebrandt, N., Niehoff, B., & Iversen, M. H. (2020). Aggregate Feeding by the Copepods Calanus and Pseudocalanus Controls Carbon Flux Attenuation in the Arctic Shelf Sea During the Productive Period. Frontiers in Marine Science, 7, 543124. https://doi.org/10.3389/fmars.2020.543124

Ventosa, A., Nieto, J. J., & Oren, A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, *62*(2), 504-544.

Wu, Z., Li, M., Qu, L., Zhang, C., & Xie, W. (2024). Metagenomic insights into microbial adaptation to the salinity gradient of a typical short residence-time estuary. *Microbiome*, *12*(1), 115.

Zamora Terol, S. (2013). Ecology of the marine copepod genus Oithona. Thèse de Doctorat en Sciences Marines, Universitat Politècnica de Catalunya (UPC), Département d'Ingénierie Hydraulique, Maritime et Environnementale, Institut des Sciences de la Mer (CSIC).

Zobell, C. E. (1957). Marine bacteria. Geological Society of America Memoirs, 67, 1035-1040.

Annexes

Annexe 01 : Appareillages et verreries

Appareillage	Verreries	Autre matériel
➢ Autoclave ➢ Bain marie ➢ Balance électrique ➢ Etuve ➢ Réfrigérateur ➢ Microscope optique ➢ PH-métre ➢ Plaque chauffante ➢ Vortex ➢ Spectrophotométre	➢ Becher ➢ Boite de pétri ➢ Erlenmeyer ➢ Fiole ➢ Tubes à essai ➢ Flacons ➢ Lames et lamelles	➢ Ance de platine ➢ Pipette pasteur ➢ Micro-pipette ➢ Gants jetables ➢ Bec benzen ➢ Papier aluminium, film et absorbant ➢ Portoir

Annexe 02 : Les compositions de solutions

Solution de stock glycérol à 80 % :

Glycérol····· 80 ml

Eau distillée·····. 20 ml

Solution sulfate d' ammonium :

Sulfate d'ammonium..... 50g

Eau distillée ·····...100ml

Solution tampon phosphate :

NaSpo4……. 09g

Eau distillée……... 1000ml

Solution NaOH :

NaOH……. 04g

Eau distillée…… 100ml

Solution d'urée

Urée……. 4g

Eau distillée……. 100ml

TSB

TSB……. 3g

Eau distillée……. 1000ml

Acide sulfirique

Acide sulfirique…… 5.4ml

Eau distillée……. 100ml

Cristal violet

Violet de gentiane……. 1g

Acide phénique……. 2g

Alcoolà 95%..... 10ml

Eau distillé…… 100ml

Lugol

I2……... 1g

KI……. 2g

Alcool à 95%..... 10ml

Eau distillée……. 100ml

Fuchsine

Fuchsine basique……. 1g

Acide phénique……. 5g

Alcool à 95%.....10ml

Eau distillée……. 100ml

Annexe 03 : Préparation et composition des milieux de cultures pour

1litre

Technique de préparation :

Pour chacun des milieux, les ingrédients sont pesés à l'aide d'une balance de précision et déposés dans une fiole jaugée puis rajouter le volume d'eau distillée à raison de 1000 ml. Le pH est mesuré par un pH-mètre puis ajusté par l'ajout soit du KOH ou du HCl ensuite répartir dans des flacons de 250 ml et autoclavés à 115° C pendant 15 minutes, une fois refroidies (45°C), l'antifongique (Terbinafine carbohydrate) est rajouté à raison de 5ml/l à l'aide d'un micro-filtre stérile de diamètre 0.22 μm.

NBRIP

Glucose……. 10g

Ca3(PO4)2……. 05g

(NH4)2SO4…… 0.1g

Nacl…… 0.2g

MgSO4.7H2O····· 0.25g

KCL····· 0.2g

Agar····· 15g

Milieu à base de pectine

Pectine····· 02g

Urée····· 0.05g

(NH4)2SO4····· 0.15g

Agar····· 20g

Gélose au lait

Lait écrémé poudre·····. 05g

Gélose nutritive

Peptone····· 15g

Extrait de viande·····. 10g

Extrait de levure·····. 02g

Chlorure de sodium·····. 05g

Agar……. 20g

Gélose au Tween 80

Peptone…… 10g

Nacl……. 5g

CaCl2.2H2O…… 0.1g

Tween 80

Agar……. 18g

TSA 1/10 à 1% Amidon

TSB……... 3g

Amidon……. 10g

Agar…….. 15g

Milieu à base de gélatine

TSB……... 3g

Gélatinase……. 6g

Agar……. 15g

Milieu Carder

Na2 HPO4…… 6g

KH2 PO4……. 3g

NaCl……. 0.5g

NH4Cl……. 1g

Extrait de levure……... 3g

Milieu à base de peptone

Peptone……. 1g

Glucose……. 1g

NaCl……... 5g

Na2HPO4……... 1.2g

KH2PO4……. 0.8g

Rouge de phénol…….. 0.012g

Solution d'urée..... 50ml

Agar..... 15g

Milieu Mannitol Mobilité Nitrat

Hydrolysat trypsique de caséine..... 20g

Mannitol..... 15g

Rouge de phénol..... 0.08g

Nitrat de potassium..... 2g

Agar..... 7g

TSA 1/10

TSB..... 3g

Agar..... 15g

Rouge Congo Agar

Coeur cervelle..... 37g

Saccharose..... 50g

Rouge Congo..... 0.8g

Agar·····... 10g

Annexe 04： coloration de gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

• Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame bien propre.

• Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau, strier et sécher par passage

Rapide sur la flamme d'un bec benzen.

• Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.

• Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

• Ajouté du lugol pendant 60 secondes.

• Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

• Décoloré avec l'alcool 95%. Pendant 15 min.

• Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.

• Ajouter la fuschine et laisser pendant 60 secondes.

• Laver à l'eau.

• Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement (× 100).

Les cellules Gram+ absorbent la couleur du cristal violet et demeurent bleues violettes en apparence, contrairement aux cellules Gram- qui apparaissent distinctement rosâtres.