الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر و تهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral

MEMOIRE DE FIND'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME D'INGENIEUR EN SCIENCE DE LA MER

OPTION: BIOTECHNOLOGIE MARINE

Thème :

Application des souches à potentiel probiotique dans un élevage d'Artémie

Réalisé par :

- **BOUACHA Nardjes**
- **CHERIFI Asma**

Soutenu le 28/10/2021 devant la commission du jury suivant :

Mme. AMAR I.	**Maître assistante A**	**présidente**
M. LOURGUIOUI H.	**Maître de Conférences B**	**Examinateur**
Mme. CHAOU N.	**Maître assistante A**	**Examinatrice**
Mme. ALOUACHE S.	**Maître de conférences A**	**Promotrice**
Mme. BOUACHA CH.	**Doctorante**	**Co-Promotrice**

Promotion : 2020/2021

Dédicace

La louange appartient à Allah qui ordonne la bienfaisance et l'entraide dans la piété, que son salut et sa bénédiction soit sur le dernier des prophètes. Chaque jour qui passe je remercie Allah, et je le pris tout le temps de me donner la force de suivre le chemin qu'il m'a tracé afin de mener à bien le destin qu'il m'a prévu. Dédicace à mes chers parents : Pour l'affection dont ils m'ont toujours comblé et les sacrifices infinis qu'ils n'ont cessé de consentir, avec abnégation, pour mon éducation. Veuillez trouver à travers ce modeste travail, l'expression de mon amour et mon respect les plus sincères. Qu'ALLAH puisse vous accorder une longue vie pleine d'amour, de bonheur et de paix. A mes chers frères Farouk et Ali et ma chère sœur Fahima ; avec tous mes vœux de réussite et de bonheur, avec tout mon attachement et ma tendresse. A mes chères copines : Samah ; Rahil et Lilia je vous serai éternellement reconnaissante pour votre soutien, votre confiance et votre fierté. A ma source d'amour Abdou qui m'a encouragé dans les moments difficiles : merci pour votre amour. A toute ma famille de prés et de loin. A Mon binôme Nardjes. À mes camarades de promotion. À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation durant mon cursus.

Dédicace

Je dédie ce modeste travaille au premier lieu à mon père, que dieu le protège, qui m'a beaucoup aidé à prendre des décisions fatidiques, et à la plus adorable maman qui a m'a persévérer pour accomplir ce projet et aussi ses prière pour moi.

À vos mes chères sœurs Chahrazed, Amina, Insaf vous m'avez aidé et supportée moralement, Dieu merci pour la bénédiction des adorables sœurs.

Sans oublier toutes mes copine Bouaziz nour el houda et Zouareg Sabah, qui étaient comme mes sœurs ou plus que ça car nous avons partagé certains des moments les plus difficiles de notre vie dans notre parcours, je vous aime et merci à dieu de m'avoir donné l'opportunité de faire votre connaissance.

A toute ma famille. A Mon binôme Asma que j'ai eu la chance de partager ce travaille. À tous mes camarades de mon parcours dans cette école. À tous les enseignants qui ont contribué à ma formation durant mon cursus.

Remerciements

Avant tout je remercie **ALLAH** azawajala le miséricordieux, le tout puissant et le plus clément qui nous aide et nous donne le courage de tout faire.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thématique de recherche de l'équipe Microbiologie et Biotechnologie Marine- Laboratoire CVRM-ENSSMAL. Il rentre dans le cadre d'un projet de recherche PRFU et la préparation de la thèse de doctorat de Mme BOUACHA Chahrazed. Ce travail n'a pu se réaliser sans l'effort fourni par plusieurs personnes. A cet effet, Nous tenons à remercier tout particulièrement :

Qu'il nous soit tout d'abord permis d'exprimer notre profonde gratitude à nos encadreurs, **Madame ALOUACHE S.** Maître de conférences à l'ENSSMAL qui a accepté de nous encadrer. Nous la remercions infiniment pour son aide, ses orientations, ses conseils précieux, sa patience merci pour tout.

Madame BOUACHA C. doctorante à l'ENSSMAL et Co-promotrice de ce mémoire, nous la remercions pour son suivi, sa collaboration, ses conseils, sa disponibilité et son accompagnement dans l'aspect technique

Mme. AMAR I. aitre assistante A à l'ENSSMAL, pour nous 'avoir honoré de présider ce jury.

Nous tenons à remercier les enseignantes qui ont accepté de faire partie de notre jury, nous remercions vivement **M. LOURGUIOUI H.** Maître de Conférences B à l'ENSSMAL et **Mme CHAOU N.** Maître assistante A à l'ENSSMAL d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous exprimons également nos remerciements à toute l'équipe et les ingénieures des laboratoires de l'ENSSMAL ainsi que tout le personnel de la bibliothèque pour leur disponibilité, aides et gentillesse.

A tous les enseignants qui ont contribué à nous donner une formation solide tout au long de nos années d'études.

En fin un grand merci à nos parents qui nous ont soutenues, encouragées et aidées tout au long de notre cursus.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ACRONYMES I

LISTE DES TABLEAUX II

LISTE DES FIGURES III

Introduction 1

Chapitre I : Généralités 3

I-1 Présentation de l'Artémie 4

I-1-1 Définition de l'*Artémia* 4

I-1-2 Classification 4

I-1-3 Morphologie 5

I-1-4 Cycle de vie et reproduction 5

I-1-5 Ecologies 7

I-1-6 Cystes 8

I-1-7 Nauplii 9

I-1-8 Adulte 9

I-1-9 Régime alimentaire 9

I-1-10 Utilisation de l'*Artemia* en aquaculture 10

I-2 : Généralité sur les Probiotiques 10

I-2-1 Définition 10

I-2-2 Les Caractéristiques des probiotiques 11

I-2-3 Les probiotiques en aquaculture 11

I-2-3-A Définition 11

I-2-4Utilisation 12

I-2-5 L'utilisation des probiotique chez l'artémie 13

Chapitre II : Matériels et méthodes 14

II-1- Etude de l'effet des souches (probiotiques/pathogènes) sur une culture axénique d'*Artémia* 15

II- 1-1- Préparation de la suspension bactérienne (probiotiques/ pathogènes) 15

II-1-2- Préparation de la culture d'Artémie axéniques 15

Artémia commerciale 15

II-1-2-1-Estimation de la charge des nauplius 16

II-1-2-2-Vérification du caractère axénique de la culture axénique d'*Artémia* (contrôle de la 16

stérilité) 16
II-1-3- Etude expérimentale de l'application des bactéries dans la culture axénique d'Artémie 16
II-1-3-1- Test de l'effet des souches probiotiques et pathogènes sur la culture *d'Artémia* 17
II-1-3-2-Test d'essai pour déterminer l'effet des souches probiotiques sur le contrôle des souches pathogènes 17
1. Essai probiotique 17
2. Essai pathogène 17
3. Contrôle probiotique + pathogène 17
II-1-3-3-Détermination des déférents paramètres 18
A. Détermination de la CL50 18
B. Détermination du taux de survie 18
C. Détermination de la taille 18
D. Détermination de la production de biomasse totale *d'Artémia* 19
II-1-3-4 Analyse statistique 19
Chapitre III : Résultats et Discussion 20
III-1-Résultats de l'application des souches probiotiques dans l'élevage d'*Artémia* 21
III-1-1 Effet des souches probiotiques sur la culture d'artémie en milieu stérile à différente concentration 21
III-1-1-1 Suivi de la charge bactérienne de souches probiotiques 21
III-1-1-2 Effet des différentes charge bactériennes des probiotique sur le taux de survie de nauplius 22
III-1-1-3 Détermination de la CL50 des souches probiotique 23
III-1-1-4 Effet des souches probiotiques sur la croissance des nauplii 24
III-1-1-4-A La taille 24
III-1-1-4-B La production totale de biomasse (TBP) 25
III-1-2 Effet des souches Pathogènes à différente concentration sur la culture d'artémie en milieux stérile 26
III-1-2-1 Le suivi de la charge bactérienne des souches pathogènes 26
III-1-2-2 Effet sur le taux de survie 27
III-1-2-3 Effet sur la croissance 28
III-1-2-3-A La taille 28
III-1-2-3-B La production totale biomasse 29
III-1-3 Application des souches probiotiques pour le contrôle de souches pathogènes 30

III-1-3-1 Effet sur le taux de survie 30
III-1-3-2 Effet sur la croissance 31
III-1-3-2-A La taille 31
III-1-3-2-B La biomasse 33
IV Discussion générale 35
Conclusion 37
Perspectives 39
Chapitre V: Références bibliographiques 40

LISTE DES ACRONYMES

MRS : de Man, Rogosa, Shrapova

UFC: Unité formelle colonie

F: Flacon

BHI: Brain Heart Infusion

T°: Température

PH: Potentiel Hydrogène

S: Salinité

g/l : Gramme par litre

ml : millilitre

h: Heure

Min: Minute

mm : Millimètre

°C : Degré celsius

CL: Concentration Létale

TBP: Total Biomass Production

IL : Indice de Longueur

EF: *Enterococcus faecium*

ED: *Enterococcus durans*

PS: *Psychrobacter cibarius*

VAN: *Vibrio anguillarum*

VAL: *Vibrio alginolyticus*

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 01: Les souches bactériennes utilisées dans cette étude 15

Tableau2 : L'évolution de la charge des bactéries probiotiques durant l'expérimentation 21

Tableau 03 : Les CL50 des souches probiotiques et pathogènes sur les nauplius d'*Artémia* 23

Tableau 04 :L'évolution de la charge des bactéries pathogènes durant l'expérimentation 27

Tableau05 : Les CL50 des souches pathogènes sur les nauplii d'artémie 28

LISTE DES FIGURES

Figure 01 : *Artémia sp* 4

Figure 02: Cycle de vie d'Artémia 6

Figure 03: cystes d'Artémie 9

Figure 04 : *Artémia* Commerciale 16

Figure 05 : Dénombrements des souches probiotiques sur gélose MRS 22

Figure 06 : Effet des souches a potentielle probiotique a différents charges sur la taille des nauplius d'artémie 23

Figure 07 : *Artémia sp.* (a) sous un microscope, (b) sous une loupe binoculaire, Gx40 24

Figure 08 : Effet des souches à potentiel probiotique à différentes charges sur la taille des nauplii d'artémie 24

Figure 09 : Effet des souches à potentiel probiotique à différentes charges sur la production de biomasse totale des nauplii d'artémie 26

Figure 10: Effet des souches pathogènes à différentes charges sur le taux de survie des nauplius d'Artémie 28

Figure 11 : Effet des souches pathogènes à différentes charges sur la taille des nauplius d'Artémie 29

Figure 12 : Effet des souches pathogènes à déférentes charges sur la biomasse des nauplius d'Artémie 30

Figure 13 : Les taux de survie des nauplii d'Artémie après l'application des différentes combinaisons (souches pathogènes/probiotiques) 31

Figure 14 : Suivi de la taille des nauplii d'Artémies après l'application des combinaisons souches pathogènes/souches probiotiques 32

Figure 15: Suivi de la biomasse des nauplii d'Artémies après l'application des combinaisons souches pathogènes/souches probiotiques 33

Abstract

The present work is mainly based on the study and evaluation of the efficacy of three probiotic strains *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* and *Psychrobacter cibarius* applied in a culture of *Artemia*, on the survival rate and growth of nauplii as well as on the control of pathogenic strains: *Vibrio anguillarum* and *Vibrio alginolyticus*.

The application of probiotic strains alone on the *Artemia* culture showed non-significant improvements on survival rate for E. faecium and P. cibarius at loadings of 10^7 and 10^8, and a significant improvement for *E. durans* at a loading of 10^8UFC/ml. Concerning the growth parameters size and total biomass, only *E. faecium* at 10^8UFC/ml showed a significant improvement.

The application of probiotic strains for the control of the pathogenic strains *V. alginolyticus* and *V. anguillarum* revealed a significantly positive effect on the survival rate of *Artemia* in the presence of *V. anguillarum* for all three applied strains and a significantly positive effect on the total biomass when *P. cibarius* was applied in the presence of *V. alginolyticus*. The results obtained show that the strains have an interesting probiotic potential as well as a capacity to control the effect of pathogenic strains such as *Vibrio* in an *Artemia* farm.

Résumé

Le présent travail s'articule essentiellement sur l'étude et l'évaluation de l'efficacité de trois souches probiotiques *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* et *Psychrobacter cibarius* appliquées dans une culture d'*Artemia*, sur le taux de survie et la croissance des nauplii ainsi que sur le contrôle des souches pathogènes :*Vibrio anguillarum* et *Vibrio alginolyticus*.

L'application des souches probiotiques seules sur la culture d'artémie a montré des améliorations non significatives sur le taux de survie pour *E. faecium et P. cibarius* à des charges de 10^7 et 10^8, et une amélioration significative pour *E. durans* à une charge de 10^8UFC/ml. Concernant les paramètres de croissance taille et biomasse totale, seule *E. faecium* à 10^8UFC/ml a présenté une amélioration significative.

L'application des souches probiotiques pour le contrôle des souches pathogènes *V. alginolyticus et V. anguillarum* a révélé un effet significativement positif sur le taux de survie des artémies en présence de *V. anguillarum* pour les trois souches appliquées et un effet significativement positif sur la biomasse totale lors de l'application de *P. cibarius* en présence de *V. alginolyticus.* Les résultats obtenus montrent que les souches possèdent un potentiel probiotique intéressant ainsi qu'une capacité de contrôler l'effet des souches pathogènes comme *Vibrio* dans un élevage d'artémie.

الملخص

يركز هذا العمل بشكل أساسي على دراسة وتقييم فعالية ثلاث سلالات بروبيوتيك، يتم تطبيق *Enterococcus faecium* و *Enterococcus durans* و *Psychrobacter cibarius* في مزرعة *Artemia* ، على معدل بقاء ونمو صغار الارتيميا وكذلك على التحكم في السلالات المسببة للأمراض: *Vibrio anguillarum* و *Vibrio alginolyticus*.

أظهر تطبيق سلالات الكائنات الحية المجهرية وحدها على مزرعة الأرتيميا تحسنًا معنويًا في معدل البقاء على قيد الحياة للبكتيريا البروبيوتيكية*E. faecium* و *P. cibarius* في التركيز10^7 و 10^8 ، وتحسنًا كبيرًا في *E. durans* في تركيز واحد قدره 10^8 خلية\مل. فيما يتعلق بحجم ومعلمات نمو الكتلة الحيوية الكلية، أظهر فقط *E. faecium* عند 10^8 خلية\مل تحسنًا ملحوظًا.

أظهر تطبيق سلالات الكائنات الحية المجهرية للتحكم في السلالات الممرضة لـ *V. alginolyticus* و *V. anguillarum* تأثيرًا إيجابيًا ملحوظًا على معدل بقاء الأرتيميا في وجود *V. anguillarum* للسلالات الثلاثة المطبقة وتأثيرًا إيجابيًا بشكل ملحوظ على معدل بقاء الأرتيميا. الكتلة الحيوية الكلية عند تطبيق *P. cibarius* في وجود *V. alginolyticus*. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالات لها إمكانات بروبيوتيك مثيرة للاهتمام بالإضافة إلى القدرة على التحكم في تأثير السلالات المسببة للأمراض مثل *Vibrio* في مزرعة الأرتيميا.

INTRODUCTION

Introduction

Le secteur aquacole est l'un des secteurs de production alimentaire qui croit le plus rapidement de nos jours. Mais l'accroissement des maladies est devenu une contrainte importante pour la production de l'aquaculture et le commerce, affectant ainsi le développement du secteur économique dans de nombreux pays **(Subasinghe et *al.*, 2001)**. Les espèces de Vibrio sont parmi les plus importants microbes pathogènes dans les cultures de crevettes et ils sont responsables de plusieurs maladies et mortalités dans le secteur aquacole **(Snoussi et *al.*,2009 ;Diggles et *al.*, 2000).** De ce fait, plusieurs méthodes de préventions et de traitements telles que l'utilisation d'antibiotiques ont été largement utilisées pour l'élevage en aquaculture **(Morinigo et *al.*, 2002)**. L'utilisation des antibiotiques pour le contrôle des maladies et la promotion de la croissance des animaux, augmente la pression sélective exercée sur la flore microbienne et encourage l'émergence naturelle de la résistance bactérienne.

Les nauplii d'*Artemia* représentent un maillon trophique indispensable pour nourrir plus de 80% des alevins des poissons et des larves de crustacés. Cette importance est due à la disponibilité, à la simplicité et à la valeur nutritionnelle par rapport à d'autres aliments **(Ben Naceur H. et *al.*, 2008)**. D'autre part, les Nauplii d'*Artemia* sont considérés comme un aliment convenable qui peut être facilement stocké et aisément manipulé et obtenu seulement après 24h d'incubation à partir des cystes **(Lavens et Sorgeloos ,2000)**.

De nos jours, les méthodes d'élevage des crustacés et des poissons dans les stations aquacoles favorisent plutôt la modification des conditions d'élevage, la sélection d'animaux génétiquement résistants aux maladies et l'utilisation des probiotiques. Ces derniers sont définis comme des adjuvants microbiens vivants ayant des effets bénéfiques sur l'hôte tels que la modification de la flore microbienne, l'augmentation de la réponse de l'hôte vis-à-vis des autres pathogènes, l'utilisation optimisée de l'alimentation et l'amélioration de la qualité de son environnement **(Sanders, 2000)**.

Le problème qui affecte la production en aquaculture comme les poissons, les crustacés, les mollusques …., est de trouver des solutions à des maladies dues aux bactéries pathogènes associées aux cultures d'Artémia, souvent redoutées en aquaculture telles que *Vibrio anguillarum et Vibrio alginolyticus*, et ainsi de trouver une nourriture convenable aux larves des organismes aquatiques**(Mahdhi et *al.*, 2011).**Afin de pallier à ce problème, il

est recommandé d'utiliser des alternatives aux antibiotiques à l'instar des probiotiques qui sont des microorganismes ayant un effet positif sur l'hôte en optimisant sa croissance, son taux de survie, et améliorer la qualité d'eau d'élevage**(Verma et Gupta, 2015).**

Notre but à travers ce travail est de tester *in vivo* dans une culture d'*Artémia*, des souches à potentiel probiotique afin de déterminer leur effet sur plusieurs critères à savoir : le taux de survie, la taille des nauplii, la biomasse totale ainsi que le contrôle des souches pathogènes à savoir *V. alginolyticus et V. anguillarum*.

Le contenu de ce travail s'articule en trois grandes parties :

- Généralités sur l'artémie et les probiotiques
- Matériel et méthodes
- Résultats et leurs interprétations.

  Le travail se termine par une conclusion et perspectives pour ce travail

CHAPITRE I

GÉNÉRALITÉS

I-1 Présentation de l'Artémie

I-1-1 Définition de l'Artémia

Artémia est un groupe cosmopolite qui peut survivre à des conditions environnementales stressantes: salinités extrêmes, faibles ou fortes températures et anoxie **(Torrentera et Dodson, 2004).** Il est formé de sept espèces de reproduction bisexuées qui vivent dans les lacs salés et hyper salés **(Thiéry et Puente, 2002),** les lagunes côtières et dans les étangs **(Triantaphyllidis et *al.*, 1996).**

On peut rencontrer les populations de ce crustacé dans des eaux riches en chlorures, sulfates, carbonates, potasses etc., dont la composition ionique est totalement différente à ceux de l'eau de mer **(Cole et Browne, 1967; Bowen et *al.*, 1985).** La température vitale optimale de l'Artémia est au tour de 25-27ºC, en général l'intervalle minimal et maximal de survie est compris entre 5 et 35ºC. Ces limites ne sont pas fixes et restent liés aux caractéristiques de chaque population et espèce **(Amat, 1985).**

I-1-2 Classification

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda.

Sous embranchement : Crustacea.

Classe : Branchiopoda.

Sous-classe : Sarsostraca.

Ordre : Anostraca.

Sous-ordre : Artemiina.

Famille: Artemiidae.

Genre : *Artemia* **(Ghomari, 2012)**

Espèce : *Artemia sp* **Kazakhstan (Pilla et Beardmore, 1994)**

Figure 01 : *Artémia sp.* **(Zubairi et *al.*, 2016)**

I-1-3 Morphologie

L'*Artémia* est un petit crustacé aquatique de forme allongée leur corps est dépourvu de carapace (anostracée) mais clairement segmenté. Il comprend trois parties bien distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen ; l'artémie connaît 14 mues, son corps se compose d'aux moins 20 segments et de 10 paires d'appendices plats attachées à son tronc.

Sa coloration va du blanc laiteux au bleu vert jusqu'au rouge brique et au vermillon selon sa nourriture et le milieu, en particulier selon la teneur en oxygène dissout **(Abatzopolulos et *al.*, 2010)**.

Sa longueur et son aspect peuvent être très variables selon l'espèce sexuée ou la race parthénogénétique (diploïde ou polyploïde) et aussi selon les caractéristiques physico-chimiques de son biotope (principalement la salinité), La taille habituelle est comprise entre 10 et 12 mm de longueur totale, dépasse rarement les 17-18 mm **(Ghomari, 2012***)*.

La femelle adulte a un sac ovigère, en forme de cœur à l'arrière de ses derniers appendices. Le mâle, possède deux appendices symétriques en forme de châle à hauteur de la tête, Il est généralement plus petit que la femelle, nage plus rapidement et moins coloré **(Abatzopolulos et *al.*, 2009*).***

I-1-4 Cycle de vie et reproduction

Dans son environnement naturel et sous certaines conditions, l'Artémia produit des cystes qui flottent à la surface de l'eau. Ces cystes sont métaboliquement inactifs et incapables de se développer tant qu'ils sont gardés au sec **(Dhont, 2003).** Une fois les cystes immergés dans l'eau de mer, l'embryon reprend son métabolisme interrompu.

Au bout de 24h à 36h la membrane externe du cystes éclate et l'embryon apparaît, entouré par une membrane d'éclosion. Tandis que l'embryon est accroché sous la coquille vide (étape de « parapluie ») le développement du nauplius s'accompli et au cours d'une période courte la membrane d'éclosion est rompue et le nauplius est délivré pour atteindre le stade adulte après plusieurs phases de développement caractérisées par une série de transformations morphologiques et physiologiques **(Drewas, 2002):**

- Nauplius stade I est stade II (8 heures)

- Juvénile puis pré-adulte (1 à 3 jours)
- Adulte (1 à 2 semaines)

Les populations d'*Artémia* présentent deux types de reproduction: sexuelle avec la présence de mâles et femelles chez l'espèce sexuée et asexuée ou parthénogénétique avec la présence exclusive de femelles chez la souche asexuée (clones parthénogénétiques).

Les deux types de femelles (sexuées ou asexuées), peuvent donner deux classes de descendance, selon les conditions environnementales (dans les conditions optimales de disponibilité d'aliment, salinité et oxygène), et selon l'espèce: un embryon qui achève son développement embryonnaire à l'intérieur de l'utérus de la femelle, et naisse comme nauplii parfaitement formé, aussi connues sous le nom « d'œufs d'été » (reproduction ovovivipare), ou bien en présence des conditions adverses (salinité élevée, ou niveaux faibles d'oxygène), ils sont produits des formes d'œufs de résistances connues sous le nom de cystes, ou aussi appelés « des œufs d'hiver » **(Curto, 2006).**

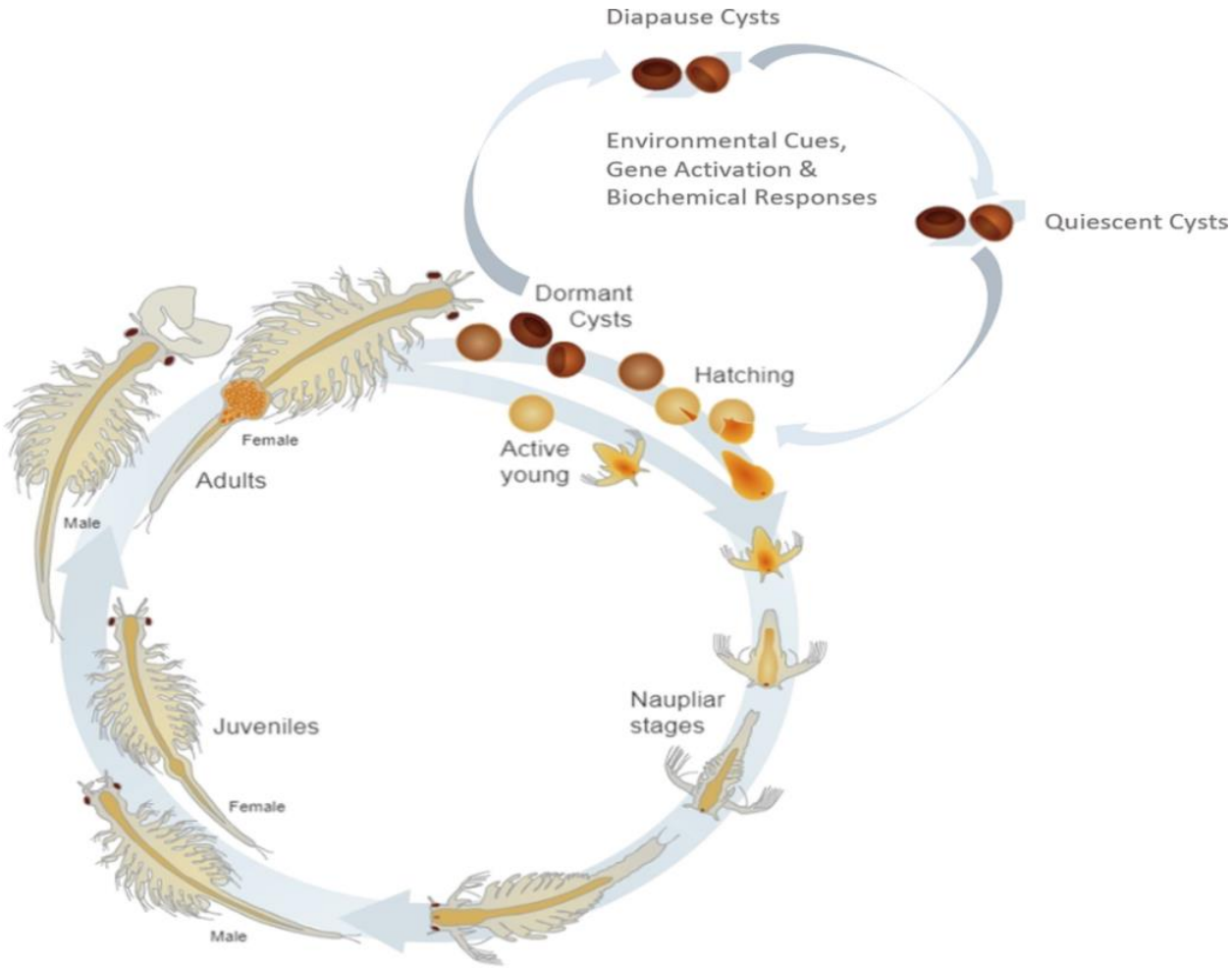

Figure 02: Cycle de vie d'Artémia **(Marden et *al.*, 2020)**

I-1-5 Ecologie

Les Artémies se trouvent dans environ 500 lacs naturels de sel et les marais salants artificiels dispersés dans les zones climatiques tropicales, subtropicales et tempérées, le long des côtes, ainsi que l'intérieur des terres **(Lavens et Sorgeloos, 2000).** Leurs distributions sont discontinues: tous les biotopes hautement salins ne sont pas peuplés d'Artémie; elle se trouve dans des eaux thalassohaline et athalassohalins :

- Les eaux thalassohaline sont des eaux de mer concentrées avec NaCl comme sel majeur. Ils constituent la plupart, sinon la totalité, des habitats côtiers de l'Artémia dans des sebkhas. L'autre habitat thalassohaline est situé à l'intérieur des terres.

- Les biotopes athalassohalins d'Artémia sont situés à l'intérieur des terres et ont une composition ionique qui diffère grandement de celle de l'eau de mer naturelle: il y a des eaux sulfatées, carbonatées et riches en potassium.

Bien que **les crevettes de saumure(Artémie)** se développent très bien dans l'eau de mer naturelle, elles ne peuvent pas migrer d'un biotope salin à un autre *via* les mers, car elles dépendent de leurs adaptations physiologiques à une salinité élevée pour éviter la prédation et la concurrence avec d'autres filtreurs, car la crevette saumâtre possède:

- Un système osmorégulateur très efficace;

- La capacité à synthétiser des pigments respiratoires très efficaces pour faire face aux faibles niveaux d'O_2 à des salinités élevées;

- La capacité de produire des kystes dormants (les cystes) lorsque les conditions environnementales mettent en danger la survie de l'espèce.

L'artémie ne se trouve que dans des milieux à salinités très élevée où leurs prédateurs ne peuvent pas survivre (70 $g.l^{-1}$). L'Artémia meurt à des salinités proches de la saturation en NaCl, c'est-à-dire 250 g.l-1 et plus **(Van Stappen, G.1996).**

Concernant la température, la plupart des populations ne supportent pas des températures au-dessous de 5°C**,** tandis qu**'**elle peut varier entre 6°C à 40°C pour les larves. La tolérance des cystes secs est encore plus élevée ; les limites oscillent entre –273 °C à plus de 60°C**. (Skoultchi et motowitz, 1964).**

I-1-6 Cystes

Le cystes a une forme biconcave, après hydratation il devient sphérique, le cyste sec résiste également aux fortes radiations, une variété de solvants organiques (même à des pesticides), le manque d'oxygène et peut être entreposé pendant des mois ou des années sans toutefois perdre sa capacité d'éclosion **(Treece,G.D., 2000).**

La coquille du cystes se compose de trois couches **(Dhont ; Vanstappen, 2003)**

Couche alvéolaire: une couche dure constituée de lipoprotéines imprégnées de chitine et d'hématine et leur concentration détermine la couleur brun pâle au brun foncé de la coquille. Sa fonction principale est de protéger l'embryon contre les perturbations mécaniques et les rayons UV, peut être complètement éliminée ou dissoute par traitement d'oxydation à l'hypochlorite.

Membrane cuticulaire externe: C'est une membrane constituée de multicouches avec fonction de filtre très spéciale, elle agit comme une barrière de perméabilité. Son rôle est d'empêcher la pénétration des molécules plus grandes que la molécule de CO_2.

Cuticule embryonnaire : C'est une couche transparente et élastique séparée de l'embryon par la membrane cuticulaire interne (se développe en membrane d'éclosion lors de l'incubation d'éclosion).

L'embryon est une gastrula indifférenciée qui est amétabolique à des niveaux d'eau inférieurs à 10%, il peut être stocké pendant de longues périodes sans perdre sa viabilité**.** La viabilité est affectée lorsque les niveaux d'eau sont supérieurs à 10% (début de l'activité métabolique) et lorsque les cystes sont exposés à l'oxygène, c'est-à-dire qu'en présence d'oxygène, les radiations cosmiques entraînent la formation de radicaux libres qui détruisent les systèmes enzymatiques spécifiques des cystes amétaboliques d'Artémie **(Van Stappen, G.1996).**

Figure 03: Cystes *d'Artémia* **(Dahloum, 2007).**

I-1-7 Nauplius

C'est une Larve juste écloses de très petite taille environ 400 à 500 µm, caractérisé par une tête et trois paires de pattes qui deviendront les antennules, les antennes et les mandibules :

- Les antennules : double fonction, filtration de la nourriture et locomotion.
- Les antennes : fonction sensorielle.
- Les mandibules : servent pour attraper la nourriture**.**

La larve possède une couleur beige fonce ou bien marron claire observer par la loupe

I-1-8 Adulte

Adulte, *Artémia sp* mesure en moyenne 8 à 10 mm, mais peut atteindre 15 mm en fonction de son environnement. Il a 2 petits yeux, Son corps allongé est généralement divisé en 20 segments, et comporte 10 paires de pattes, appendices ressemblant à des feuilles qui oscillent à un rythme régulier.

Les adultes peuvent être de couleur pâle, blanc, rose, vert ou transparent, et vivent généralement quelques mois. L'*Artemia* est de l'ordre Anostraca, qui signifie Littéralement sans coquille. Son appartenance à la classe des branchiopodes indique que ses branchies sont situées sur le côté des pattes.

I-1-9 Régime alimentaire

L'Artémia est une espèce "filter-feeder" phagotrophe **(Provasoli et Shiraishi, 1959).** Elle s'alimente par filtration principalement de phytoplancton vivant dont *Dunaliella Salina* est la souche la plus utilisée.

L'alimentation de cette espèce diffère selon les stades de développement :

- les nauplii, elle est assurée par la deuxième paire d'antennes.

- l’adulte, elle est assurée par les thoracopodes (11 paires d’appendices• thoraciques remplacés au fil des mues) **(Tobias et *al.*, 1980).**

Si le milieu est pauvre en nourriture la croissance de l’Artémia sera lente et une forte mortalité sera observée **(Kellog ,1906)**

I-1-10 Utilisation de l'*Artemia* en aquaculture

L'emploi des nauplii comme aliment en écloserie est très courant, par contre les adultes sont peu utilisés. L'*Artémia* constitue une nourriture disponible, grâce aux cystes facilement stockés et transportés, nécessitant des techniques de production simples. Elle constitue une proie exempte de germes, grâce à une désinfection ou une décapsulation, bien acceptée et facilement perceptible grâce à leur couleur et à leur mouvement.

Les nauplii sont donnés vivants, la récolte s'effectue dès l'éclosion à l'aide d'un filet de maille 125µm, la valeur des *Artémia* se déprécie rapidement à température ambiante. Dans les heures qui suivent l'éclosion la valeur nutritionnelle diminue, la taille augmente. **(Gaëlle et *al.*, 1998).**

I-2 Généralité sur les probiotiques

I-2-1 Définition

Le mot « probiotique » vient des mots grecs « pro » qui signifie « **en faveur** » et « biotikos » qui signifie « **la vie** »**(Kesarcodi-Watson et *al.*,2008).**

Les probiotiques sont des micro-organismes qui confèrent des avantages pour la santé de l'hôte lorsqu'ils sont administrés à la dose appropriée. Ils sont ajoutés dans les élevages de poissons pour augmenter les performances de croissance, l'appétit digestibilité, et contrôler les maladies en améliorant la réponse immunitaire **(Shefat, 2018).**

Ils peuvent être introduits dans certains aliments (compléments alimentaires) ou dans certains médicaments (ex : Lactéol contenant des Lactobacillus LB). Les probiotiques les plus connus sont les bactéries lactiques (Lactobacillus, Streptococcus et Lactococcus) et les Bifidobactéries (utilisés dans les yaourts et autres produits laitiers fermentés) **(Laffargue, C. (2015).**

Les probiotiques sont des bactéries naturellement présentes dans notre système digestif et qui possèdent un effet bénéfique sur la flore intestinale et qui permet la digestion des aliments. Ces bactéries permettent une meilleure absorption des nutriments et protègent aussi les intestins.

I-2-2 Les caractéristiques des probiotiques

La sélection des probiotiques doivent répondre à plusieurs critères :

1. Innocuité totale: Le probiotique ne doit pas être nocif pour l'organisme et ne doit présenter aucun risque pour la santé.
2. Survie au cours du transit digestif : les micro-organismes probiotiques doivent être capables de survivre jusqu'à leur arrivée dans l'intestin où ils exerceront leurs effets bénéfiques sur la flore intestinale, donc il doit présenter une résistance naturelle élevée à l'attaque gastrique acide et aux sels biliaires.
3. Activité antimicrobienne: pour jouer son rôle d'amélioration de l'écosystème intestinal, un bon probiotique doit être capable d'inhiber localement le développement des germes indésirables.
4. Capacité à s'établir dans la flore endogène et survie dans l'écosystème intestinal : il est important que les probiotiques puissent adhérer aux cellules ou au mucus de la paroi intestinale même de façon transitoire :
    a. d'une part pour faciliter la colonisation du tube digestif
    b. d'autre part pour obtenir un effet barrière optimal contre l'invasion de la muqueuse intestinale par des bactéries pathogènes.
5. Propriétés technologiques : viabilité et stabilité des micro-organismes., le probiotique doit survivre aux différentes conditions de stockage et de conservation (**Aly Abbara et *al.*, 2020).**

I-2- 3 Les probiotiques en aquaculture

I-2-3-A Définition

Un probiotique est un élément vivant, un composant d'une cellule microbienne, qui est administré par l'intermédiaire de l'alimentation ou de l'eau d'élevage, qui profite à l'hôte en améliorant sa résistance aux maladies, son état de santé, ses performances de croissance, son utilisation de l'alimentation, sa réaction au stress

ou sa vigueur générale, l'équilibre microbien de l'hôte ou l'équilibre microbien de l'environnement ambiant **(Merrifield et *al.*, 2010).**

Il peut être considéré comme un microbiote intestinal des animaux aquatiques interagit constamment avec l'environnement et les fonctions de l'hôte.

Un probiotique est une culture mono ou mixte de micro-organismes vivants pour améliorer les propriétés de l'organisme, sa viabilité ou les propriétés de sa microflore indigène **(Havenaar et *al.*, 1992 ; Skjermo et Vadstein 1999).**

En 2000, Verschuere a considéré le probiotique « un adjuvant microbien vivant ».

I-2-4 Utilisations

Le développement rapide de l'aquaculture, son intensification, et l'apparition des crises sanitaires dans les élevages ont encouragé les recherches pour développer des solutions alternatives aux antibiotiques, afin d'enrayer les maladies. C'est dans ce cadre que l'utilisation des probiotiques, qui concernait à l'origine l'homme et les animaux d'élevage terrestres, a été élargie aux animaux aquatiques depuis une trentaine d'années. Les premières études chez les poissons ont montré des résultats prometteurs qui ont entraîné de nombreuses recherches sur le sujet. Ces recherches ont eu comme objectif la sélection des souches probiotiques à partir des différentes sources d'élevage (animaux, algues, eau….), afin d'évaluer leurs bienfaits sur la survie et la croissance des animaux modèles. Parallèlement à ces recherches, de nombreuses applications, plus ou moins empiriques, du concept probiotique ont été réalisées, ce qui a permis la familiarisation et l'utilisation de ce concept en aquaculture **(Fernando Silva Aciares 2013).**

Aujourd'hui, l'aquaculture est le secteur de production alimentaire qui connaît la plus forte croissance dans le monde, avec un taux de croissance annuel moyen de 8,9 % depuis 1970**(Subasinghe, 2005).**

L'utilisation des probiotiques en aquaculture comprend des bactéries, et des suppléments alimentaires. Ils apportent des avantages aux hôtes :

- ✓ améliorer la croissance de l'hôte **(Kumar et *al.*, 2006 ; Boonthai et *al.*, 2011 ; Silva et *al.*, 2013) ;**

- ✓ réduire l'incidence des maladies (**Irianto et Austin 2002 ; Newaj-Fyzul et *al.*, 2007 ; Silva et *al.*, 2013)**
- ✓ Peuvent donner de bons résultats dans divers environnements aquatiques : eau douce **(Rahiman et *al.*, 2010),** eau saumâtre et eau de mer**(Vijayan et *al.*, 2006).**

Les probiotiques utilisés dans l'aquaculture sont principalement pour l'amélioration de la qualité de l'eau **(Wang et Wang, 2008).**

I-2-5 L'utilisation des probiotique chez l'artémie

Les probiotiques peuvent protéger l'hôte par la production de métabolites qui empêchent la colonisation ou la croissance d'autres micro-organismes pathogènes ou la compétition pour l'alimentation **(Vine et *al.*, 2004 ; Mahdhi et *al.*, 2010).**

On montre aussi des effets bénéfiques qui engendrent une réduction des maladies dues aux bactéries pathogènes associées aux Artémia **(Mahdhi et *al.*, 2010).**

Egalement la *Pseudomonas stutzeri* et *Bacillus sp*, ainsi que la levure *Candida utilis* améliorent les conditions d'élevage d'Artémia **(Balcazar et Luna-Rojas 2007 et Zhou et *al.*, 2009).**

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Notre travail a pour but d'évaluer l'efficacité de trois souches ayant montré, *in vitro*, un potentiel probiotique, sur l'élevage *d'Artemia sp*.

Tableau 01 : Les souches bactériennes utilisées dans cette étude.

Souches probiotiques	Signe	Souches pathogènes	Signe
Enterococcus faecium	**EF**	*Vibrio anguillarum*	**VAN**
Enterococcus durans	**ED**	*Vibrio alginolyticus*	**VAL**
Psychrobacter cibarius	**PS**		

II-1- Etude de l'effet des souches (probiotiques/pathogènes) sur une culture axénique d'*Artémia*

II-1-1 Préparation de la suspension bactérienne (probiotique/ pathogène)

Des flacons stériles de 50 ml de MRS et BHI bouillon ont été inoculés respectivement avec des souches bactériennes et des pathogènes et incubés à 37°C. Les cellules ont été récupérées par une centrifugation à 2000 tr/min pendant 10min. Le culot a subi deux lavages par l'eau d'élevage filtrée et stérile préparée au préalable. Les suspensions bactériennes ont été ajoutées à l'eau d'élevage de l'artémie et ajustées à une densité optique de 0.8 (10^8 CFU ml^{-1}) à une longueur d'onde de 540 nm. **(Jatoba et al., 2008).** Cette solution mère servira pour la préparation des différentes dilutions de 10^8 en 10^6.

II-1-2 Préparation de la culture d'Artémia axéniques

0.5g des cystes d'*artémia sp*. commercial(DAJANA)ont été versé dans un flacon stérile de 500ml contenant 250ml d'eau d'élevage préparé filtrée stérile de salinité à 37g/lpour l'élevage des artémies, le flacon a été incubés dans un bain marie agitateur à 27°C pendant 72h en présence de la lumière artificielle blanche et en absence de l'alimentation.

Figure 04 : *Artémia* Commerciale

II-1-2-1 Estimation de la charge des nauplii

Pour estimer la charge des nauplius sous une loupe binoculaire, 1ml d'échantillon de nauplius est déposé dans une boite de pétrie quadrillé et fixée par le lugol cette l'opération a été répétée 10fois.

$$\textbf{la charge} = \frac{\textbf{Ni1} + \textbf{Ni2} + \textbf{Ni3} + \textbf{Ni4} + \textbf{Ni5} + \textbf{Ni6} + \textbf{Ni7} + \textbf{Ni8} + \textbf{Ni9} + \textbf{Ni10}}{\textbf{10}}$$

Ni : nombre des individus dans 1ml

II-1-2-2 Vérification du caractère axénique de la culture d'Artémia (Contrôle de la stérilité) :

Le contrôle de la stérilité du milieu d'éclosion a été effectué par l'ensemencement de 0.1ml de l'eau de culture sur BHI gélose suivi d'une incubation à 37°C pendant 24H.

II-1-3 Etude expérimentale de l'application des bactéries dans la culture axénique d'Artémie

L'objectif de notre étude est d'évaluer l'effet des souches probiotiques et/ou pathogènes sur l'Artémie dans des conditions axéniques. Pour ce faire, 1ml des nauplii (140 individus) a été inoculé dans des conditions stériles, dans 9 ml d'eau d'élevage **(Ruyet, 1975)** additionnés ou non de souches bactériennes à différentes charges **(**préparée comme décrit précédemment). Les tubes ont été incubés pendant 24h dans un bain marie agitateur (T°=27°C, S=37g/L, lumière=1000 à 2000 Lux et oxygénation par agitation des tubes) (**Amarouyache et *al.*, 2010).** Chaque expérience a été menée en triplicata, avec la présence d'un témoin négatif.

II-1-3-1 Test de l'effet des souches probiotiques et pathogènes sur la culture d'artémie

L'effet de la charge bactérienne des souches probiotiques et pathogènes a été testé sur la culture d'artémie (140 nauplii) comme décrit précédemment. Les concentrations finales des souches étudiées ont été 10^6, 10^7, 10^8 UFC/ml.

Un volume de 0.1ml de chaque solution mère et cette dilution a été ensemencé sur la gélose Mac-conckey pour le dénombrement des souches pathogènes et la gélose MRS pour le dénombrement des souches probiotiques. Les boites ont été incubées à 37°C pendant 24h **(Villamil et *al.*, 2003).**

L'appréciation de l'effet des souches sur l'artémie a été estimée par le suivi de la survie, la taille, le poids, la biomasse ainsi que la détermination du paramètres CL50 qui seront présentés plus loin**.**

II-1-3-2 Test d'essai pour déterminer l'effet des souches probiotiques sur le contrôle des souches pathogènes

Pour évaluer l'effet des souches bactériennes sur la culture d'Artémia(l'expérience pendent 6jours); différents essais ont été réalisé :

1). Essai Probiotique:

- ✓ Dans des tubes à essais stériles, 1ml d'artémia a été placé dans 9 ml d'eau d'élevage contenant l'une des souches probiotiques à une charge de 10^8UFC/ml : *Enterococcus faecium, Enterococcus durans et Psychrobacter cibarius.*

2).Essai pathogène :

- ✓ Dans des tubes à essais stériles, 1ml d'artémia a été placé dans 9 ml d'eau d'élevage contenant l'une des souches pathogènes à une charge de 10^8UFC/ml : *Vibrio anguillarum* ATCC 12964 ou *Vibrio alginolyticus* ATCC17749T.

3).Contrôle de probiotique +pathogène :

- ✓ Dans des tubes à essais stériles, 1ml d'artémia a été placé dans 9 ml d'eau d'élevage contenant un mélange de souche pathogène (10^6 UFC/ml) et une souche probiotique (10^8UFC/ml). Les combinaisons effectuées ont été :
  - Artémia + *Enterococcus faecium+ Vibrio anguillarum,*
  - Artémia + *Enterococcus durans + Vibrio anguillarum,*

- Artémia + *Psychrobacter cibarius* + *Vibrio anguillarum,*
- Artémia + *Enterococcus faecium* +*Vibrio alginolyticus,*
- Artémia + *Enterococcus durans*+ *Vibrio alginolyticus,*
- Artémia + *Psychrobacter cibarius* + *Vibrio alginolyticus,*

Chaque expérience a été menée en triplicata, à partir de la culture axénique d'Artémia et réalisées dans des conditions stériles**(Mahdhi et *al.*, 2010).**

Après l'ajout des suspensions probiotiques et les pathogènes, les cultures d'Artémia ont été incubées dans un bain marie agitateur à une température de 27°C pendant 3jours avec une intensité lumineuse constante.

Le suivi consiste à déterminer dans chaque essai : la taille; la biomasse et le taux de survie des larves d'Artémia au cours du traitement (la survie est déterminée quotidiennement par le dénombrement des nauplius mobiles).

II-1-3-3- Détermination des différents paramètres

A- Détermination de la CL50 selon Reed and Muench (1938)

Ce paramètre a été déterminé pour chaque souche probiotique et pathogène afin de déterminer leur charge toxique sur l'artémie. Il représente la concentration à partir de laquelle on observe 50% de mortalité des individus

CL50 = (dilution au-delà de 50%) - (distance proportionnelle calculée)

Distance proportionnelle = 50%- (mortalité à la dilution inférieure à 50) /(mortalité à la dilution au-delà 50- mortalité à la dilution inférieure 50)

B- Détermination du taux de survie

Pendant les tests réalisés, le nombre de larves nageuses a été déterminé quotidiennement par le nombre des nauplii mobiles et le pourcentage de survie a été calculé selon la formule suivante :

Pourcentage de survie= (Nombre de nauplii survivants × 100) / Nombre total de nauplii).

C- Détermination de la taille :

Un prélèvement journalier de 10 individus de chaque tube d'élevage a été effectué par hasard afin d'évaluer leur développement. Entre une lame et une lamelle les nauplius ont été fixés par le lugol, puis on a déterminé la taille à partir de éteules jusqu'à la queue, à l'aide de la micro règle du microscope photonique. La taille a été calculée selon la formule suivante :

La taille (cm)=$\frac{\boldsymbol{la\ taille\ observ\acute{e}}}{\boldsymbol{grandissement}}$

Avec : **le grandissement (40) =** $\boldsymbol{O * G}$

O : Oculaire(**10**)

G : le grandissement de l'objectif(**4**)

D- Détermination de la production de biomasse totale d'Artémia

La production totale de biomasse (TBP) est un critère qui combine les effets des deux paramètres : la survie et de la taille (IL). Elle est déterminée selon la formule suivante **(Mahdhi, M. *et al* 2010)**:

TBP (millimeters per Falcon —mm / F) **=** $\boldsymbol{Ns * MIL}$**(Mahdhi 2010).**

Ns: nombre des survivants

M IL : moyenne de la taille IL

F : Falcon

II-1-3-4 Analyses statistiques

Tous les tests ont été étudiés par l'analyse des variances (ANOVA) afin d'examiner la signification des différences de nos résultats (test de Tukey HSD), en utilisant le logiciel Statistca 6.0.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Notre travail a pour objectif d'évaluer l'effet des souches probiotiques sur une culture d'artémie en présence et en absence de souches pathogènes de type *Vibrio.* Cette partie s'articule comme suit :

- effet des souches probiotiques sur la culture d'artémie
- effet des souches pathogène sur la culture d'artémie
- contrôle des souches pathogènes par des souches probiotiques dans la culture d'artémie

III-1 Résultats de l'application des souches probiotiques dans l'élevage d'Artémia

III-1-1 Effet des souches probiotiques sur la culture d'artémie en milieu stérile à différentes concentrations

L'effet des souches probiotiques sur la culture d'artémie a été évalué par le suivi des différents paramètres de survie et de croissance (taille et production totale de la biomasse « TBP »).

III-1-1-1 Suivi de la charge bactérienne des souches probiotiques

Les résultats représentés dans le tableau (2) montrent que la charge bactérienne des trois souches probiotiques est en augmentation au cours de l'expérience, ce qui nous confirme le maintien des souches probiotiques dans la culture. ces résultats concordent avec ceux de **Villamil et *al.*,(2003)**, qui ont rapporté que la charge bactérienne des deux souches probiotiques *L.cacei* et *L.brevis*inoculées dans des cultures d'artémie prolifèrent tout au long de leurs cycle d'élevage.

Tableau2 : L'évolution de la charge des bactéries probiotiques durant l'expérimentation

La charge initiale (UFC/ml)	**La charge finale (UFC/ml)**		
Témoin : 0	**EF**	**ED**	**Ps**
10^6	$4{,}61.10^9$	$4{,}30.10^7$	$4{,}71.10^6$
10^7	$7{,}88.10^{15}$	$3{,}07.10^{11}$	$4{,}71.10^6$
10^8	$1{,}05.10^{16}$	$6{,}87.10^{11}$	$2{,}01.10^7$

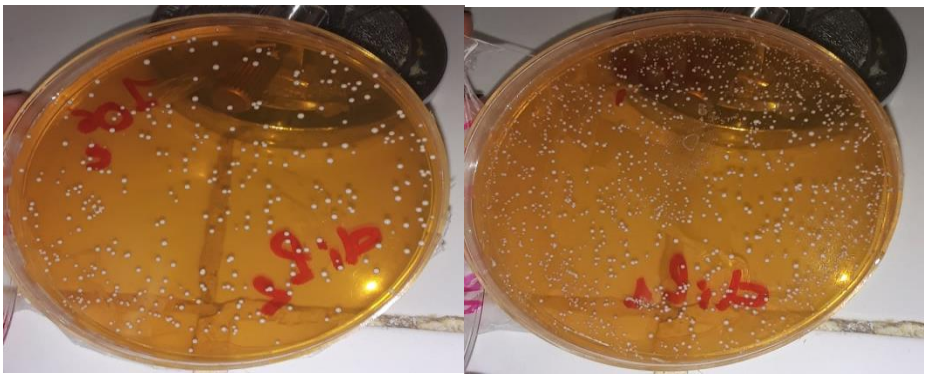

Figure05: Dénombrements des souches probiotiques sur gélose MRS

III-1-1-2 Effet des différentes charges bactérienne des probiotiques sur le taux de survie des nauplii

L'augmentation de la charge bactérienne probiotique dans les eaux d'élevages d'artémie influe positivement le taux de survie des nauplii. La figure 5 montre que la charge bactérienne probiotique de la souche *E. durans*, à une concentration de 10^8UFC/ml, améliore significativement ($p<0,05$) le taux de survie des animaux, en revanche, les souches probiotiques à différentes charges: *E. durans* (10^7,10^6), *E.faecium* (10^8,10^7,10^6) et *P. cibarius* (10^8, 10^7,10^6) présentent des variations statistiquement non significatives (**P>0.05**).Ces résultats corroborent ceux de **Chean, M. Y et *al.*,(2021),** qui ont appliquésur une culture d'artémie, les souches probiotiques: *Lysinibacillus fusiformis*(10^8 UFC/ml) et *Bacillus megaterium* (10^8 UFC/ml). Ces souches probiotiques ont amélioré le taux de survie des Nauplii d'une valeur de 40% (témoin) à une valeur de 50% et 60%, respectivement. De même, plusieurs travaux utilisant différentes souches probiotiques à savoir: *E.durans* (**Bhaheerathan et *al.*,2020**),*Pseudomonas sp*. **(Gorospe et *al.*, 1996),** *Exiguobacterium mexicanum* **(Hipolito-Morales et al., 2009),** *Bacillus sp*. Et *cytophagar sp*. **(Marques et *al.*,2005),** ont rapporté un effet très bénéfique sur le taux de survie des Nauplii dans les cultures d'Artémie. En revanche, l'étude effectuée par **Touraki et *al.*, (2012)**a révélé que l'utilisation des souches probiotiques *B. subtilis et L. plantarum* à l'ordre de10^8 UFC/ml influe négativement sur le taux de survie.

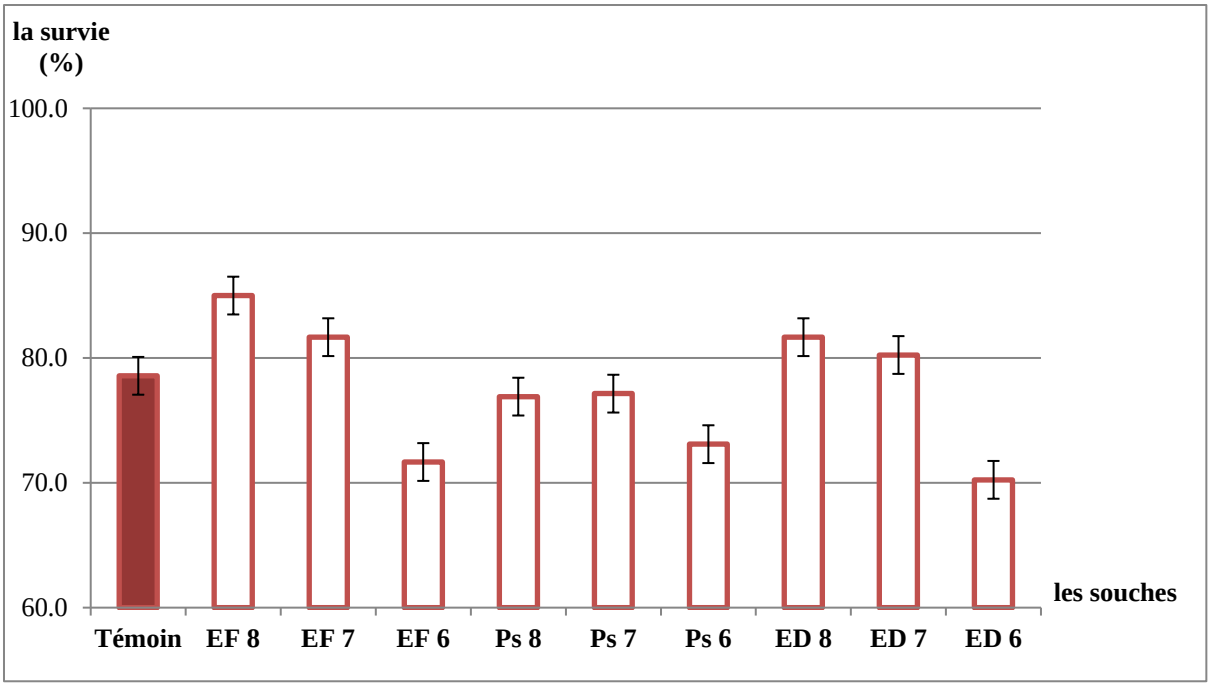

Figure06 : Effet des souches à potentiel probiotique à différentes charges sur le taux de survie des nauplii d'artémie. (EF : *Enterococcus faecium* ; ED : *Enterococcus durans* ; Ps : *Psychrobacter cibarius* ; 8 ;7 et 6: les charges microbienne $10^{8,7,6}$)

III-1-1-3Détermination de la CL50 des souches probiotiques

A partir des résultats obtenus, les concentrations létales CL50 ont été calculées. Ces dernières sont de l'ordre de $10^{9.7}$, $10^{9.30}$ et $10^{9.02}$ pour la souche *E. durans*, *P. cibarius* et *E. faecium*, respectivement.Ces valeurs représentent les concentrations initiales à partir desquelles la bactérie probiotique peut avoir un effet néfaste sur les nauplii d'artémie. Elles sont pratiquement du même ordre pour les trois souches probiotiques appliquées. Ce résultat concorde avec les différentes données de la littérature qui préconise l'utilisation des souches probiotiques à une charge de 10^{8}UFC/ml sans un risque lié à l'artémie (**Mahdhi et *al.*, 2010**; **Chean M. Yet*al.*, 2021**)

Tableau3 : Les CL50 des souches probiotiques sur les nauplii d'artémie

Les souches	CL50
E. durans	$10^{9.70}$
E. faecium	$10^{9.02}$
P. cibarius	$10^{9.30}$

III-1-1-4 Effet des souches probiotiques sur la croissance des nauplii :

La croissance des Nauplii a été estimée par les deux paramètres suivants : la taille et la production totale de biomasse « TBP ».

III-1-1-4-ALa taille :

La taille des nauplii a été estimée sous microscope à l'aide d'une règle (Figure07). Les résultats sont illustrés dans la figure 8.

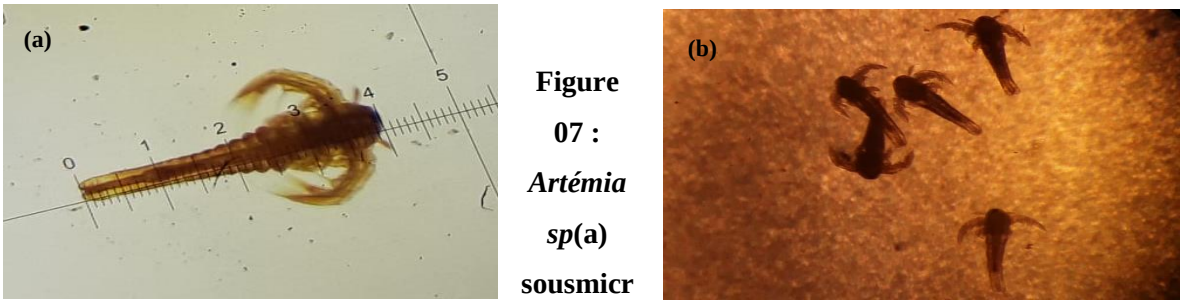

Figure 07 : *Artémia sp*(a) sousmicroscope, (b) sous une loupe binoculaire, Gx40

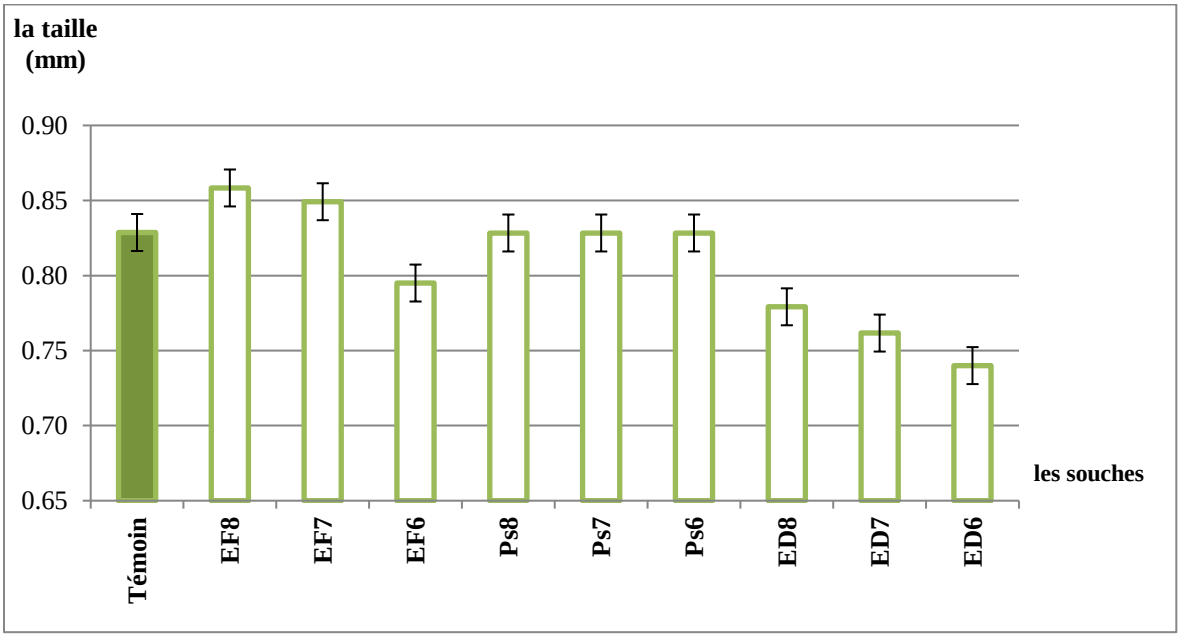

Figure 08 : Effet des souches à potentiel probiotique à différentes charges sur la taille des nauplii d'artémie (EF : Enterococcus faecium ; ED : Enterococcus durans ; Ps : Psychrobacter cibarius ; 8 ;7 ;6et 5 :les concentration)

Les résultats ont révélé que l'accroissement de la taille des nauplii augmente en fonction de la concentration croissante *d'E.durans* (entre une valeur minimum de 0.74mm et une valeur maximum de 0.78mm) et d'*E.faecium* (entre une valeur minimum de 0.80 mm et une valeur maximum de 0.86mm) (figure 08), Cette amélioration est statistiquement significative ($p<0.05$) uniquement pour les deux concentrations suivantes d'*E. faecium*à10^8et 10^7.

La littérature confirme que la démarche d'ajout d'une souche probiotique à un élevage aquacole d'Artémie reste toujours bénéfique pour le bon développement de l'animal : exemple des souches probiotiques *Bacillus sp.*et *cytophagar sp.*(**Antonio Marques et *al.*, 2005)**, ou la souche *Pseudomonas sp.* qui a amélioré la taille des nauplii d'une valeur de 0.74mm à une taille de 3.52 mm, après 9 jours d'élevage. **(Gorospe et *al.*, 1996).** Cette amélioration est due à une intervention directe de la souche probiotique, ou à l'action de molécules bioactives sécrétées par ces dernières. **Lamari et *al.*, (2013)** rapportent que l'acide lactique isolé à partir de la souche bactérienne probiotique *Brachionusplicatilis*est à l'origine de l'amélioration de différents paramètres d'élevage dont la taille, dans la culture d'Artémie.

Cependant, la concentration bactérienne de la souche probiotique *Psychrobacter cibarius* n'influe pas sur le développement des nauplii en termes de taille. Ces résultats rejoignent ceux de **Bhaheerathan et *al*,.(2020**) qui ont rapporté que l'utilisation de la souche *E.durans* à des concentrations différentes (10^{-1}, 10^{-3}, 10^{-5}, 10^{-7}) provoque des diminutions de taille d'une valeur 3.08mm à une valeur de 1.9mm.

III-1-1-4-B La production totale de biomasse (TBP)

L'estimation de l'effet des souches probiotique sur l'artémie a été appréciée par le paramètre biomasse totale qui combine la survie et la taille (Figure 9).

Les résultats représentés dans la figure8 montrent que ce paramètre est affecté de la même façon que le paramètre taille à savoir : une amélioration significative avec *E. faecium* à la charge 10^7 et ^{8}, et des variations non significatives pour les deux autres souches *E. durans* et *Psychrobacter cibarius* ($P>0.05$), ces résultats corroborent ceux de **Mahdi et *al.*, (2010)** ,qui ont trouvé une amélioration non significative du TBP lors de l'application de *P. stutzeri*. De même pour Marques **et *al.*, (2005),** qui ont utilisé les souches bactériennes probiotiques suivantes : *Cytophaga sp, Roseobactersp,Ruegeriaatlantica* et *Paracoccus sp*.

La majorité des travaux effectués sur l'artémie prouvent que l'administration des souches probiotique avec une certaine charge, peut être bénéfiques pour la majorité des paramètres étudiés, et cela est due probablement à des mécanismes de synthèse de certain vitamines et des molécules qui sont nécessaires pour le développement d'artémie (comme les enzymes, les protéines, les vitamines B et K, et les acides (**Lamari et *al.*, 2013**)

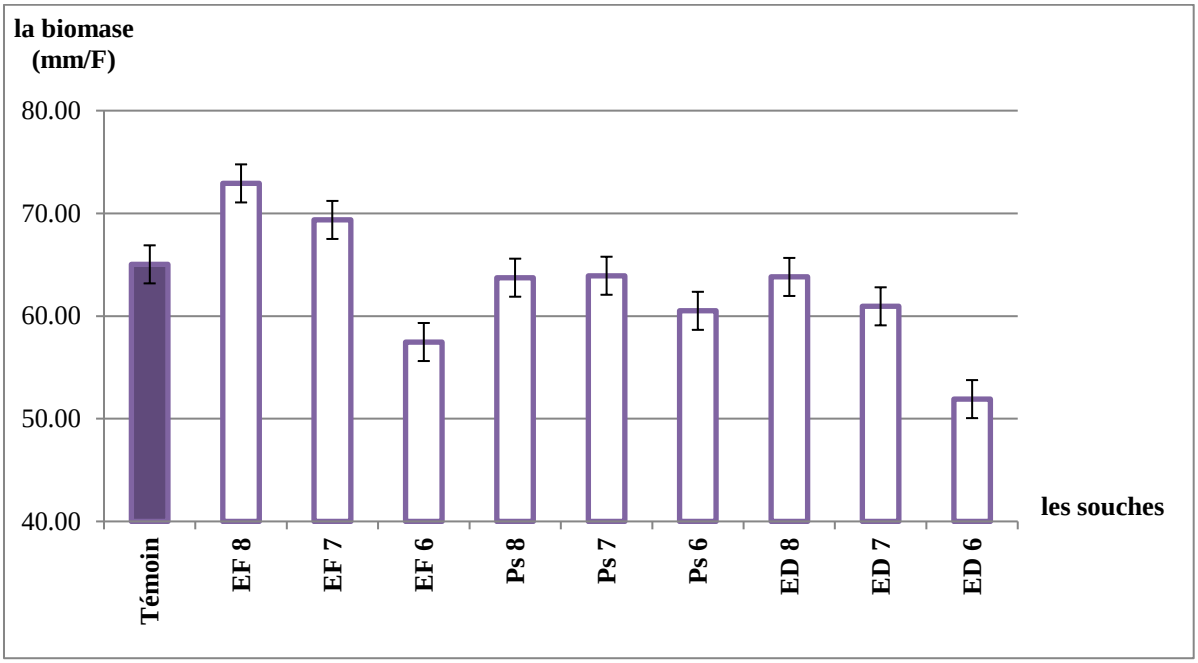

Figure09 : Effet des souches à potentiel probiotique à différentes charges sur la production de biomasse totale des nauplii d'artémie (EF : *Enterococcus faecium* ; ED : *Enterococcus durans* ; Ps : Psychrobacter cibarius ; 8 ;7 et 6 : les concentrations)

III-1-2 Effet des souches Pathogènes à différentes concentrations sur la culture d'artémie en milieu stérile

III-1-2-1 Le suivi de la charge bactérienne des souches pathogènes

D'après les résultats obtenus (tableau 4), les bactéries pathogènes persistent et augmentent tout au long de l'expérimentation. Ce qui nous permet d'associer les effets sur l'artémie à la présence de ces souches pathogènes. Cependant, **Chean M. Y. B et *al.*,(2021),** rapportent la persistance du pathogène *V. alginolyticus* mais avec une charge faible par rapport à la charge initiale (10^3 au lieu de 10^6UFC/ml).

Tableau4: évolution de la charge des souches pathogènes au cours de l'expérimentation

La charge initiale UFC/ml)	La charge finale (UFC/ml)	
Témoin : 0	**VAN**	**VAL**
10^6	$1{,}63.10^7$	$5{,}26.10^{13}$
10^7	$7{,}60.10^{11}$	$1{,}73.10^{15}$
10^8	$1{,}70.10^{15}$	$4{,}71.10^{15}$

III-1-2-2 Effet sur le taux de survie

Afin de déterminer l'effet des souches pathogènes sur la culture d'artémie, plusieurs concentrations ont été testées. Les résultats présentés dans la figure (10) montrent que la présence des souches pathogènes diminue la survie des nauplii. Cette diminution s'accentue avec la charge bactérienne. En effet, le taux de survie diminue à 65.2% pour *V. Alginolyticus* et à 48.6% pour *V. Anguillarum* par rapport aux témoins (78.6%). Cette diminution est considérée non significative ($p>0.05$).Ces résultats corroborent ceux de **Chean M. Y. B et *al.*, (2021)** qui ont trouvé que la souche pathogène *V.alginoliticus*(à 10^6 UFC/ml) ,affaibli le taux de survie des nauplii jusqu'à 45%.

Il est connu que les souches de *Vibrio* particulièrement *V. alginolyticus* peuvent causer des mortalités dans les élevages de poisson et dans la population des crustacés dont l'artémies (**Vilamil et *al.*, 2003** ; **Marques et *al.*, 2005 ; Mahdhi et *al*., 2010 ; mahdi et *al.*, 2011 ; lamari et *al.*, 2013 ; Neu et *al.*, 2014**). Plusieurs études ont montré que l'effet négatif de ces souches peut être dû à l'attachement des souches pathogènes sur la surface des Nauplii d'artémie (**Gunther et Catena, 1980** ; **Mahdhi et *al.*, 2010 ; lamari et *al.*, 2013**).

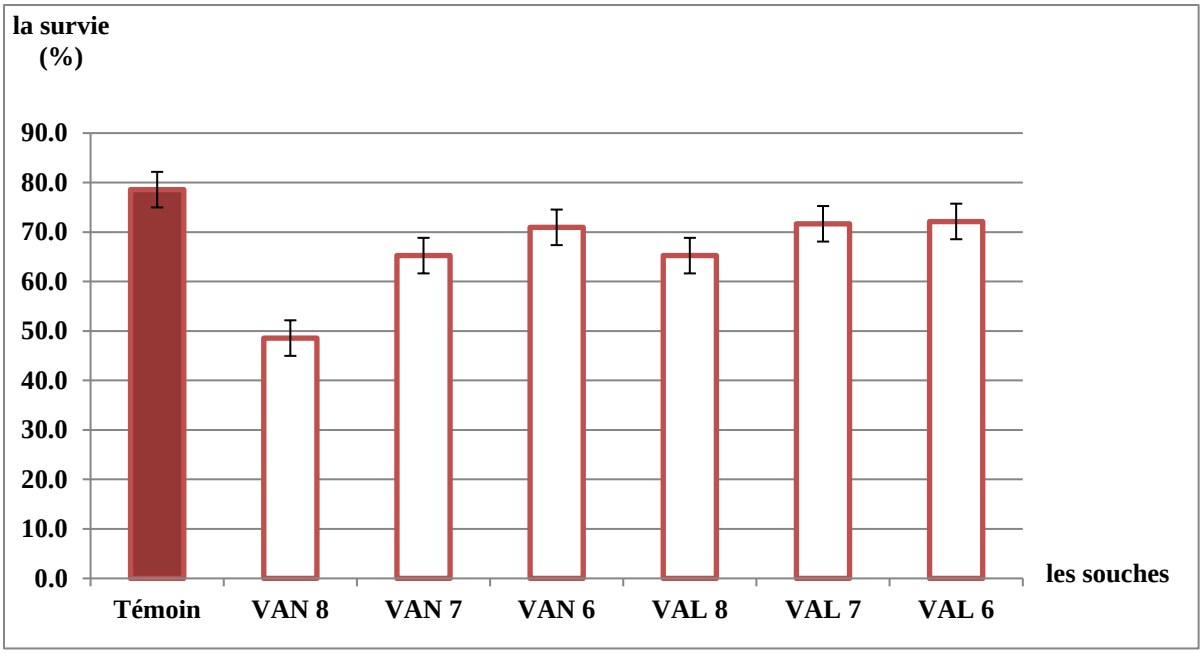

Figure10: effet des souches pathogènes à différentes charges sur le taux de survie des nauplius d'Artémie (VAN : V. *anguillarum* et VAL : *V. alginolyticus* ; 8 ; 7 ; 6et 5 : les concentrations de souches)

Les résultats de la CL50 (tableau5) ont montré que les bactéries pathogènes présentent un effet toxique à 10^7 UFC/ml pour *V. anguillarum* et10^9pour *V. alginolyticus*

Tableau5 : Les CL50 des souches pathogènes sur les nauplii d'artémie

Les souches	LC50
VAN	$10^{7.10}$
VAL	$10^{9.40}$

III-1-2-3 Effet sur la croissance

III-1-2-3-A- La taille

Les résultats présentés dans la figure 11 montrent une diminution de la taille des nauplii d'*Artemia sp.avec* l'augmentation de la concentration des *Vibrio* de 10^6 à 10^8 et qui varie d'une taille de 0.74 mm à 0.58mm et d'une taille de 0.55 à 0.49 mm pour les souches *Vibrio anguillarum* et *Vibrio alginolyticus* respectivement.

Nos résultats sont contradictoire avec ceux de**Mahdhi et *al.*,2010 et lamari et *al.*, 2013qui ont** rapporté que l'application de la souche pathogène *V.alginoliticus* dans la culture d'artémie, améliore la longueur des nauplii de 0.4mm jusqu'au 0.7mm et de 0.4mm a 0.6mm respectivement par rapport au témoin.

L'inoculation de la souche probiotique *Pseudomonas sp. à un élevage d'Artémie a*méliore la taille des Nauplii d'une valeur de 0.74mm à une taille de 3.52 mm, après 9 jours d'élevage. **(Gorospe et *al.*, 1996).**

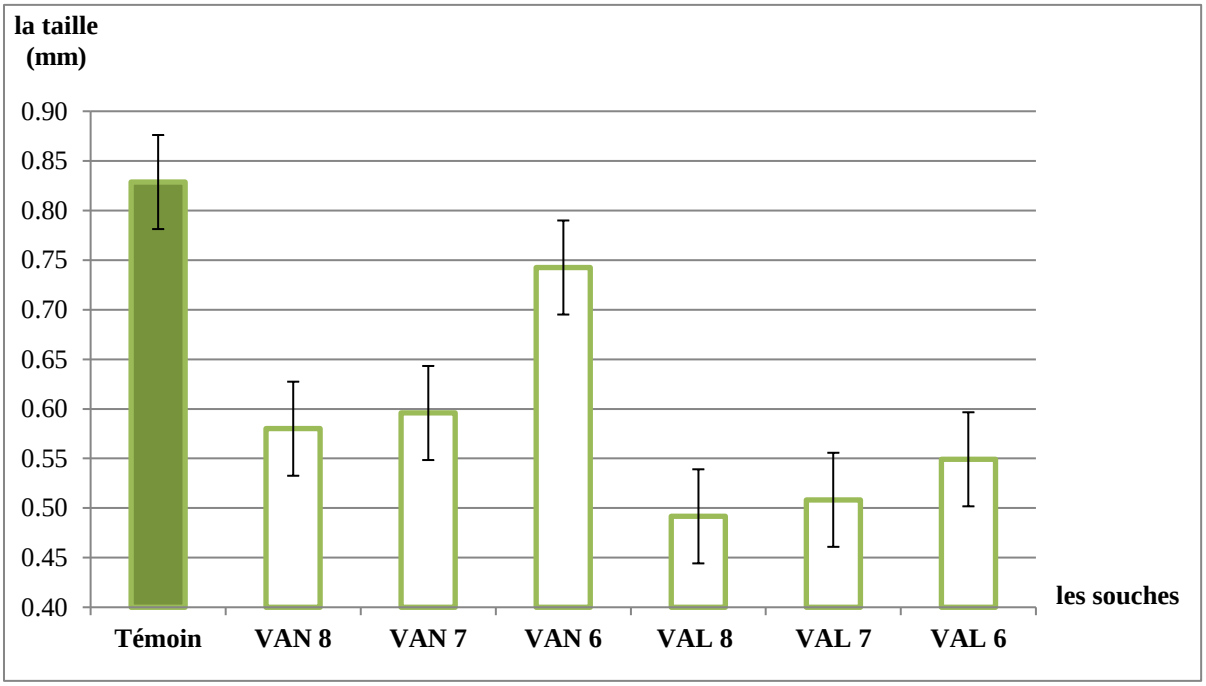

Figure11 : Effet des souches pathogènes à différentes charges sur la taille des nauplius d'Artémie (VAN : V. *anguillarum* et VAL : *V. alginolyticus ;* 8 ; 7et 6 :les concentrations des souches)

III-1-2-3-B La production totale de biomasse :

Les résultats de la production totale de biomasse (figure12) montrent une valeur de 65.0mm/F dans le témoin. Cette valeur diminue en présence des différentes charges du pathogène, pour atteindre 28.2mm/F pour le *V. anguillarum* et 32.1mm/F pour *V. alginolyticus*à la charge de 10^8UFC/ml. Cependant, cette différences est non significatives (P>0.05).

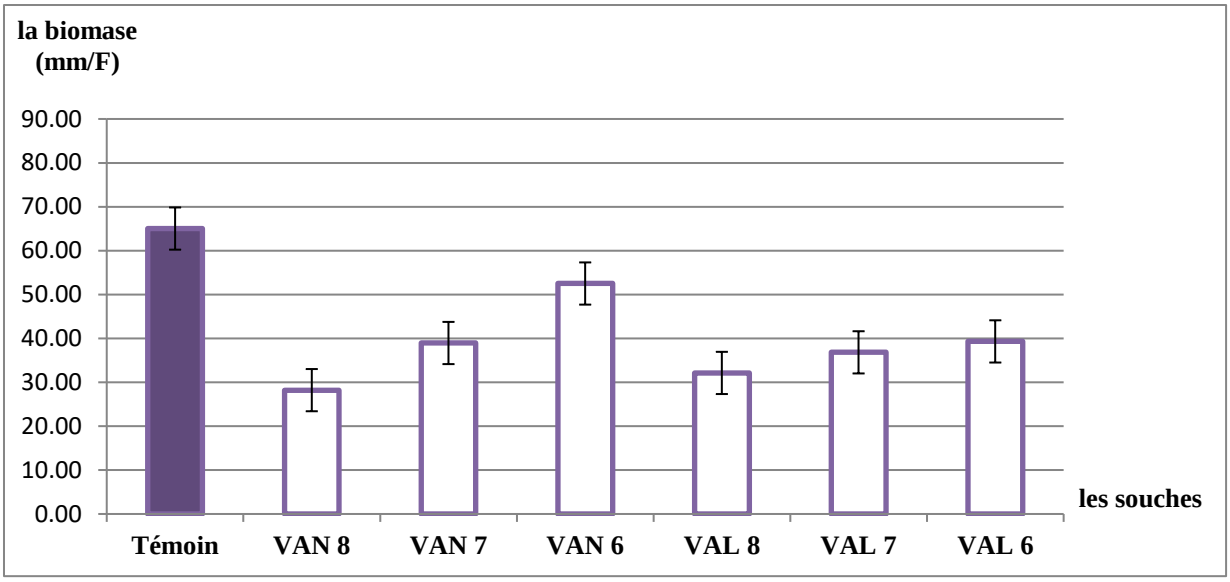

Figure12: Effet des souches pathogènes à différentes charges sur la biomasse des nauplius d'Artémie (VAN : V. *anguillarum* et VAL : *V. alginolyticus ;* 8 ; 7et 6: les concentrations de souches)

III-1-3 Application des souches probiotiques pour le contrôle de souches pathogènes

Une concentration de 10^8UFC/ml de souche probiotique a été administrée à des nauplii d'Artémie en présence de souches pathogènes à une charge de 10^6 UFC/ml : *V. alginoliticus* et *V. anguillarum.* Après cette confrontation, le taux de survie, la taille et la production totale de biomasse des Artémie sont été évalués (figure13, 14 et 15).

III-1-3-1 Effet sur le taux de survie

Les taux de survie des nauplii d'artémies enregistrés en présence des différentes combinaisons des souches pathogènes et des souches probiotiques sont représentés dans la figure13

Les résultats montrent une diminution du taux de survie des artémie en présence de la souche pathogène *V. alginolyticus* à 72.1% au lieu de 78.6% dans le témoin. L'utilisation des souches probiotiques permet d'améliorer les taux de survie en appliquant *E.durans*(82.9%) et *Psychrobacter cibarius*(77.9%). Alors qu'une baisse de ce taux de survie a été observée en présence d'*E.faecium* (63.3%). Cependant, ces variations sont statistiquement non significatives ($p>0.05$).

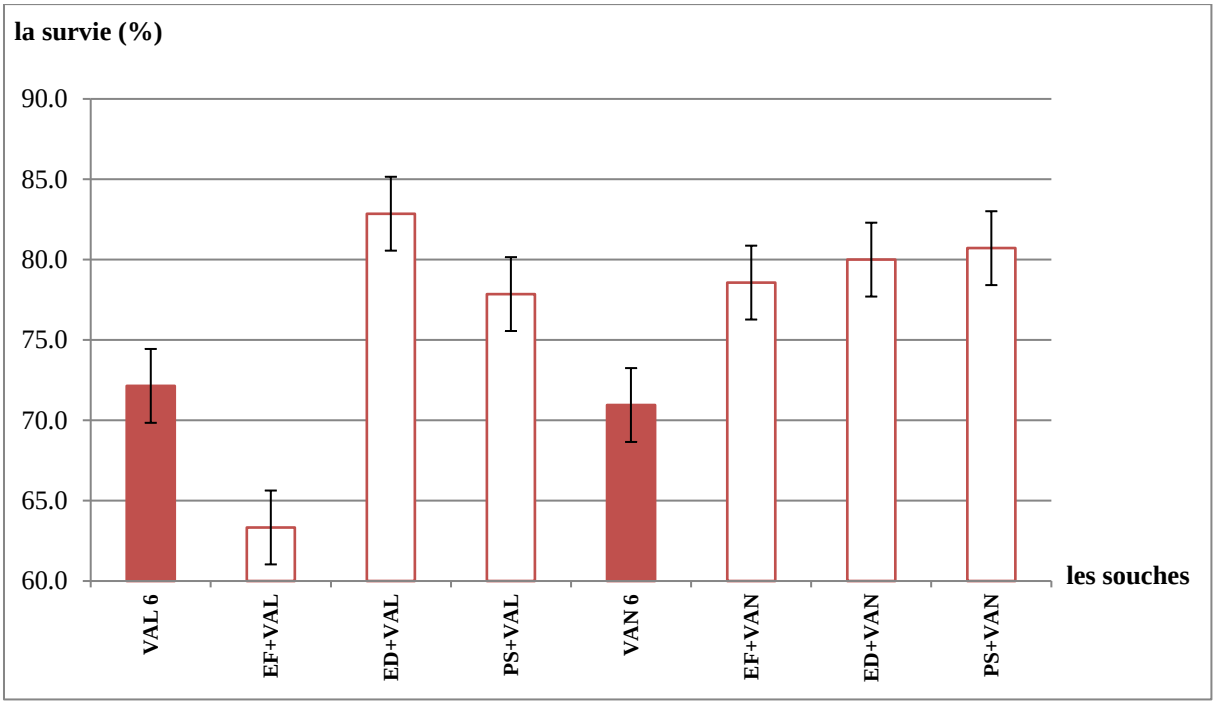

Figure13: Les taux de survie des nauplii d'Artémie après l'application des différentes combinaisons(souches pathogènes/probiotiques) : (VAL6 :*V.Alginoliticus* **; VAN6 :** *V.Anguillarum* ;; FE+VAL :*E.Faecium* +*V.Alginoliticus* ;ED+VAL : *E. durans*+ *V.Alginoliticus* ; Ps : *Psychrobacter cibarius* +*V.Alginoliticus* ; EF+VAN :*E.Faecium*+*V. anguillarum* ; ED+VAL :*E. durans*+ *V. anguillarum* ; Ps+VAN : *Psychrobacter cibarius*+ *V. anguillarum*

Concernant, l'application de la souche pathogène *V. anguillarum*, le taux de survie des nauplii a été de 71%. Ce taux est amélioré en présence des trois souches probiotiques : *E. faecium* (78.6%), *E.durans*(80%) *P. cibarius* (80.7%). Ces améliorations sont statistiquement significatives ($p<0.05$)

III-1-3-2 Effet sur la croissance :

III-1-3-2-A La taille :

Les résultats de la taille des nauplii dans une culture contenant des souches pathogènes et les souches probiotiques sont présentés dans la figure14

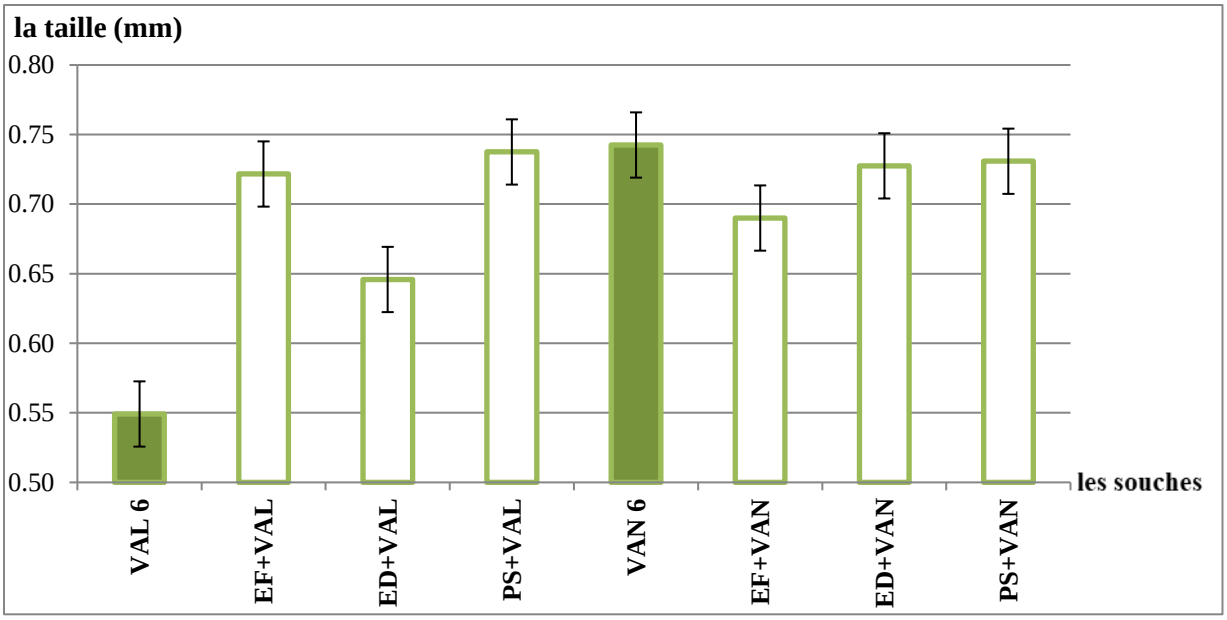

Figure14: Suivi de la taille des nauplii d'Artémie après l'application de souches pathogènes avec lessouches probiotiques (VAL6 :*V.Alginoliticus* **; VAn6 :** *V.Angularum* ;6 : la concentration de souches ; FE+VAL :*E.Faecium*avec*V.Alginoliticus ;* ED+VAL : *E. durans* avec *V.Alginoliticus ;* Ps : *Psychrobacter cibarius* avec *V.Alginoliticus ;* EF+VAN :*E.Faecium* avec *V. anguillarum* ; ED+VAL :*E. durans* avec *V. anguillarum ;* Ps+VAN : *Psychrobacter cibarius* avec*V. anguillarum*

Contrôle de *V. Alginolyticus*

Nous avons remarqué que l'administration de la souche pathogène *V.Alginoliticus*(10^6UFC/ml) a un effet négatif sur la taille des nauplii d'Artemia vue qu'ellea diminué d'une taille de 0.82mm (témoin) à une taille de 0.54mm ; par contre l'ajout de la souche probiotique*E.faecium*améliore la taille d'une valeur de 0.54mm à 0.72mm.

On peut voir aussi que l'ajout de la deuxième souche probiotique *E.durans*avec le même pathogène afait augmenter la taille de 0.54mm à 0.64mm. Cette augmentation a également été observéelors de l'application de la troisième souche *Psychrobacter cibarius,* ce qui améliore la taille de 0.54mm à0.73mm. Cependant, cette variation est statistiquement non significative (P>0.05).

Contrôle de *V. anguillarum*

Les nauplii présents dans une culture contenant *V. anguillarum*ont présenté une diminution de taille de 0.82 à 0.74mm. Par ailleurs, l'application des souches probiotiques en vue de contrôler l'effet de la souche pathogène n'a pas montré un effet positif sur le paramètre taille :

- *E. faecium :* diminution de la taille des nauplii de 0.74mm à 0.69mm.
- *E. durans :* la taille passe de 0.74mm à 0.72mm
- *Psychrobacter cibarius :* la taille varie de 0.74mm à 0.73mm.

Mahdhi et *al.*, (2010) ont rapporté une amélioration significative de la taille de l'artémie lors de l'ajout de *Pseudomonassp*.à la culture d'artémie traitée par *V. alginolyticus***.**

III-1-3-2-B la biomasse:

Les résultats du paramètre production totale de biomasse suivi le long des différentes expérimentations sont présentés dans la figure15 ci-dessous :

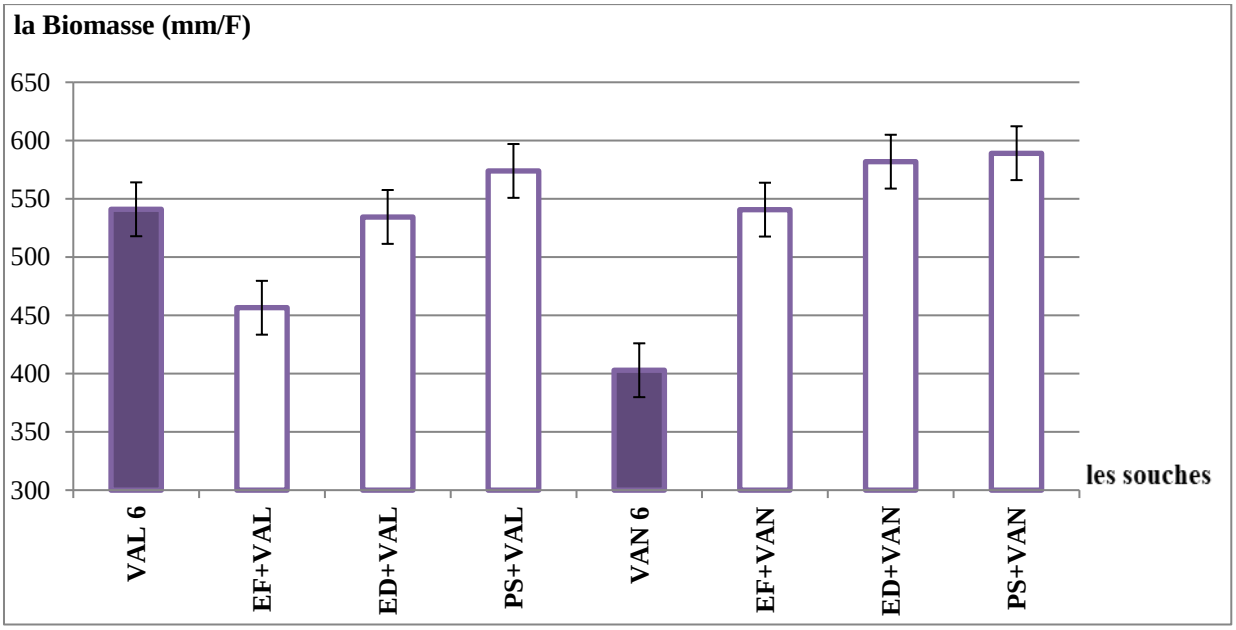

Figure15: Suivi de la biomasse des nauplii d'Artémies après l'application des combinaisons souches pathogènes/souches probiotiques (VAL6 :*V.Alginoliticus* **; VAn6 :** *V.Angularum ;* 6 : la concentration de souches ; FE+VAL :*E.Faecium +V.Alginoliticus ;* ED+VAL :*E. durans + V.Alginoliticus* ;Ps : *Psychrobacter cibarius+V.Alginoliticus ;* EF+VAN :*E. faecium+V. anguillarum* ;ED+VAL :*E. durans+ V. anguillarum* ;Ps+VAN : *P. cibarius + V. anguillarum*)

D'après les résultats, nous avons remarqué que la valeur de la biomasse obtenue en présence de la souche pathogène *V. alginolyticus* (39.3mm/F) est inférieure à celle du témoin. Cette biomasse s'améliore jusqu'à 45.7, 57.4, 53.4 mm/F en présence de*E. faecium, Psychrobacter cibarius* et*E.durans,* respectivement. Cependant, cette amélioration est considérée statistiquement non significative (P>0.05)

Concernant *V. anguillarum*, nous avons noté une baisse de la biomasse en comparaison avec le témoin (52.5mm/F). L'ajout des souches probiotiques a montré une amélioration de ce paramètre avec des valeurs différentes mentionnées ci-dessous:

- *E. faecium* :améliore la biomasse jusqu'au 54.1mm/F

- *E. durans* : améliore la biomasse jusqu'au 58.2 mm/F.
- *Psychrobacter cibarius* : améliore la biomasse jusqu'au 58.9 mm/F.

Seule, *Psychrobacter cibarius* améliore le paramètre production totale de biomasse de manière statistiquement significative ($P<0.05$).

Mahdhi et *al.*,(2010), ont rapporté un faible TBP (biomasse totale) lors de l'application de la souche probiotique *Pseudomonas.* Ce paramètre s'améliore d'unemanière non significative lors d'un traitement additionnel à la levure.

IV Discussion générale

La performance des probiotiques dans des conditions *in vitro* peut ne pas coïncider avec les conditions *in vivo* (**Kesarcodi-Watson et *al.*, 2008 ; Chean M. Y.B et *al.*, 2021**) ; c'est pourquoi dans notre travail nous avons appliqué des souches à potentiel probiotique *in vitro* sur une culture*Artemia*dans un test préliminaire de provocation *in vivo* contre des souches pathogènes : *V. alginolyticus*et*V. anguillarum.* Les résultats ont révélé une amélioration significative du taux de survie des artémies lors de la confrontation de *V. anguillarum* et les trois souches probiotiques utilisées : *E. faecium*, *E. durans ou P. cibarius.* Ces résultats corroborent les données de la littérature qui rapportent un effet bénéfique sur le taux de survie des artémies lors de l'application de souches probiotiques exemples : *L. brevis* et*L. casei* (**Vilamil et *al.*, 2003**),probiotique mixte :*Lysinibacillus fusiformis* et *Bacillus megaterium*(**CheanM. Y. B et *al.*, 2021**), *E. durans* associé à l'artémie afin d'alimenter les crustacés (**Bhaheerathan et *al.*, 2020**). Par ailleurs, une diminution du taux de survie de l'artémie en présence d'*E. faecium* a été observée. Un même résultat a été rapporté par **Touraki et *al.*, (2012)** lors de l'utilisation des souches :*Bacillus subtilis* et *Lactobacillus plantarum*dans une culture d'artémies.

Ces résultats suggèrent que les souches probiotiques peuvent avoir la capacité de produire ou de sécréter des composés antibactériens ou des substances inhibitrices qui sont antagonistes envers *V. alginolyticus* et *V. anguillarum* (**Swain et *al.*, 2009 ; Chean M. Y et *al.*, 2021**). Les substances extracellulaires telles que les bactériocines, le peroxyde d'hydrogène, les sidérophores, les lysozymes et les protéases libérées par les probiotiques peuvent avoir des conséquences antagonistes sur une autre microflore. De plus, la production d'acides, comme l'acide lactique, peut diminuer le pH intestinal des espèces aquatiques, la prolifération des pathogènes (**Pintado et *al.*, 2014 ; chaurasia et *al.*,2015 ; Zorriehzahra et *al.*, 2016 ; chean M. Y et *al.*, 2021**).

L'amélioration du taux de survie d'*Artemia* supplémentée avec des probiotiques, laisse supposer que nous pourrons utiliser l'artémie comme un vecteur de transmission bio encapsulé, afin de les donner à l'hôte pour améliorer la croissance, les paramètres d'alimentation et la réponse immunitaire tel que proposé par **Jafaryan et *al.*, (2010)**.

Le mécanisme d'action des bactéries probiotiques sur les bactéries pathogènes dans les cultures d'Artémies reste toujours peu connu, l'inhibition de ces dernières est due à l'effet d'antagonisme ou bien à la compétition de ressources avec les bactéries probiotiques (nutriments, espace, sites d'adhésion, etc.) **Pintado et *al.*, 2014.**

Verschuere et *al.*, 1999 ont isolé et testé différentes bactéries à partir/sur des cultures d'Artemia performantes, ces dernières ont montré une bonne amélioration de paramètres (la survie et la croissance d'Artemia). **Verschuere et *al.*, 2000** ont confirmé aussi leurs pouvoir de contrôle des bactéries pathogènes (cas de *V. proteolyricus*) dans une culture d'Artémie.

CONCLUSION

Conclusion

L'objectif de cette étude a été d'évalué la performance des souches à potentiel probiotique dans la culture d'artémie afin d'améliorer certains aspects d'élevage des nauplii d'artémie : le taux de survie et la croissance des nauplii ainsi que le contrôle de souches pathogènes : *V. aliginolyticus et V. anguillarum.*

- L'application des souches probiotiques seules sur une culture d'artémie a montré des améliorations non significatives sur le taux de survie pour *E. Faecium* et *P. cibarius* à des charges de 10^7 et 10^8UFC/ml, et une amélioration significative pour *E. durans* à une charge de 10^8UFC/ml. Concernant les paramètres de croissance taille et biomasse totale, seule *E. faecium* à 10^8 UFC/ml a présenté une amélioration significative.
- L'application des souches probiotiques pour le contrôle des souches pathogènes *V.alginolyticus et V. anguillarum* a révélé un effet significativement positif sur le taux de survie des artémies en présence de *V. anguillarum* pour les trois souches appliquées et une amélioration non significative pour *E.durans et P.cibarius* en présence de *V.alginolyticus*. Concernant le paramètre taille et biomasse totale en présence de *V. alginolyticus,* nous avons observé une amélioration mais non significative. Par ailleurs, la variation de ces paramètres en présence de *V. anguillarum* a révélé une amélioration de la biomasse totale pour les trois souches appliquées. Cette amélioration est statistiquement significative que pour *P. cibarius.*

Notre présente étude à confirmer que les souches bactériennes utilisées *Enterococcus faecium, Enterococcus durans* et *Psychrobacter cibarius* possèdent réellement une activité probiotique. Elles améliorent, *in vivo,* le taux de survie des nauplii et contrôle les souches pathogènes particulièrement, *Vibrio anguillarum.*Ces souches peuventêtre utilisées pour l'amélioration des conditions d'élevage d'Artémie et leur protection des pathogènes.

En perspective, d'autres travaux méritent d'être entrepris afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition des pathogènes et de confirmer l'effet probiotique des souches testées. Il serait également intéressant d'étudier l'effet des différentes combinaisons des souches probiotiques en vue d'utiliser un mixes probiotiques.

CHAPITRE V

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abatzopoulos, T. J., Amat, F., Baxevanis, A. D., Belmonte, G., Hontoria, F., Maniatsi, S., ... &Shadrin, N. V. (2009). Updating geographic distribution of Artemia urmianaGünther, 1890 (Branchiopoda: Anostraca) in Europe: an integrated and interdisciplinary approach. *International Review of Hydrobiology*, *94*(5), P.P. 560-579.

Abbara, A., &Dhillo, W. S. (2020).Makorinrings the kisspeptin bell to signal pubertal initiation. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(8).

Abdelkarim, M., Kamel, C., Fathi, K., &Amina, B. (2010). Use of Pseudomonas stutzeri and Candida utilis in the improvement of the conditions of Artemia culture and protection against pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(1), P.P.107-115.

Abdelkarim, M., Kamel, C., Fathi, K., &Amina, B. (2010).Use of Pseudomonas stutzeri and Candida utilis in the improvement of the conditions of Artemia culture and protection against pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, *41*(1), P.P.107-115.

Amarouayache, M., & Kara, M. H. (2010).Qualité et biomasse exploitable d'Artemia Salina (Crustacé, Anostracé) du Chott Marouane (Nord-Est, Algérie). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, *21*, P.P. 29-39.

Amat, F. (1985). Utilisation de l'Artemia en aquaculture.*Rapports techniques de l'institut d'enquêtes sur les pêches*, Brcelone : Septembre-octobre 1985, P.P.128-129

Amend, D. F. (1981). Potency testing of fish vaccines. *Fish biologics: serodiagnostics and vaccines*, P.P. 447-454.

Asem, A., &Rastegar-Pouyani, N. (2010). Different salinities effect on biometry of nauplii and meta-nauplii of two Artemia (Crustacea; Anostraca) populations from Urmia Lake basin. *Int. J. Aqu. Sci*, *1*(1), P.P.10-13.

Balcázar, J. L., Rojas-Luna, T., & Cunningham, D. P. (2007).Effect of the addition of four potential probiotic strains on the survival of pacific white shrimp (Litopenaeusvannamei) following immersion challenge with Vibrio parahaemolyticus. *Journal of invertebrate pathology*, *96*(2), P.P.147-150.

Berg, N., Miller, T. H., Pearce, A. P., Shuttleworth, S. G., Williams-Wynn, D. A., Greifeneder, J. G., ... & Reid, J. A. (1967). Studies on the elimination of sulfide from

tannery beamhouse effluents by manganese catalyzed oxidation. *Journal of American Leather Chemists Association*, *62*(684), P.67l.

Bhaheerathan, J. I., Saravana, B. P., Chinnasamy, D., Thangaraj, M., Ramasamy, K., Thirunavukkarasu, M., ...&Paramasivam, P. (2020). Growth and survival promotion of a probiotic bacterium Enterococcus durans enriched Artemia nauplii on the prawn Macrobrachiumrosenbergii. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, *12*(1), P.P.087-101.

Bondad-Reantaso, M. G., McGladdery, S. E., East, I., & Subasinghe, R. P. (2001).Asia diagnostic guide to aquatic animal diseases.

Boonthai, T., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2011). Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (Penaeus monodon). *Aquaculture Nutrition*, *17*(6), P.P.634-644.

Bowen, W. D., Oftedal, O. T., &Boness, D. J. (1985). Birth to weaning in 4 days: remarkable growth in the hooded seal, Cystophoracristata. *Canadian Journal of Zoology*, *63*(12), P.P.2841-2846.

Brine Shrimp Artemia. Morphology, Genetics, Radiobiology,

Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., & Austin, B. (2007).The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *30*(10), P.P.573-579.

Chaurasia, M. K., Palanisamy, R., Bhatt, P., Kumaresan, V., Gnanam, A. J., Pasupuleti, M., &Arockiaraj, J. (2015). A prawn core histone 4: Derivation of N-and C-terminal peptides and their antimicrobial properties, molecular characterization and mRNA transcription. *Microbiological research*, *170*, P.P.78-86.

Chaurasia, P., von Ossowski, I., Palva, A., & Krishnan, V. (2015).Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of SpaD, a backbone-pilin subunit encoded by the fimbrialspaFED operon in Lactobacillus rhamnosus GG. *ActaCrystallographica Section F: Structural Biology Communications*, *71*(1), P.P.103-106.

Colorni, A. (1980). A study on the bacterial flora of giant prawn, Macrobrachiumrosenbergii, larvae fed with Artemia salina nauplii. *Aquaculture*, *49*(1), P.P.1-10.

Curto, F., Benijts, J., Pansadoro, A., Barmoshe, S., Hoepffner, J. L., Mugnier, C., ...& Gaston, R. (2006). Nerve sparing laparoscopic radical prostatectomy: our technique. *European urology*, *49*(2), P.P.344-352.

Da Silva, S. T., dos Santos, C. A., & Bressan, J. (2013). Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. *Nutricionhospitalaria*, *28*(4), P.P.1039-1048.

DAHLOUM, L. (2007) Contribution à l'étude de trois populations d'artemia endémiques aux eaux des salinesdeBethiou, de Sidi Bouziane et le lac salé d'El Meniâ. Mémoire de Magister en Sciences Agronomiques, Mostaganem, Algérie : Université Abd El Hamid Ibn Badis.

Dhont, J. K., Lettinga, M. P., Dogic, Z., Lenstra, T. A., Wang, H., Rathgeber, S., ...& Lindner, P. (2003). Shear-banding and microstructure of colloids in shear flow. *Faraday discussions*, *123*, P.P.157-172.

Diggles, B. K., Carson, J., Hine, P. M., Hickman, R. W., &Tait, M. J. (2000). Vibrio species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (Colistiumnudipinnis) and brill (C. guntheri) in New Zealand. *Aquaculture*, *183*(1-2), P.P.1-12.

Dominique Gauguier et *al.*, (2021).Microbiote intestinal (flore intestinale),Une piste sérieuse pour comprendre l'origine de nombreuses maladies.[En ligne] [consulté le :22/08/2021]. Disponible sur le web:https://www.inserm.fr/dossier/microbiote-intestinal-flore-intestinale/

Drewes, C. (2002). Artemia franciscana. [En ligne] [consulté le :17/07/2021]. Disponible sur le web: www.zool.iastate.edu/~c drewes/, 2002.

Franck, T. (1998). L'exclusion sociale dans les Alpes maritimes. *VIH, drogue, délinquance, précarité.'enquêtes sur le terrain, Paris, Le Harmattan*.

Gaëlle, D. E. C. R. O. U. Y., Cathen'ne, R. M., Jérôme, R. E. Y. N. A. U. D., &

Gajardo, G. M., & Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp Artemia: adapted to critical life conditions. *Frontiers in physiology*, *3*, P.185.

Ghomari, S. M., Selselet-Attou, G., Hontoria, F., Moncef, M., &Amat, F. (2012).Note sur la biogéographie de la biodiversité du genre Artemia dans la région ouest de l'Afrique du Nord (Algérie, Maroc et Tunisie).F:crus2969.tex; P.P.1 (39-111)

GILLILAND, Stanley E.et *al.*, (2001).Consultation mixte d'experts FAO/OMSsur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnellesdes probiotiques dans les aliments, y compris le lait en poudre contenant desbactéries lactiques vivantes. [En ligne] [consulté le :15/06/2021]. Disponible sur le web:https://www.fao.org/3/y6398f/y6398f.pdf

Gorospe, J. N., Nakamura, K., Abe, M., & Higashi, S. (1996).Nutritional contribution of Pseudomonas sp. in Artemia culture. *Fisheries science*, *62*(6),P.P. 914-918.

GUNTHER, D.C. & CATENA, A. (1980) The interaction of *Vibrio* with Artemia nauplii. In The Brine Shrimp Artemia ed. Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, 0.& Jaspers, E. P.P. 213-221, Vol. 1.Wetteren, Belgium: Universa Press.

Gupta, A., & Verma, J. P. (2015). Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: a review. *Renewable and sustainable energy reviews*, *41*, 550-567.

Gut Microbes.(2010). Current level of consensus on probiotic science.[En ligne] [consulté le :19/07/2021]. Disponible sur le web :
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056112/

Havenaar, R., Ten Brink, B., &Huis, J. H. (1992).Selection of strains for probiotic use.In *Probiotics* P.P.209-224.Springer, Dordrecht.

Hipólito-Morales, A., Maeda-Martínez, A. M., & Martinez-Diaz, S. F. (2009). Use of Microbacterium sp. and Exiguobacterium mexicanum to improve the survival and development of Artemia under xenic conditions. *Aquaculture international*, *17*(1), P.P.85-90.

Irianto, A., & Austin, B. (2002).Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). *Journal of fish diseases*, *25*(6), P.P.333-342.

Jafaryan, H., Mehdi, T. M., & Mohammad, M. N. (2010).The effects of probiotic bacillus for promotion of growth and feeding parameters in beluga (Husohuso) larvae via feeding by bioencapsulated Artemia. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, *3*(4), P.P.273-280.

Kesarcodi-Watson, A., Kaspar, H., Lategan, M. J., & Gibson, L. (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, *274*(1), P.P.1-14.

Laffargue, C. (2015). *Intérêt des probiotiques dans la prévention de pathologies et conseils en officine* .Mémoire de thèse de doctorat en pharmacie, Toulouse : université de Toulouse III-Paul Sabatier.

Lamari, F., Sadok, K., Bakhrouf, A., &Gatesoupe, F. J. (2013).Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and in vivo test on Artemia nauplii. *Aquaculture international*, *22*(2), P.P.699-709.

Lavens, P., & Sorgeloos, P. (2000).The history, present status and prospects of the availability of Artemia cysts for aquaculture. *Aquaculture*, *181*(3-4), P.P.397-403.

Mahdhi, A., Harbi, B., Esteban, M. Á., Chaieb, K., Kamoun, F., & Bakhrouf, A. (2010).Using mixture design to construct consortia of potential probiotic Bacillus strains to protect gnotobiotic Artemia against pathogenic Vibrio. *Biocontrol science and technology*, *20*(9), P.P.983-996.

Mahdhi, A., Hmila, Z., Chaieb, K., Kamoun, F., & Bakhrouf, A. (2011). Probiotic properties of halophilic Bacillus strains enhance protection of Artemia culture against pathogenic Vibrio. *Aquatic biology*, *13*(3), P.P.225-231.

Maniatsi, S., Bourtzis, K., &Abatzopoulos, T. J. (2010).May parthenogenesis in Artemia be attributed to Wolbachia?. *Hydrobiologia*, *651*(1), P.P.317-322.

Marden, B., Brown, P., &Bosteels, T. (2020). Great Salt Lake Artemia: ecosystem functions and services with a global reach. In *Great Salt Lake Biology*, Springer, Cham, P.P.175-237.

Marques, A., Dinh, T., Ioakeimidis, C., Huys, G., Swings, J., Verstraete, W., ...& Bossier, P. (2005). Effects of bacteria on Artemia franciscana cultured in different gnotobiotic environments. *Applied and environmental microbiology*, *71*(8), P.P.4307-4317.

Martins, M. L., Mouriño, J. L. P., Amaral, G. V., Vieira, F. N., Dotta, G., Jatobá, A. M. B., ... &Buglione-Neto, C. C. (2008). Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with Enterococcus sp. *Brazilian Journal of Biology*, *68*(3), P.P.657-661.

Merrifield, D. L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S. J., Baker, R. T., Bøgwald, J., ...&Ringø, E. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, *302*(1-2), P.P.1-18.

Mohebbi, F. (2010). The Brine Shrimp Artemia and hypersaline environments microalgal composition: a mutual interaction. *Int. J. of Aquatic Science*, *1*(1), P.P.19-27.

Moriñigo, M. A., Romalde, J. L., Chabrillon, M., Magariños, B., Arijo, S., Balebona, M. C., &Toranzo, A. E. (2002).Effectiveness of a divalent vaccine for gilt-head sea bream (Sparusaurata) against Vibrio alginolyticus and Photobacteriumdamselae subsp. piscicida. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, *22*(5), P.P.298-303.

Moriñigo, MA, Romalde, JL, Chabrillon, M., Magariños, B., Arijo, S., Balebona, MC etToranzo, AE (2002). Efficacité d'un vaccin divalent contre la daurade royale (Sparusaurata) contre Vibrio alginolyticus et Photobacteriumdamselaesubsp. piscicide. *Bulletin-Association européenne des pathologistes des poissons*, *22* (5), P.P.298-303.

Mujeeb Rahiman, K. M., Jesmi, Y., Thomas, A. P., & Mohamed Hatha, A. A. (2010).Probioticeffect of Bacillus NL110 and Vibrio NE17 on the survival, growth performance and immune response of Macrobrachiumrosenbergii (de Man). *Aquaculture research*, *41*(9), P.P.120-134.

Muñoz, J., &Pacios, F. (2010). Global biodiversity and geographical distribution of diapausing aquatic invertebrates: the case of the cosmopolitan brine shrimp, Artemia (Branchiopoda, Anostraca). *Crustaceana*, P.P.465-480.

Naceur, H. B., RejebJenhani, A. B., &Romdhane, M. S. (2008). Determination of biological characteristics of Artemia salina (Crustacea: Anostraca) population from SabkhetSijoumi (NE Tunisia). *Transitional Waters Bulletin*, *2*(3), P.P.65-74.

Naceur, H. B., RejebJenhani, A. B., &Romdhane, M. S. (2008). Determination of biological characteristics of Artemia salina (Crustacea: Anostraca) population from SabkhetSijoumi (NE Tunisia). *Transitional Waters Bulletin*, *2*(3), P.P.65-74.

Nath, K., Kumar, A., & Das, D. (2006).Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by Enterobacter cloacae DM11. *Canadian Journal of Microbiology*, *52*(6), P.P.525-532.

Ofelio, C., Ruiz, P., Paltrinieri, A., Pintado, J., &Planas, M. Survival of the probiotic bacteria Lactobacillus rhamnosusin seawater and its bioencapsulation in the brine shrimp Artemia.In *Front. Mar. Sci. Conference Abstract: IMMR| International Meeting on Marine Research 2014*.

Pilla, E. J., & Beardmore, J. A. (1994).Genetic and morphometric differentiation in Old World bisexual species of Artemia (the brine shrimp). *Heredity*, *73*(1), P.P.47-56.

Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., &Piyatiratitivorakul, S. (2008). Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabassLatescalcarifer.Aquaculture Research, 39(2), P.P.134-143.

Ruyet, P. L. (1975). Techniques d'élevage en masse d'un rotifère (Brachionusplicatilis Müller) et d'un crustacé branchiopode (Artemia salina L.). *Mariculture*, *1*, P.P.331-343.

Sanders, W. L. (2000). Value-added assessment from student achievement data: opportunities and hurdles CREATE NATIONAL EVALUATION INSTITUTE July 21, 2000. *Journal of personnel evaluation in education*, *14*(4), P.P.329-339.

Shefat, S. H. T. (2018). Vaccines for use in finfish aquaculture. *Acta Scientific Pharmaceutical Sciences*, *2*(11), P.19.

Silva Aciares, F. (2013). *Réponse transcriptomique et cellulaire de l'ormeau rouge Haliotis rufescens, cultivé en écloserie industrielle face aux stress métalliques et aux pathogènes: rôle des probiotiques dans la survie des organismes*, Mémoire de doctorat en en Océanographie biologique, Plouzané, Finistère : Ecole des sciences de la mer.

Skjermo, J., & Vadstein, O. (1999).Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture*, *177*(1-4), P.P.333-343.

Skoultchi, A. I., &Morowitz, H. J. (1964).Information storage and survival of biological systems at temperatures near absolute zero. *The Yale journal of biology and medicine*, *37*(2), P.158.

Snoussi, M., Noumi, E., Hajlaoui, H., Usai, D., Sechi, L. A., Zanetti, S., & Bakhrouf, A. (2009). High potential of adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio* alginolyticus strains. *Journal of applied microbiology*, *106*(5), P.P.1591-1599.

Subasinghe, R. P. (2005). Epidemiological approach to aquatic animal health management: opportunities and challenges for developing countries to increase aquatic production through aquaculture. *Preventive veterinary medicine*, *67*(2-3), P.P.117-124.

Swain, S. M., Singh, C., & Arul, V. (2009). Inhibitory activity of probiotics Streptococcus phocae PI80 and Enterococcus faecium MC13 against vibriosis in shrimp Penaeus monodon. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*(4), P.P.697-703.

Thiéry, A., & Puente, L. (2002).Crustacean assemblage and environmental characteristics of a man-made solar saltwork in southern France, with emphasis on anostracan (Branchiopoda) population dynamics. *Hydrobiologia*, *486*(1), P.P.191-200.

Torrentera, L., & Dodson, S. I. (2004).Ecology of the brine shrimp Artemia in the Yucatan, Mexico, Salterns. *Journal of plankton research*, *26*(6), P.P.617-624.

Touraki, M., Karamanlidou, G., Karavida, P., &Chrysi, K. (2012). Evaluation of the probiotics Bacillus subtilis and Lactobacillus plantarumbioencapsulated in Artemia nauplii against vibriosis in European sea bass larvae (Dicentrarchus labrax, L.).World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(6), P.P.2425-2433.

Touraki, M., Karamanlidou, G., Koziotis, M., &Christidis, I. (2012). Antibacterial effect of Lactococcus lactis subsp. lactis on Artemia franciscana nauplii and Dicentrarchus labrax larvae against the fish pathogen *Vibrio anguillarum*.Aquaculture International, 21(2), P.P.481–495.

Treece, G. D. (2000). *Artemia production for marine larval fish culture* (Vol. 702). Stoneville, Mississippi: Southern Regional Aquaculture Center.

Triantafyllidis, N., &Bardenhagen, S. (1996). The influence of scale size on the stability of periodic solids and the role of associated higher order gradient continuum models. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, *44*(11), P.P.1891-1928.

Triantaphyllidis, G. V., Abatzopoulos, T. J., Miasa, E., & Sorgeloos, P. (1996). International study on Artemia. LVI. Characterization of two Artemia populations from Namibia and Madagascar: cytogenetics, biometry, hatching characteristics and fatty acid profiles. *Hydrobiologia*, *335*(2), P.P.97-106.

Van Stappen, G. (1996). Use of cysts In *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, Vol. 361, P.P.107-136.FAO.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., &Verstraete, W. (2000).Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, *64*(4), P.P.655-671.

Vieira, F. D. N., BuglioneNeto, C. C., Mouriño, J. L. P., Jatobá, A., Ramirez, C., Martins, M. L., ... &Vinatea, L. A. (2008). Time-related action of Lactobacillus plantarum in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulant. *PesquisaAgropecuáriaBrasileira*, *43*, P.P.763-769.

Vijayan, K. K., Singh, I. B., Jayaprakash, N. S., Alavandi, S. V., Pai, S. S., Preetha, R., ... & Santiago, T. C. (2006). A brackish water isolate of Pseudomonas PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic Vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. *Aquaculture*, *251*(2-4), P.P.192-200.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., & Novoa, B. (2003).Control of Vibrio alginolyticus in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture*, *219*(1-4), P.P.43-56.

Vine, N. G., Leukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J., & Hecht, T. (2004).Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of fish diseases*, *27*(6), P.P.319-326

Wang, Li, J. H., Chen, E. T., & Chen, W. F., W. X. (2008).Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, *40*(1), P.P.238-246.

Zhou, R., Yang, F., Chen, D. F., Sun, Y. X., Yang, J. S., & Yang, W. J. (2013). Acetylation of chromatin-associated histone H3 lysine 56 inhibits the development of encysted Artemia embryos. *PLoS One*, *8*(6),

Zorriehzahra, M. J., Delshad, S. T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K., &Lazado, C. C. (2016). Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinaryquarterly*, *36*(4), P.P.228-241.

Zubairi, S. I., Othman, Z. S., Sarmidi, M. R., & Aziz, R. A. (2016).Environmental friendly bio-pesticide Rotenone extracted from Derris sp.: A review on the extraction method, toxicity and field effectiveness. *JurnalTeknologi*, *78*(8).