

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 FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME
D'INGENIEUR ET MASTER EN SCIENCE DE LA MER

OPTION: BIOTECHNOLOGIE MARINE

Thème :

**Application de bactéries à fort potentiel
probiotique dans un élevage d'*Artémia. sp***

Réalisé par :

- ❖ MEDERRES Rima
- ❖ BOUZERD Meriem

Soutenu le 28/10/2019 devant la commission du jury suivant :

Mme. AMAR I.	Maître assistante A	Présidente
Mme. BOURABAIN F.	Maître assistante A	Examinatrice
Mme. CHAOU N.	Maître assistante A	Examinatrice
Mme. ALOUACHE S.	Maître de conférences A	Promotrice
Mme. BOUACHACHA CH.	Doctorante	Co-Promotrice

Promotion : 2018/2019

Remerciements

Au Bon Dieu, le tout puissant, pour nous avoir assuré la vie jusqu'à ce jour et permis de poursuivre nos études et réaliser ce modeste travail.

Qu'Allah, le clément et le miséricordieux, puisse continuer à nous aider jusqu'à la fin de nos jours, tout en nous assurant une bonne santé physique et morale, car : « nul n'est infaillible et saint d'esprit sauf le tout puissant et nul n'échappera à sa destinée ».

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 :

- Madame ALOUACHE Souhila, Maître de conférences A à l'ENSSMAL et promotrice de ce travail, pour son encadrement scientifique, son soutien, sa disponibilité et notamment la confiance qu'elle nous a accordé au cours de la réalisation de cette étude.

-Madame BOUACHA Chahrazed, Doctorante à l'ENSSMAL et Co-promotrice de ce mémoire, pour son suivi, sa collaboration, ses conseils, sa disponibilité et son accompagnement dans l'aspect technique.

- Mme AMAR I., maitre assistante A à l'ENSSMAL, pour nous avoir fait l'honneur en acceptant de présider ce jury.

- Mme BOURABAIN F., maître assistante A à l'ENSSMAL et Mme CHAOU N. maître assistante A à l'ENSSMAL, pour nous voir fait l'honneur d'examiner ce travail.

Nous exprimons également nos remerciements à toute l'équipe et les ingénieures des laboratoires de l'ENSSMAL aussi toute l'équipe de la bibliothèque pour sa disponibilité, sa collaboration, ses conseils, et sa gentillesse ainsi qu'à tous les enseignants qui ont contribué à nous donner une formation solide tout au long de nos années d'études.

Et enfin, nous disons « M E R C I » à tous ceux qui nous ont apporté de près ou de loin leur aide.

Dédicace

Je dédie ce modeste travail, fruit de longues années d'étude à Mes chers parents **Abed** et **Fatima** que Dieu ait pitié d'elle qui ont consacré toute leur vie pour la réussite de leur fille.

A mon chère époux : **Mustapha**

A ma deuxième mère : **Khayra**

A mes frères: **Mohamed, Omar, Youcef** et **Abdelkader**

A mes sœurs : **Zineb, Sabrina, Nor el houda, Sihem**

Sans oublier : la famille de mon mari

A tous mes amis et particulièrement: **Maroua, Ahlem, Ahlem**

Et surtout Mon binôme et ma co-équipière **Rima**

Aussi mes dédicaces à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail.

Meriem

Dédicace

Je dédie ce travail :

A mes chers parents

A mes sœurs Maroua, Racha et Nadia

A mes frères Hamdi et Abd-el Rahman

A mon amie Ahlem

Aux membres de ma promotion

Et surtout Mon binôme et ma co-équipière Meriem

Aussi mes dédicaces à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à

réaliser ce travail

Rima

LISTE DES ACRONYMES

FAO : Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture.

OMS : Organisation mondiale de la santé.

MRS : deMan, Rogosa, Sharpe.

UFC : Unité formelle colonie.

EE : Efficacité d'éclosion.

TCBS : Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose.

API : Appareillage et procédé d'identification.

nm : Nanomètre

T° : Température.

g/l : gramme par litre. **ml** : Millilitre.

h: Heure. **min** : Minute.

s : Seconde. **mm** : Millimètre.

Ind : Individu

S : Souche.

°C : degré Celsius.

JR : Jour

pH : Potentiel hydrogène.

S : Salinité.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I-1 : Exemple de souches probiotiques appliquées dans le domaine de l'aquaculture.....	11
Tableau II-1 : les noms des souches probiotiques.....	15
Tableau II-2 : Le taux de nourrissage journalier des nauplius d'après.....	23
Tableau II-3 : Le programme hebdomadaire pour le suivi d'élevage de chaque bouteille.....	24
Tableau III-1: Résultats d'identification et dénombrement les colonies isolées sur Mac conkey.....	30
Tableau III-2: Résultats d'identification et dénombrement les colonies isolées sur TCBS.....	34
Tableau 01: l'effet des souches probiotique sur l'inhibition de bactéries potentiellement pathogènes du milieu d'élevage d'artémie.....	47
Tableau 02: Synthèse des résultats de l'effet sur la croissance.....	47

LISTE DES FIGURES

Figure I-1 : <i>Artémia sp.</i>	2
Figure I-2: Cycle de vie d' <i>Artémia</i>	3
Figure I-3: Aspect typique des cystes d' <i>Artémia</i> traités, déshydratés et prêts à être utilisés en aquaculture.....	4
Figure I-4: Larve d'Artémie.....	5
Figure I-5: Morphologie de l'adulte de l'Artémie.....	5
Figure II-1 : Artémia commerciale	16
Figure II-2 : L'ensemencement de l'eau d'élevage d' <i>Artémia.sp</i> après l'éclosion sur Mac conkey et TCBS.....	18
Figure II-3 : Galerie API 20 E.....	20
Figure II-4 : Schéma générale résume L'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'Efficacité d'éclosion des cystes d' <i>Artemia</i> et de la qualité microbiologique du milieu.....	21
Figure II-5 : Préparation des bouteilles d'élevages.....	22
Figure III-1: Efficacité d'éclosion des cystes d'Artémie en présence et en absence de souches à potentiel probiotique dans le milieu d'élevage.....	26
Figure III-2 : Dénombrement des bactéries à Gram négatif sur gélose Mac conkey , dans le milieu d'élevage d'artémie en présence des différentes souches à potentiel probiotique.....	28
Figure III-3 : Dénombrement des bactéries à lactose positif et les bactéries lactose négatif sur gélose Maconkey, dans le milieu d'élevage d'artémie en présence des différentes souches à potentiel probiotique.....	28
Figure III-4: Evolution de la taille TL de l'artémie après une alimentation par la spiruline additionnée de souches à potentiel probiotique.....	35
Figure III-5 : Le suivi du gain de la taille (TL) des artémies après une alimentation par la spiruline additionnée de souches à potentiel probiotique.....	36
Figure III-6: Evolution de la taille TL de l'artémie après une alimentation par la Chlorelle additionnée de souches à potentiel probiotique.....	37
Figure III-7: Le suivi du gain de la taille (TL) des artémies après une alimentation par la Chlorelle additionnée de souches à potentiel probiotique.....	37
Figure III-8: Suivi de la croissance de la taille « TA » de l'artémie après une alimentation à la spiruline supplémentée de souche probiotique.....	39
Figure III-9 : Le gain de taille « TA » des nauplius alimenté par la spiruline supplémentée par des souches probiotiques.....	39

Figure III-10: Suivi de la croissance de la taille « TA » de l'artémie après une alimentation à la Chlorelle supplémentée de souche probiotique.....	40
Figure III-11 : Le gain de taille « TA » des nauplius alimenté par la Chlorelle supplémentée par des souches probiotiques.....	41
Figure III-12: Suivi de la croissance de la taille TF des nauplius alimentés par la spiruline supplémentée de souches probiotiques.....	42
Figure III-13 : Le gain de taille « TF » par les nauplius alimenté par la spiruline supplémentée de souches probiotiques.....	42
Figure III-14 : Suivi de la croissance de la taille TF des nauplius alimentés par la chlorelle supplémentée de souches probiotiques.....	43
Figure III-15: Le gain de la taille TF des nauplius alimentés par la chlorelle supplémentée de souches probiotiques.....	43
Figure III-16: Le taux de survie des nauplius alimentés par la spiruline supplémentée par des souches probiotiques.....	44
Figure III-17: Le taux de survie d'artemie alimenté par la souche probiotique intégré dans la chlorelle.....	45

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ACRONYMES

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

Introduction	1
Chapitre I : Généralités	
I-1 : Généralité sur <i>l'Artémia.sp</i>	4
I-1.1 Définition de <i>l'Artémia</i>	4
I-1.2 Classification.....	4
I-1.3 Morphologie.....	4
I-1.4 Cycle de vie.....	4
I-1.5 Ecologie.....	6
I-1.6 Cystes.....	6
I-1.7 Nauplii	6
I-1.8 Adulte	7
I-1.9 Alimentation.....	7
I-1.10 Utilisation en aquaculture.....	8
II : Généralités sur les Probiotiques	8
II-2.1 Définition de probiotique.....	8
II-2.2 Définition du probiotique en aquaculture.....	9
II-2.3 Les caractéristiques des probiotiques.....	10
II-2.4 Les modes d'action du probiotique.....	11
II-2.5 L'importance du probiotique dans l'aquaculture.....	12
II-2.6 L'application des probiotiques chez les poissons.....	13
II-2.7 L'application des probiotiques chez les crustacés.....	15

II-2. 8 Probiotiques chez l'artémie.....	16
Chapitre II : Matériel et méthodes	18
II-1- L'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'Efficacité d'éclosion des cystes d'Artemia et de la qualité microbiologique du milieu	18
II- 1-1- Préparation de la suspension probiotique.....	18
II-1-2- Préparation de la culture d'Artémie.....	19
II-1-3- détermination de l'efficacité d'éclosion.....	20
II-1-4- Détermination de la qualité microbiologique de l'eau d'élevage après éclosion.....	20
II-1-5- Tests d'identification.....	21
II-1-5-1- Coloration de Gram.....	21
II-1-5-2-Test d'oxydase.....	21
II-1-5-3-Test de catalase.....	22
II-1-5-4- Identification par système Galerie API20E	22
II-2- Application de souches probiotiques dans la culture d'Artemia afin d'améliorer le taux de croissance et le taux de survie des nauplius	25
II-2-1- Obtention des nauplius par hydratation des cystes et préparation de l'élevage.....	25
II-2-2-Estimation de la charge des nauplius	26
II-2-3-L'application des souches S33, S'2 et 8' dans l'alimentation des nauplius d'Artémie.....	26
II-2-4-Détermination du taux de croissance par la mensuration.....	27
II-2-5-Taux de survie.....	27
II-3 Les analyses statistiques	28
Chapitre III : Résultats et Discussions	
III-1- Résultats de l'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'efficacité d'éclosion des cystes d'artémie et l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux d'élevages	30
III-1-1- Effet sur l'efficacité d'éclosion (EE).....	30

III-1-2- Effet sur la qualité microbiologique du milieu d'élevage après éclosion.....	31
➤ Suivi de la charge et qualité des bactéries à Gram négatif.....	31
➤ Suivi des bactéries sur TCBS.....	35
III-2- Résultats de l'application des souches probiotiques dans l'alimentation de l'artémie.....	38
III-2-1- Effet des souches probiotiques sur le développement de la taille des artémies (TL, TA et TF).....	38
III-2-1-1- Effet sur la taille TL.....	38
III-2-1-2- Effet sur la taille TA.....	42
III-2-1-3- Effet sur la taille TF.....	44
III-2-2- Effet des souches probiotiques sur le taux de survie des artémies alimenté par les micro-algues.....	47
Conclusion	50
Références bibliographiques.....	53

Annexes

INTRODUCTION

Introduction :

Le problème majeur qui affecte la production en aquaculture comme les poissons, les crustacés, les mollusques ..., est de trouver des solutions préventives des maladies infectieuses due à la présence des souches pathogènes tel que *Vibrio.sp*, *Pseudomonas.sp*, *Pasteurella*, et ainsi de trouver de nourriture convenable aux larves des organismes aquatiques (MAHDHI et al., 2011.) .

Plusieurs fermes aquacoles utilisent une grande diversité alimentaire vivante comme les daphnies et les artémies. Le choix entre les nutriments correspond à la qualité nutritionnelle.

L'artémie est une source nutritionnelle très important de 51% à 55% de protéine, 14% à 15% de glucides, 13% à 19%, de graisse, 3% à 15% et des acides hautement saturés 3% à 15% (TREECE, 2000). Néanmoins, la culture de celle-ci avait des sérieuses problématiques concernant la pathogénicité due à la présence de plusieurs bactéries virulentes telles que *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Pasteurella* ... Cette infection est transmissible aux organismes alimenté par l'*Artemia* et cause des problèmes dans les élevages de poissons (MAHDHI et al., 2011), ce qui a contraint les aquaculteurs à utiliser les antibiotiques à titre préventif ou curatif. Cependant, ces pratiques ont favorisé l'apparition et la dissémination de la résistance des bactéries aux antibiotiques ce qui a engendré des échecs thérapeutiques et des pertes économiques (GAO et al., 2017).

Afin de palier 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, en stimulant sa réponse immunitaire et améliorer la qualité d'eau d'élevage (VERMA ET GUPTA, 2015).

Notre but à travers ce travail est de tester *in vivo* des souches à potentiel probiotique dans une culture d'*Artemia*, afin de déterminer leur effet sur plusieurs critères à savoir : le taux d'éclosion, la qualité microbiologique du milieu d'élevage, leur effet sur la croissance et le taux de survie des nauplii d'*Artémia*.

Le contenu de travail s'articule en une partie de généralités sur l'artémie et les probiotiques, une partie matériel et méthode et enfin une partie de résultats et discussion.

CHAPITRE I :

GÉNÉRALITÉS

I. Généralité sur l'*Artémia* :

I-1 Définition de l'*Artémia* :

Artémia est un genre de crustacés anostracés de distribution cosmopolite, utilisés comme nourriture vivante dans l'aquariophilie et dans la culture larvaire de poissons et de crustacés. Il est formé de sept espèces de reproduction bisexuées, distribuées dans des milieux hypersalins de différents continents et d'un grand groupe de souches parthénogénétiques. (AMAT, 1980)

I-2 Classification :

Règne :Animalia.

Embranchement :Arthropoda.

Sous embranchement :Crustacea.

Classe :Branchiopoda.

Sous classe :Sarsostraca.

Ordre :Anostraca.

Famille: Artemiidae.

Genre :*Artemia*.(LINNAEUS, 1758)



Figure I-1 :*Artémia sp*(ZUBAIRI et al., 2016)

I-3 Morphologie :

L'*Artémia* est un petit crustacé aquatique de forme allongée et dépourvu de carapace; il effectue 15 mues (PROVASOLI ET D'AGOSTINO, 1969). 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.

I-4 Cycle de vie :

Dans les 15 à 20 heures après avoir été placé dans l'eau de mer à 28°C, la coquille se brise et le pré-nauplius apparaît. Pendant les premières heures, l'embryon est suspendu sous la coquille de cyste dans ce qu'on appelle le stade de parapluie. Le pré-nauplius est ensuite

libéré sous forme de nauplius nageant librement appelé un nauplius Instar 1. Environ 12 heures après l'éclosion, il mue dans le second stade larvaire Instar II (TREECE, 2000), puis se développe en juvénile puis pré-adulte (1 à 3 semaines) et adulte (1 à 2 semaines) (LAVENS et SORGELOOS, 1996).

Les femelles développent un type de reproduction ovovivipare. Une fois fécondés par le mâle, si elles sont bisexuelles, ou après la segmentation des œufs non fécondés, si elles sont parthénogénétiques, les femelles permettent le développement embryonnaire de ces œufs à l'intérieur de l'ovisac (AMAT, 1980).

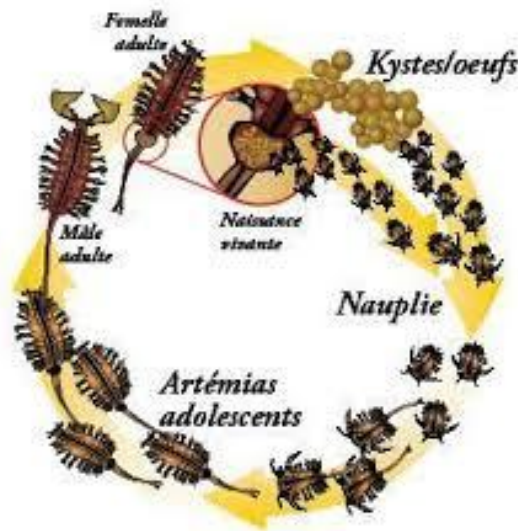


Figure I-2: Cycle de vie d'*Artémia* (SOLO et al,2015).

I-5 Ecologie :

Artémie vit dans des eaux très salées, de lacs et de lagunes, côtières ou continentales, et de marais salants exploités par l'homme pour la production de sel (AMAT, 1980).

Ils sont classés en deux groupes : milieux thalassohalins et athalassohalins suivant la composition ionique :

- Les milieux thalassohalins présenteront une prédominance de chlorure de sodium.
- Les biotopes athalassohalins sont situés à l'intérieur des terres et présentent trois compositions ioniques (sulfates, potassium, carbonates) (PERSOONE et SORGELOOS, 1980 ; Spitchak, 1980).

L'artémie est capable de développer de larges tolérances. Pour certains facteurs comme la température, la salinité, la concentration d'oxygène ou la disponibilité de l'aliment, les intervalles de tolérance sont très larges même au sein de la population (**BOWEN et al.,1985**)

L'Artémia est une espèce eurytherme pouvant vivre dans des milieux à température comprise entre 6°C et 37°C et survivre pendant quelques jours à une température de 40°C (**VOS et TRANSUTAPANIT, 1979**), alors que son optimum de croissance, variable entre les souches, est compris entre 25°C et 30°C (**SORGELOOS, 1980**).

I-6 Cystes :

Le cyste est de 200 à 300 micromètres de diamètre. La couche externe est une coquille dure, brun foncé. Les conditions sèches de l'environnement, provoquent l'enkystement de l'embryon qui entre en état de dormance, ce qui lui permet de supporter le séchage, les températures supérieures à 100°C ou quasi absolu zéro, le rayonnement de haute énergie, et une variété de solvants organiques. Le cyste déshydraté peut être stocké durant des mois ou années sans perte du pouvoir d'éclosion (**TREECE, 2000**).



Figure I-3: Aspect typique des cystes d'*Artémia* traités, déshydratés et prêts à être utilisés en aquaculture (**AMAT, 1980**)

I-7 Nauplii :

Au premier stade larvaire, la larve mesurant environ 400 à 500 µm est caractérisée par une couleur orange brunâtre, un œil nauplien bien visible de couleur rouge dans la partie de la tête, et trois paires d'appendices qui comprennent (**BEZZI et HOUHECH, 2015**) :

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

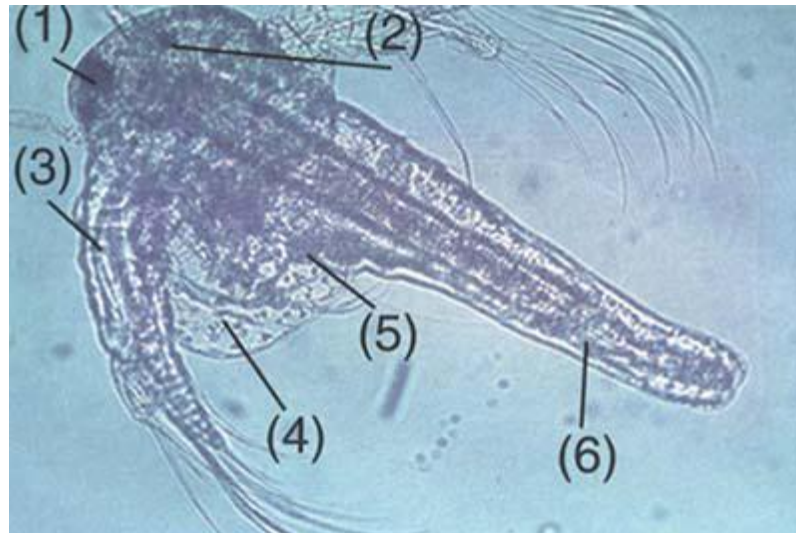


Figure I-4: Larve d'*Artemia* ((1)oeil de nauplius ; (2)oeil complexe latéral ; (3) antenne ; (4)labrum ; (5) bourgeonnement des thoracopods ; (6) région digestive)(VAN STAPPEN, 1996).

I-8 Adulte :

La taille des adultes d'*Artemia* est en général d'environ 8-12 mm, mais peut atteindre jusqu'à 20 mm (SORGeloos et al., 1986). Il comporte trois parties : la tête(1), le thorax(2) et l'abdomen(3) **Figure I-5.** (VAN STAPPEN, 1996)

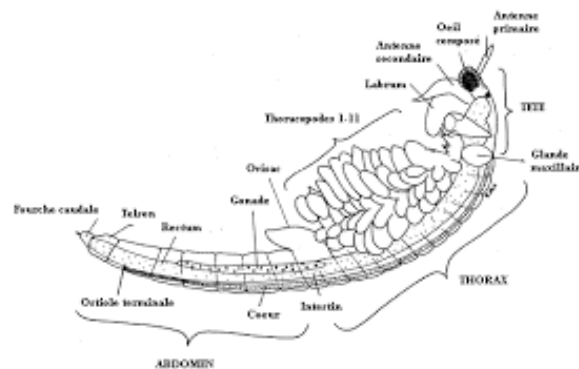


Figure I-5: Morphologie de l'adulte de l'*Artemia*(FOX 2006).

I-9 Alimentation :

L'*Artemia* est typiquement un "filter-feeder" phagotrophe obligé (PROVASOLI et SHIRAISHI, 1959), qui à l'aide de ses antennes et thoracopodes capture les particules alimentaires en suspension.

Le régime alimentaire naturellement est basé sur les nourritures vivantes comme les microalgues par exemple:(Cyanophycées, Chlorophycées), des bactéries halophiles externes et des petits protozoaires (**BEZZI et HOUHECH, 2015**).

I-10 Utilisation en aquaculture :

Dans les cuves de culture larvaire, les rotifères seront progressivement remplacés par les nauplie d'*Artémia*. Cela constituera l'aliment essentiel des larves jusqu'à ce qu'elles aient suffisamment grandi pour commencer à s'alimenter avec des aliments composés d'une taille suffisante pour leur capacité de capture et de déglutition (**AMAT, 1980**).

II. Généralité sur les Probiotiques :

II-1 Définition de probiotique :

Le terme probiotique se compose par deux mots grec (pro c'est pour) et (bio c'est la vie), donc le terme en grec veut dire pour la vie ou bien favorise la vie(**KESARCODI-WATSON et al.,2008**).

Dés 1950, les probiotiques sont considérés comme un supplément organique et inorganique capable de guérir et restaurer la santé, surtout pour les sujets qui souffrent de la malnutrition. Selon Kollath(1953), ces suppléments peuvent être des constituants végétaux comme les vitamines, les enzymes et les substances aromatiques (**LAUZON et al., in aquaculture nutrition, 2014**).

Selon Fuller 1989 « le probiotique est un complément alimentaire microbien vivant qui a un effet positif sur l'animal en améliorant son équilibre intestinal »(**KESARCODI-WATSON et al., 2008**).

De même la FAO/OMS 2002 a défini le probiotique comme :« des microorganismes vivants lorsqu'ils sont en quantités suffisantes, exercent un effet bénéfique sur la santé de l'hôte »(**Hai, 2015**).

Toutes les microorganismes qui ont un effet stimulateur immunitaire, et qui augmentent la résistance contre le stress et les infections, sont considérées comme des probiotiques(**LAUZON et al., in aquaculture nutrition, 2014**).

L'application des probiotiques sur les animaux terrestres et aquatiques est un aspect (approche) pour garantir la qualité nutritionnelle et la sécurité de la santé des animaux d'élevage intensive(LAUZON et al., in **aquaculture nutrition**, 2014).

De plus, cette application pourrait être bénéfique et agir sur l'hôte par(KESARCODI-WATSON et al., 2008) :

- l'inhibition d'un pathogène par la production de composés antagonistes,
- la concurrence pour les sites de fixation,
- la compétition pour les nutriments,
- l'altération de l'activité enzymatique d'agents pathogènes,
- la stimulation immunitaire
- et l'amélioration de la digestibilité. Cet effet est offert par les bactéries attachées au mucus de l'intestin lesquelles présentes l'habitat principal de la flore intestinal et les bactéries transitoires.

Malgré que le probiotique offre plusieurs effets bénéfiques pour la santé, il reste classé parmi les compléments alimentaires fonctionnel sous forme suppléments prophylactiques(KESARCODI-WATSON et al., 2008).

II-2 Définition du probiotique en aquaculture :

Le problème majeur en aquaculture c'est la mortalité des espèces aquatiques à cause des maladies infectieuses bactériennes dues à des agents pathogènes existant dans l'environnement de ces espèces aquatiques. Ces agents pathogènes influencent la balance microbienne intestinale à l'intérieure de l'hôte(HAI, 2015).

Pour ces raison la définition du probiotique a été changée de manière spécifique et sélective appropriée avec les conditions de l'environnement aquatique par plusieurs auteurs comme :

- Moriarty (1998) qui a proposé la définition « additifs microbiens vivants qui favorisent la santé des hydrobiontes et donc augmentent la productivité »(MARTINEZ CRUZ et al., 2012).
- Après un an, Gastesoupe (1999) a considéré le probiotique comme une cellule microbienne qui est administrée de manière à entrer dans la tractus gastro-intestinal et est maintenue en vie dans le but d'améliorer la santé »(LARA-FLORES, 2011.), qui veut dire tout

microorganisme associée au tube digestif de lui offre une amélioration significative au niveau sanitaire et /ou nutritionnelle,

- Verschuer 2000 qui l'a décrit de façon plus détaillé comme « un adjuvant microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte 1)-en modifiant les paramètres associées à l'hôte ou la communauté microbienne ambiante 2)-en garantissant l'amélioration d'utilisation de nourriture ou améliorer sa valeur nutritionnelle 3)-en améliorant la réponse contre la maladie ou par augmentation de la qualité de son environnement ambiant (**VERSCHUERE et al., 2000**).

Irianto et Austin ,2002 : Le « probiotique est un élément ou un microorganisme complet (entier) qui entraine un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (**Kesarcodi-Watson et al., 2008**).

La définition la plus répandue est tout microorganisme vivant, mort ou cellule introduite à l'eau d'élevage et/ou à l'alimentation, qui offre une amélioration au niveau sanitaire et/ou nutritionnelle de l'hôte(**IBRAHEM, 2015**).

II-3 Les caractéristiques des probiotiques :

La sélection des probiotiques se repose sur plusieurs critères (**LAUZON et al., in aquaculture nutrition, 2014**) :

Le probiotique ne doit pas être pathogène, pas seulement vis-à-vis de l'hôte, mais aussi vis-à-vis des animaux aquatiques et le dernier consommateur l'humain.

- ❖ Il doit être exempt de gènes de résistance aux antibiotiques codés par un plasmide
- ❖ Il doit être résistant aux sels biliaires et pH bas.
- ❖ Il doit rester viable dans des conditions de stockage normales et être suffisamment robuste pour survivre aux processus industriels.
- ❖ Il devrait être indigène à l'hôte ou à l'environnement d'élevage.
- ❖ Il devrait pouvoir adhérer et /ou bien se développer dans le mucus intestinal.
- ❖ Il devrait pouvoir coloniser la surface épithéliale intestinale.
- ❖ il devrait afficher des caractéristiques de croissance avantageuses.
- ❖ Il devrait présenter des propriétés antagonistes envers un ou plusieurs agents pathogènes.
- ❖ Il devrait produire des enzymes digestives extracellulaires pertinents.

II-4 Les modes d'action du probiotique :

- **Production de substances inhibitrices :**

Les chercheurs supposent que parmi les mécanismes d'action des probiotiques c'est la sécrétion des inhibiteurs (LAUZON et al., in **aquaculture nutrition, 2014**). Selon les tests d'antagonismes ces inhibiteurs ont été défini comme des substances antivirales et antimicrobiennes, celles-ci pourrait être des antibiotiques, bactériocines, sidérophores, lysozymes, protéases, peroxyde d'hydrogène ou l'acide organique ou bien la combinaison de plusieurs substances (IBRAHEM, 2015).

- **L'interférence du quorum sensing :**

L'interférence par la détection de quorum va éliminer la virulence des agents pathogènes et cette méthode pourrait être appliquée pour augmenter la sensibilité des bactéries (LAUZON et al., in **aquaculture nutrition, 2014**).

- **La compétition sur les sites d'adhésions et la colonisation :**

La compétition sur les sites d'adhésions se fait dans le tube digestif, les chercheurs ont trouvé que la présence d'un probiotique pourrait être préventive à l'association d'autre bactéries pathogènes. L'adhésion se fait par trois étapes : l'attraction, l'association et la fixation sur les cellules du tissu animal. Les chercheurs pensent que les facteurs influençant la colonisation sont des facteurs liés à l'hôte tels que la température de l'individu, le niveau du potentiel redox, la résistance génétique et les facteurs liés aux microbes (IBRAHEM, 2015).

- **Compétition sur les nutriments et les sources d'énergie :**

Les Probiotiques sont capables de concurrencer sur les nutriments, l'énergie et aussi l'oxygène. Cela permet au probiotique de réduire les autres bactéries pathogènes (HAI, 2015).

L'étude de l'effet nutritionnel des probiotiques a été peu abordé par les scientifiques. Parmi les modes d'action de ces derniers on a la production d'acides aminés, de vitamines ainsi que la stimulation d'une bonne activité enzymatique (LAUZON et al., in **aquaculture nutrition, 2014**).

- **Compétition sur le fer :**

Les sidérophores sont des chélateurs de fer ayant la capacité d'absorber le fer de l'environnement, certaines bactéries ont besoin du fer pour leur puissance et leur croissance, donc la production de sidérophores assure le succès de la compétition du fer (IBRAHEM, 2015).

- **Stimulation de la réponse immunitaire :**

D'après les scientifiques les probiotiques peuvent stimuler les réactions immunologiques tel que les phagocytes mononuclées, les leucocytes et les cellules NK ; augmenter le taux de lysozyme et moduler la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine-1(IL-1),IL-6, IL-12 , facteur de nécrose tumorale a (TNF-a), et l'interféron gamma (IFN-c) et cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le facteur de croissance transformant b (TGF-b) chez beaucoup d'animaux aquatiques(IBRAHEM, 2015).

II-5 L'importance du probiotique dans l'aquaculture :

L'application des probiotiques dans le domaine de l'aquaculture :

- **Amélioration de la qualité de l'eau**

Les concentrations élevées des composés azotés dans l'élevage causent des problèmes majeurs sur les systèmes d'élevages tels que la mortalité massive. Des études ont montré que les grams positifs tels que *Lactobacillus* et *Bacillus*, ont la capacité d'éliminer ces substances nocives mieux que les grams négatifs(TAIYE MICHAEL et al., 2014).

- **Promoteurs de croissance :**

Plusieurs études et recherches ont montré que les probiotiques ont la capacité d'améliorer la croissance des animaux d'élevages aquatiques(TAIYE MICHAEL et al., 2014).

○ Prévention des maladies :

Le probiotique secrète des substances inhibiteurs contre d'autres bactéries pathogènes de l'hôte, et peut stimuler le système immunitaire afin d'augmenter la résistance à la maladie infectieuse et virale(TAIYE MICHAEL et al., 2014).

○ Optimisation de la digestion :

Les chercheurs ont indiqué que les probiotiques facilitent la digestibilité due à la présence des acides gras, vitamines, ainsi l'activité des protéines et la cellulose(TAIYE MICHAEL et al., 2014).

○ Amélioration de la réponse immunitaire :

L'application de probiotique offre à l'hôte un effet bénéfique sur la modulation du système immunitaire par l'optimisation de la réponse immunitaire cellulaire et humorale(VERMA et GUPTA, 2015).

II-6 L'application des probiotiques chez les poissons :

L'augmentation du taux de mortalité dans l'élevage des poissons est due aux maladies infectieuses causées par la présence des *Vibrio*, *Aeromonas*... Ce qui a incité les aquaculteurs d'appliquer les probiotiques afin d'optimiser les rendements de la production, favoriser une protection contre les agents pathogènes pour le produit et le consommateur et améliorer la qualité des poissons élevés.

Différente sélections faites des probiotiques ont été appliquées chez différentes espèces de poissons. La majorité des probiotiques appliquées ont présenté un effet bénéfique chez l'hôte (voir **tableau I-1**).

Tableau I-1: exemple de souches probiotiques appliquées dans le domaine de l'aquaculture.

Souche probiotique	Poisson	L'effet observé	Référence
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Morue atlantique	Diminuer le taux des bactéries opportunistes	(JAHANGIRI et ESTEBAN, 2018).
<i>Vibriopelaguis</i>	Turbot	influence la flore bactérienne Augmenter le taux de survie	(JAHANGIRI et ESTEBAN, 2018).

<i>Enterococcus faecium</i>	Tilapia	L'optimisation du poids final par rapport au control.	(JAHANGIRI et ESTEBAN, 2018).
<i>Lactobacillus rhamonas</i>	Truite	baisser le taux de mortalité.	(MANOPPO et al., 2019).
<i>Lactobacillus.sp (isolé à partir poisson-chat)</i>	Carpe	Amélioration dans la croissance et l'efficacité alimentaire.	(HE et al., 2017).
<i>Lactobacillus sp</i>	Poisson-zèbre	Favorise la protection contre les agents pathogènes.	(FRANCESCO LOMBARDO, 2011).
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Poisson-zèbre	L'optimisation de la reproduction par augmentation significative des gonadosmatique et le nombre total des ovules ovulés.	(AFRILASARI et al., 2016).
<i>Bacillus megaterium</i>	Poisson-chat	Augmenter l'activité enzymatique digestive et la croissance.	(SAYES et al., 2018)
<i>Vibrio lentus</i>	Dicentrarchus labrax	Favorise la protection contre la pathogénicité.	(SAYES et al., 2018)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Oncorhynchus mykiss	La stimulation du système immunitaire et favoriser la protection contre les	(SAYES et al., 2018)

<i>Pseudoalteromonas.sp</i>	Seriola landi	infections. Augmenter le taux de survie.	(Leyton et al., 2017).
<i>Bacillus subtilis</i>	Anguilla japonica	Amélioration du poids +efficacité alimentaire.	(Lee et al., 2017).

II-7 L'application des probiotiques chez les crustacés (CASTEX et al., in aquaculture nutrition, 2014).

L'élevage des crustacés a plusieurs problèmes qui influencent le rendement de production chaque année, donc il fallait des innovations pour éviter ces problèmes comme les maladies infectieuses et parmi ces innovations l'application des probiotiques chez les crustacés.

Les microorganismes utilisés comme des probiotiques se sont deux groupes différents : les *firmicutes* qui regroupe les gram-positif ex : *Bacillus* , *Lactobacillus* , *Lactococcus*.... ,et les *gammaproteobacteria* qui regroupe les gram-négatif ex : *Vibrio sp*, *Pseudomonas sp*.

La sélection des espèces de *Bacillus* testées comme probiotiques dans la culture des crevettes ayant des activités antimicrobiennes contre la pathogénicité du *Vibrio sp*, cette sélection est basée sur les tests d'antagonisme (in vitro). Cette espèce saprophytique à gram-positif à la capacité de former des spores ce qui lui permet d'être dans différents milieux (l'eau, l'air, les sédiments, sol et la poussière). Cette souche se trouve également, dans l'intestin des crustacés grâce à leur existence dans la nourriture.

La caractérisation de ce genre par la technique moléculaire a supposé que ce genre est soit un composant secondaire dans le tube digestif soit c'est un passager (population transitoire).

Moriarty(1998) a considéré l'utilisation de *Bacillus* à la place des antibiotiques est une démarche pour améliorer la production des crevettes grâce à leurs nature de produire différents antibiotiques, de sécréter plusieurs enzymes, de concurrencer la nourriture et les sites d'adhésion pour inhiber plusieurs bactéries ainsi la présence des spores peut permettre le passage de la barrière gastrique, offre une meilleure stabilité durant la digestion et augmente la

durée de conservation et de stockage. Un effet de *Bacillus subtilis* contre *Vibrio harveyi* dans l'élevage de la crevette a été rapporté. Les résultats des travaux ont indiqué que cette souche probiotique a aussi l'avantage d'améliorer significativement le taux de survie et la croissance.

Une étude comparative a été faite entre les fermes aquacoles des crevettes en philippine, ils ont conclu que l'addition de différents *Bacillus spp* dans l'eau d'élevage de concentration de 10^4 à 10^5 UFC/g a élargi la durée de vie de la crevette de 80 à 160 jrs sans infection par la maladie lumineuse du *Vibrio*.

II-8 Probiotiques chez l'artémie :

VERSCHUERE(2000) a sélectionné plusieurs souches à potentiel probiotique dans l'élevage d'*Artémia sp*. Ils ont montré un bon résultat/ un effet positif tel que la croissance, la survie et la protection contre la pathogénicité.

MAHDHI (2010) a montré un effet bénéfique et positif de l'application du *Candida utilis* chez l'artémie, cette souche a présenté une source d'alimentation dans l'élevage d'artémia et offre une protection contre les agents pathogènes.

Il a également, montré le pouvoir probiotique de la souche *Bacillus* dans un élevage d'artémie qui améliore le taux de survie des artémies à la présence de *Vibrio*(**MAHDHI et al., 2011**).

CHAPITRE II

MATÉRIEL ET MÉTHODES

II- Matériels et Méthodes :

Le but de notre présent travail est d'appliquer, dans un élevage d'*Artemia sp.* 12 souches à potentiel probiotique isolées de l'environnement et testées *in vitro* par nos encadreurs à l'ENSSMAL. Trois types d'applications ont été testés.

Tableau II-1 : Les noms des souches probiotiques.

Souches probiotiques	Signe
<i>Enterococcus durans</i>	8'
<i>Enterococcus durans</i>	S10
<i>Psychrobacter cibarius</i>	S'2
<i>Enterococcus faecium</i>	S1
<i>Enterococcus faecium</i>	S2
<i>Enterococcus faecium</i>	S6
<i>Enterococcus faecium</i>	S7
<i>Enterococcus faecium</i>	S'10
<i>Enterococcus faecium</i>	S18
<i>Enterococcus faecium</i>	S19
<i>Enterococcus faecium</i>	S33
<i>Enterococcus faecium</i>	3

II-1- L'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'Efficacité d'éclosion des cystes d'*Artemia* et de la qualité microbiologique du milieu.

II- 1-1- Préparation de la suspension probiotique

A partir d'une culture jeune de 18 h de chaque souche probiotique, inoculée dans un volume de 50ml de MRS bouillon et incubé à 37°C, récupérer les cellules bactériennes par une centrifugation à 2000 tr/min pendant 10 min. Le culot subira deux lavages par l'eau d'élevage filtrée et stérile préparée au préalable. Une suspension bactérienne ajustée à une densité

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

optique de 0.8 (10^8 UFC/ml) à une longueur d'onde de 540 nm, sera préparée dans l'eau d'élevage stérile destiné à l'éclosion des cystes artémies (JATOBA et al., 2008).



Figure II-1 : Artémia commerciale

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

100 cystes hydratés au préalable ont été récupérés et comptés à l'aide d'une seringue stérile et sous une loupe binoculaire (PERSON LE RUYET, 1975), puis additionnés à 10 ml de l'eau d'élevage inoculée par les souches probiotique préparée comme décrit précédemment. Les tubes sont incubés pendant 24h dans des conditions microbiologiques stérile et un environnement contrôlé ($T^{\circ}=28^{\circ}\text{C}$, $S=37\text{g/L}$, $\text{pH}=8$, 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 (l'eau d'élevage filtré et stérile sans souche probiotique). Après 24h d'incubation, on a déterminé l'efficacité d'éclosion des cystes ainsi que la qualité microbiologique des eaux d'élevage (figure III-1).

II-1-3- détermination de l'efficacité d'éclosion :

Après une bonne homogénéisation de la colonne d'eau du tube, on prélève, à l'aide d'une micropipette, un volume de 0.25ml de chaque tube qui sera utilisé pour le comptage des

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

nauplii sous microscope optique ($G \times 4$) (BRUGGMAN et al., 1980) Le calcul de l'efficacité d'éclosion (EE) a été réalisé selon la formule suivante :

$$EE = (N \times V) / (v \times C)$$

Où :

N : nombre de nauplius observé

V : volume d'incubation

v : volume de l'échantillon prélevé pour le comptage = 0.25ml

C : quantité des cystes incubés (g)

II-1-4- Détermination de la qualité microbiologique de l'eau d'élevage après éclosion

Après éclosion des cystes, placer 1ml de chaque solution mère (milieu d'élevage additionnée ou non par une souche probiotique) dans des tubes de 9ml d'eau physiologique stérile pour l'obtention d'une dilution de 10^{-1} , puis répéter l'opération jusqu'à atteindre la dilution 10^{-6} .

Un volume de 0.1ml de chaque solution mère et dilution sera ensemencé sur une boîte de gélose de Mac conckey et incubé à 37°C pendant 48h, dans le but de dénombrer les bactéries à Gram négatif et sur les boîtes de gélose de TCBS incubée à 22°C pendant 48h à 72h pour le dénombrement des *Vibrio* et germes apparentés (VILLAMIL et al, 2003).

Après le dénombrement sur les deux milieux de culture, les colonies dominantes ont été sélectionnées visuellement à la base de leur apparence et leur abondance. Elles ont été purifiées et conservées. Quelques une d'entres elles ont été identifiées par coloration de Gram et quelques tests biochimiques (oxydase, catalase, et galerie API 20E).



Figure II-2 : L'ensemencement de l'eau d'élevage d'*Artémia.sp* après l'éclosion sur Mac conkey et TCBS

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II-1-5- Tests d'identification

II-1-5-1- Coloration de Gram



La coloration de Gram est une coloration différentielle du cytoplasme basée sur les caractéristiques de la paroi bactérienne. Elle permet de différencier les bactéries Gram positif des bactéries à Gram négatif.

Mode opératoire :

- Réaliser un frottis et le fixer à la flamme.
- Verser le violet de Gentiane sur la lame ; laisser en contact 1min.
- Fixer le colorant par le lugol environ 1min.
- Jeter le lugol et faire couler de l'alcool sur la préparation ; laisser agir 30s et rincer immédiatement à l'eau.
- Recouvrir la préparation de fushine, laisser agir environ 1min puis laver abondamment à l'eau.
- Sécher au-dessus de la flamme d'un bec bunsen.

Lecture :

A l'issue d'une observation au microscope optique, on peut distinguer :

-  Des bactéries à Gram positif colorée en violet foncé.
-  Des bactéries à Gram négatif colorée en rose.

II-1-5-2-Test d'oxydase

Le test oxydase consiste à mettre en évidence la présence du cytochrome oxydase.

Mode opératoire :

- Imbiber le disque d'oxydase par l'eau distillée.
- Prendre à l'aide d'une pipette Pasteur une colonie isolée et la déposer sur le disque.

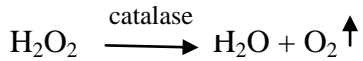
Lecture :

Apparition d'une coloration violette au point de contact, soit immédiatement soit après quelques secondes. Ce résultat révèle la présence du cytochrome oxydase.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II-1-5-3-Test de la catalase :

Pour la cellule, le H₂O₂ est considérée comme molécule hautement réactive et potentiellement nocive. L'enzyme catalase transforme le H₂O₂ en deux molécules eau et oxygène comme la réaction suivante :



Mode opératoire :

- Déposer sur une lame stérile une goutte d'eau oxygénée (H₂O₂).
- Prélever une colonie bien isolée à l'aide de l'anse stérile.
- Dissocier la colonie dans la goutte.

Lecture :

- ✚ Catalase positif : apparition des bulles d'air.
- ✚ Catalase négatif : pas de bulles d'air.

II-1-5-4- Identification par système Galerie API20E

C'est un système de 20 tests miniaturisés et déshydratés, prêt à l'emploi permettant de réaliser 20 tests biochimiques afin d'identifier les entérobactéries en particuliers et les autres bactéries à gram négatif.

Mode opératoire

- Mélanger une seule colonie avec 5ml d'eau distillée stérile.
- Introduire la suspension bactérienne dans chaque tube à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, pointe appuyée à l'intérieur et sur le coté pour éviter la formation de bulles.

Pour certains caractères :

Remplir de suspension le tube et la cupule (CIT, VP, GEL)

Remplir le tube de suspension et le recouvrir par l'huile de paraffine (ADH, LDC, ODC, H₂S, URE)

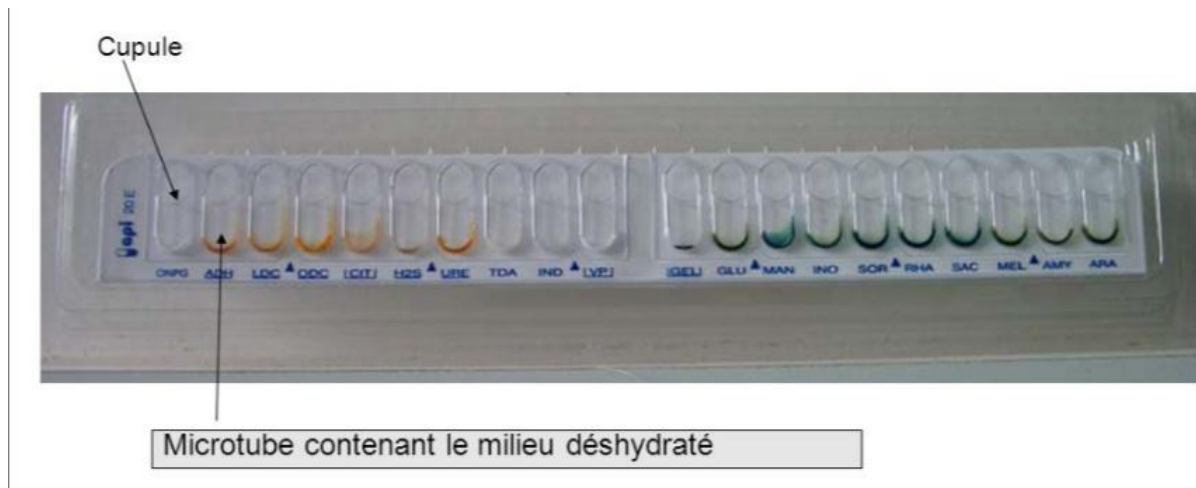


Figure II-3 : Galerie API 20 E

Lecture

La lecture de la galerie API20E se fait après une incubation de 18 à 24h à 37°C avec ou sans ajout de réactifs nécessaires (selon le test). Cette lecture se fait par un codage qui repose sur les tests groupés en trois successivement de gauche à droite, les tests négatifs sont codés 0 et les tests positifs varient selon la position de chaque test entre les trois : 1 pour le premier test, 2 pour le deuxième test et 3 pour le troisième test ; après le codage on fait la somme de tous les tests groupés formant un code de 7 chiffres qui peut se lire sur une base de donnée ou un catalogue qui le déchiffre en une bactérie spécifique.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

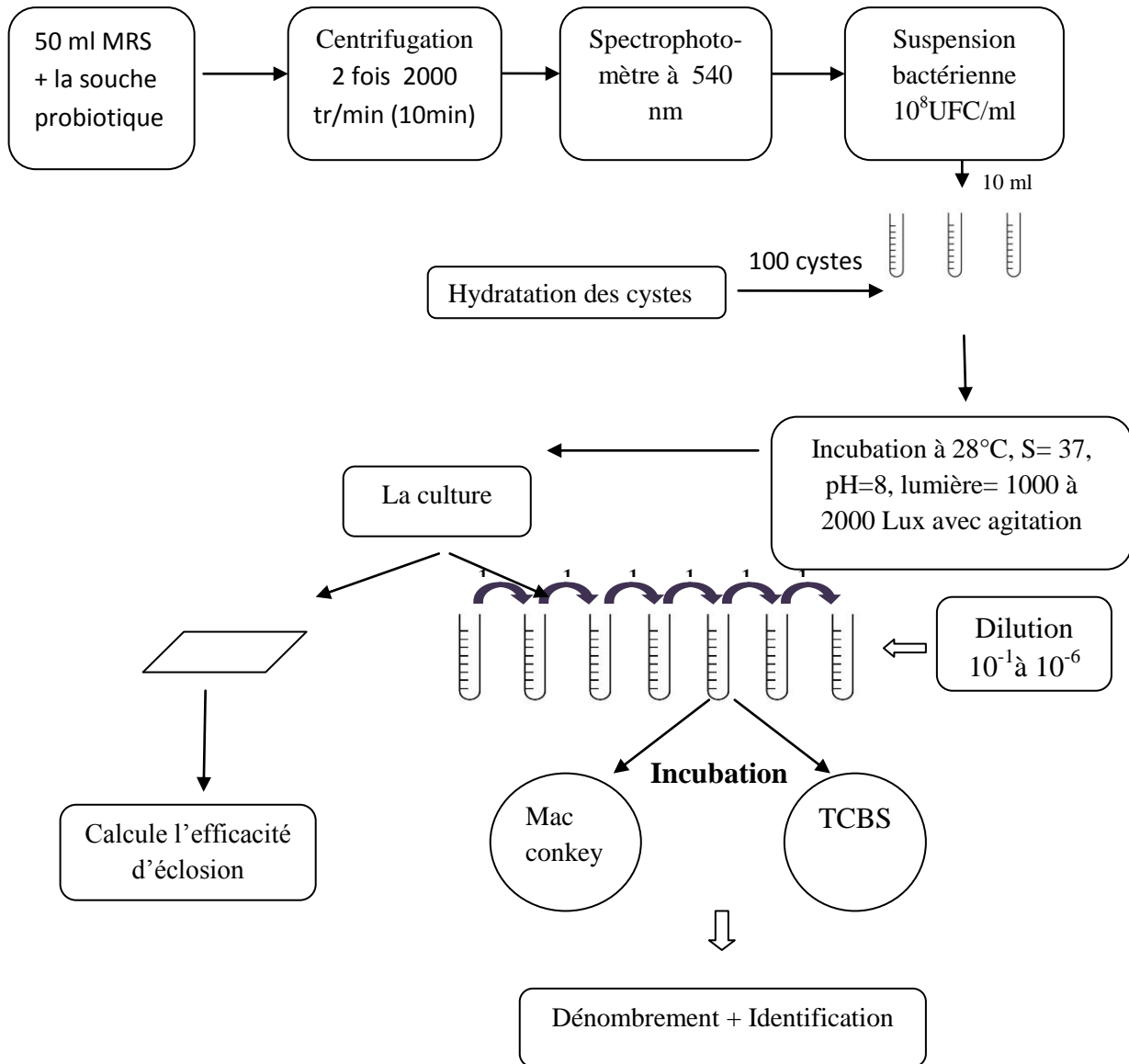


Figure II-4 : Schéma générale résumé de l'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'efficacité d'éclosion des cystes d'*Artémia* et de la qualité microbiologique du milieu.

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II-2- Application de souches probiotiques dans la culture d'*Artémia* afin d'améliorer le taux de croissance et le taux de survie des nauplius

Cette application a concerné 3 souches potentiellement probiotiques

II-2-1- Obtention des nauplii par hydratation des cystes et préparation de l'élevage

L'obtention des nauplius se fait par l'hydratation et l'incubation des cystes d'artémies pendant 24h, de l'ordre de 01 g par 400 ml d'eau de culture filtrée de salinité à 37g/L Le flacon est soumis à un bullage important (0.2 bar), un éclairage artificiel et une température de 28°C. (PERSON-LE RUYET., 1975).

Après 27 heures, l'aération sera stoppée pendant 15min afin de séparer les cystes non éclos qui s'installe au fond du flacon, les nauplii qui se positionnent au milieu de la bouteille et les coques vides qui remontent en surface. Par la suite, les nauplius fraîchement éclos seront récupérer par aspiration au milieu de la bouteille d'élevage.



Figure II-5 : Préparation des bouteilles d'élevages

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

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

Pour l'estimation de la charge des nauplii, sous une loupe binoculaire le comptage du 01ml d'échantillon de nauplii est déposé sur une boîte de Pétri quadrillée et fixés par le lugol cette dernière a été répétée 10fois.

II-2-3-L'application des souches S33, S'2 et 8' dans l'alimentation des nauplii d'*Artémia*

Les nauplii d'artémie sont alimentés par la micro-algue *Spirulina* ou *Chlorella* additionnée ou non par les souches probiotiques. Chaque bouteille d'élevage de 400ml reçoit 4000 individus de nauplius (PERSON-LE RUYET., 1975), chaque bouteille sera alimentée différemment, et chaque expérience sera menée en triplicata, le taux de nourrissage journalier est indiqué dans le **tableau II-2.**

Lot témoin 1 : alimenté par la Spiruline

Lot témoin 2 : alimenté par la Chlorelle

Lot expérimental 1.1 : alimenté par la souche probiotique S33 intégrée à la Spiruline.

Lot expérimental 1.2 : alimenté par la souche probiotique 8' intégré à la Spiruline.

Lot expérimental 1.3: alimenté par la souche probiotique S'2 intégré à la Spiruline.

Lot expérimental 2.1 : alimenté par la souche probiotique S33 intégrée à la Chlorelle.

Lot expérimental 2.2: alimenté par la souche probiotique 8' intégrée à la Chlorelle.

Lot expérimental 2.3: alimenté par la souche probiotique S'2 intégrée à la Chlorelle.

Tableau II-2 : Le taux de nourrissage journalier des nauplius d'après (PERSON-LE RUYET., 1975)

Le jour	Le taux de nourrissage en mg /10000 Nauplius(PERSON-LE RUYET., 1975)	Le taux de nourrissage en mg /4000 Nauplius(cette étude)
J2	400 mg	160mg
J4	1800 mg	720 mg
J6	4300 mg	1720 mg

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II-2-4-Détermination du taux de croissance par la mensuration (SORGELLOOS et al., 1979) :

Un prélèvement journalier de 10 individus de chaque bouteille d'élevage va s'effectuer par hasard afin d'évaluer leur développement. Entre lame et lamelle les nauplii seront fixés par le lugol, puis on détermine la taille des indicateurs de croissance TL, TF et TA, à l'aide d'un microscope photonique avec un oculaire munit d'une règle de mesure.

TL : mesure de la taille tête-thorax –abdomen–queue.

TF : mesure de la taille tête- thorax-abdomen.

TA : mesure de la taille à partir de l'extrémité d'appendice gauche à l'extrémité de l'appendice droite de l'abdomen.

II-2-5-Taux de survie :

Le taux de survie est un paramètre qui indique le nombre des nauplii survivants (le nombre des nauplii survivants dans un ml d'eau d'élevage / le nombre total de démarrage par ml d'eau). Il est estimé par un comptage de nombre des individus survivants par ml d'eau d'élevage chaque jour, à l'aide d'une loupe binoculaire.

Tableau II-3 : Le programme hebdomadaire pour le suivi d'élevage de chaque bouteille

Jours	Le suivi journalier
01	<ul style="list-style-type: none">• Hydratation et obtention des nauplii
02	<ul style="list-style-type: none">• la préparation d'élevage d'<i>Artemia sp.</i>• Ajout de l'alimentation additionnée ou non de bactérie selon le taux de nourrissage• Mensuration et détermination du taux de croissance.
3,5 et 8	<ul style="list-style-type: none">• mensuration du taux de croissance et le taux de survie
4 et 6	<ul style="list-style-type: none">• Ajout de l'alimentation additionnée ou non de bactérie selon le taux de nourrissage• mensuration du taux de croissance et le taux de survie

II-3 Les analyses statistiques :

Tous les tests statistiques ont été réalisés par le test t (Student) à une voie (XLSTAT Launcher) afin d'estimer les effets significatifs ou non des souches probiotiques sur l'efficacité d'éclosion et les trois paramètres de croissance mesurés (TL, TA et TF) des Artémies. Les effets des souches ont été considérés à un niveau de signification de $p < 0,05$.

CHAPITRE III
RÉSULTATS ET DISCUSSION

III-1- Résultats de l'application des souches probiotiques pour l'amélioration de l'efficacité d'éclosion des cystes d'artémie et l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux d'élevages

III-1-1- Effet sur l'efficacité d'éclosion (EE)

L'efficacité d'éclosion est déterminée en présence et en absence de souches à potentiel probiotique. Les résultats sont présentés dans la **figure III-1**.

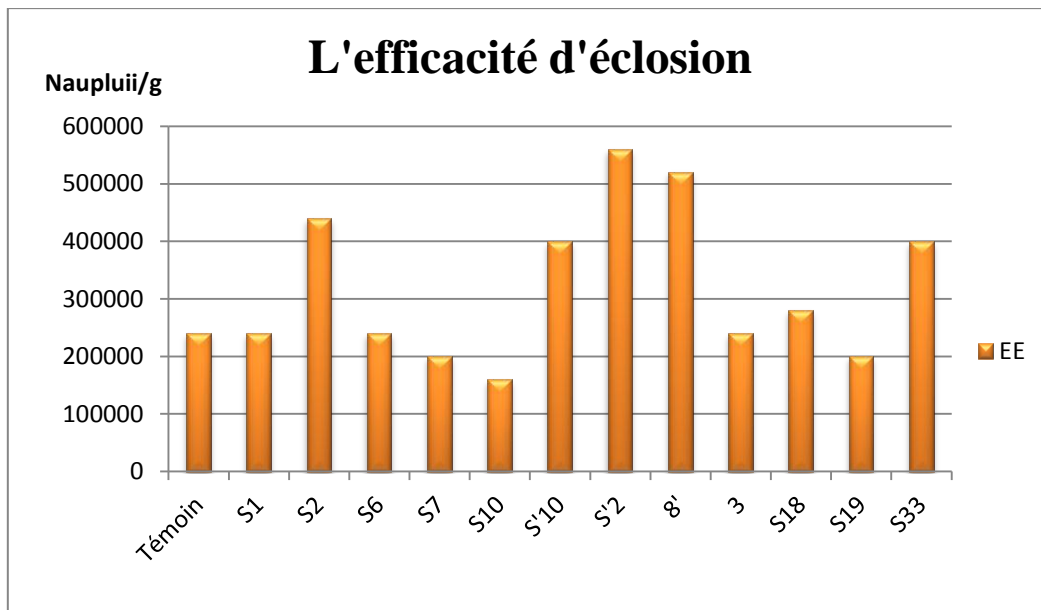


Figure III-1: Efficacité d'éclosion des cystes d'artémie en présence et en absence de souches à potentiel probiotique dans le milieu d'élevage.

L'application des douze souches probiotiques dans les eaux d'élevage a influencé l'efficacité d'éclosion des cystes. Les résultats de la **figure III-1** révèlent que les souches (S'2, 8', S2, S'10, S33 et S18) ont amélioré l'efficacité d'éclosion des cystes d'une valeur de 240000 (témoin), à une valeur de 560006, 520005, 440004, 400004, 400004 et 280003 nauplius/g, respectivement. Cette augmentation n'est significative que pour les souches S'2 et 8' ($p < 0.05$) (voir tableau 33 et 34). Cependant, l'application des souches S7, S19 et S10 semblent influencer négativement l'efficacité d'éclosion avec des valeurs de 200002, 200002 et 160002 respectivement, cet effet est statistiquement non significatif. L'application des souches S1, S6 et S3 semble ne pas avoir d'influence sur l'efficacité d'éclosion.

Cette amélioration de l'efficacité d'éclosion pourrait être due à des substances excrétées par les souches probiotiques ayant la capacité d'éclater le chorion des cystes. Ou à des bactéries capables de consommer les composants du chorion et/ou la transformer à d'autres molécules par exemple *Stenotrophomonas maltophilia* qui possède une activité chitinolytique qui lui permet de dégrader la chitine (SALAS-OVILLA et al, 2018), un composant parmi les trois composants de chorion.

III-1-2- Effet sur la qualité microbiologique du milieu d'élevage après éclosion :

Les cystes d'artémie contiennent une flore associée qui se retrouvera dans le milieu d'élevage et par conséquent chez le poisson. Cette flore microbienne peut être pathogène dans certains cas. Dans notre étude, nous avons essayé d'évaluer la qualité du milieu d'élevage après éclosion en présence des différentes souches probiotiques. Nous avons suivi la charge des bactéries à Gram négatif et nous avons recherché la présence de *Vibrio*.

Suivi de la charge et qualité des bactéries à Gram négatif

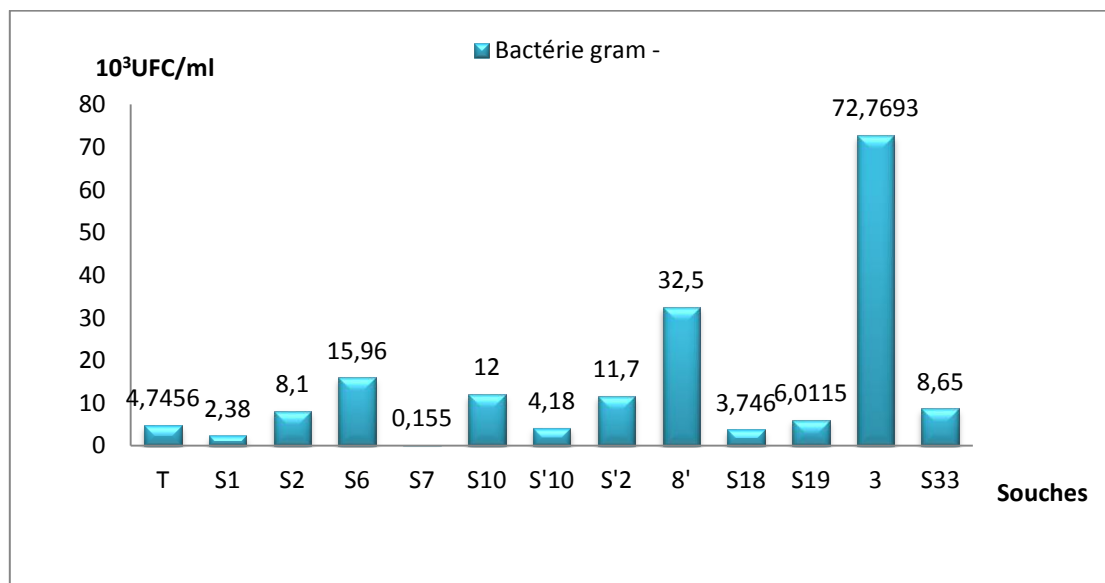


Figure III-2 : Dénombrement des bactéries à Gram négatif sur gélose Mac conkey, dans le milieu d'élevage d'artémie en présence des différentes souches à potentiel probiotique.

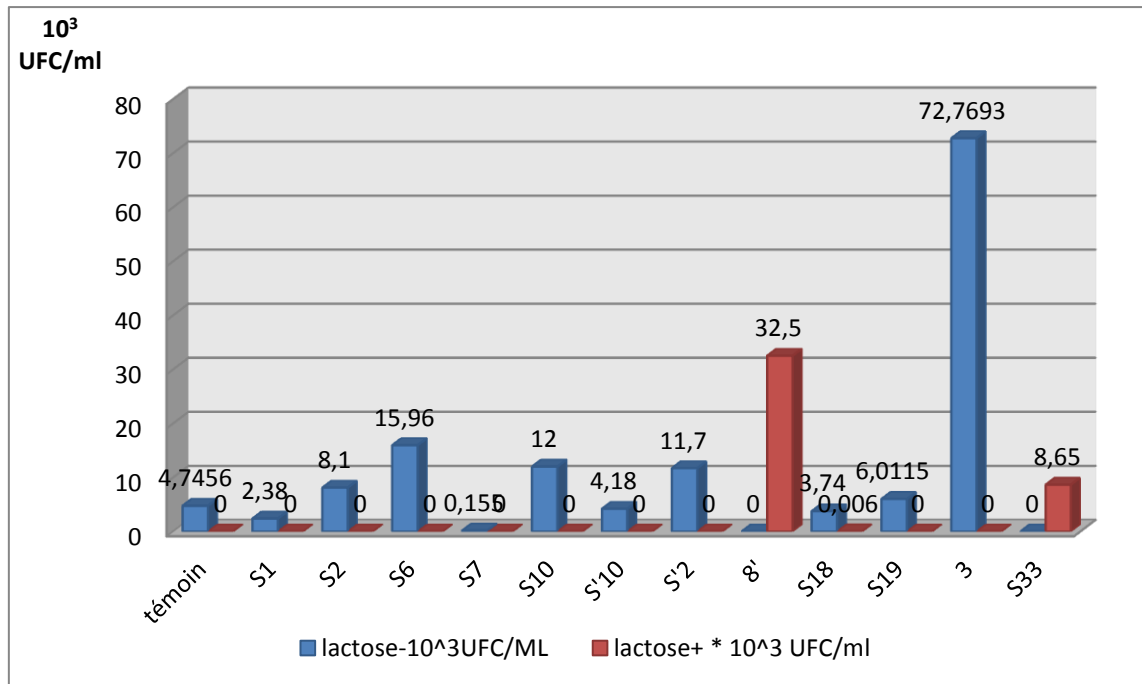


Figure III-3 : Dénombrement des bactéries à lactose positif et les bactéries lactose négatif sur gélose Maconkey, dans le milieu d'élevage d'artémie en présence des différentes souches à potentiel probiotique.

Les résultats obtenus ont montré que chaque souche module différemment le développement et la croissance des bactéries à Gram négatif associées aux cystes d'artémies. Les résultats sont représentés dans **les figures III-2, III-3 et le tableau III-1.**

Une charge d'environ $4.75 \cdot 10^3$ UFC/ml a été retrouvée chez le témoin. Elle est représentée principalement par les bactéries à Gram négatif lactose négatif. L'identification de ces bactéries a révélé la prédominance de *P. aeruginosa* qui est un germe associé au cystes qui peut être pathogène pour le poisson, les crustacés (OZTURK et al., 2014), et sur l'*Artémia* (LEE et al., 2014). Comme il peut être bénéfique en favorisant une meilleure digestibilité et une croissance rapide des artémies durant les premiers jours (GOROSPE et al., 1996).

Le nombre des bactéries à Gram négatif varie en fonction des souches probiotiques appliquées. Il augmente dans le cas des souches S6, S'2, 8', S19, S2, S10 et S33 avec la charge la plus élevée de 72.7693 UFC/ml pour la souche 3. Nous avons également noté une baisse de la charge lors de l'application des souches S7, S1 et S18. S'10 semble présentée le même nombre de bactérie à Gram négatif que le témoin.

La composition des bactéries à Gram négatif est représentée dans tous les cas par des bactéries lactose négatif identifiées en tant que *P. aeruginosa*, à l'exception de 8' et S33 où

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

les Gram négatif présents sont des coliformes (lactose positif) et sont assignés à l'espèce *Enterobacter cloacae*. Le milieu d'élevage en présence de la souche S18 a permis la co-existence de *P. aeruginosa* et *E.cloacae*.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III-1: Résultats d'identification et dénombrement les colonies isolées sur Mac conkey.

La souche probiotique	Aspect des colonies isolées	Coloration de gram	Test de catalase	Test d'oxydase	Identification de la souche API20E	La charge bactérienne en UFC/ml 10^3
Témoin négatif	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.7456
S1	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.380
S2	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.100
S6	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15.960
S7	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.155
S10	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
S'10	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4.180
S'2	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11.700
8'	Rose foncée Claire Rose claire + un halo jaune	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	32.500
S18	Rose claire Rose foncée	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	3.740 0.006
S19	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6.0115
3	Rose claire	Bacille gram-	+	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	72.7693
S33	Rose foncée Rose claire +halo transparent	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	8.650

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

➤ Suivi des bactéries sur TCBS

Parmi la flore la plus associée à l'artémie nous retrouvons l'espèce *Vibrio* qui fait partie de la flore commensale de l'artémie et peu causé des maladies chez le poisson. Nous avons tenté de suivre l'effet des souches sur ce genre bactérien sur milieu TCBS. Les résultats ont révélé l'absence du genre *Vibrio* dans le témoin ainsi que lors de l'application de toutes les souches. Cependant, nous avons pu suivre la variété des espèces qui poussent sur TCBS.

Pour le témoin, nous avons mis en évidence la présence de 2 espèces *Pasteurella pneumotropica* avec une charge de 8UFC/ml et *Enterobacter cloacae*(5.5UFC/ml). L'application des souches probiotiques a montré la présence de trois espèces : *Pasteurella pneumotropica*, *Enterobactercloacae* et *Stenotrophomona smaltophilia* lors de l'application des souches : S2 et 3 ; Deux espèces comme le témoin *Pasteurella pneumotropica* et *Enterobacter cloacae* lors de l'application des souches S6, S10, S18 et S19. , *Enterobacter cloacae* et *Stenotrophomonas maltophilia* lors de l'application de la souche S'8. Une seule espèce prédominante à savoir *Pasteurella pneumotropica* lors de l'application des souches S1, S'10 et S'2 et *Enterobacter cloacae* lors de l'application des souches S7, S33 (**Tableau III-2**).

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau III-2: Résultats d'identification et dénombrement les colonies isolées sur TCBS.

La souche probiotique	Aspect des colonies isolées	Coloration de gram	Test de catalase	Test d'oxydase	Identification de la souche API20E	La charge bactérienne en UFC/ml 10^3
Témoin négatif	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.008
	Jaune verte		+		<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0055
S1	verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.017
S2	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	3.9
	Jaune verte		+		<i>Enterobacter cloacae</i>	Indénombrable
	Jaune		-		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Indénombrable
S6	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Indénombrable
	Jaune verte				<i>Enterobacter cloacae</i>	0.013
S7	Jaune verte	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.0525
S10	Jaune verte	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.013
	Verte				<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Indénombrable
S'10	Verte	-Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.056
S'2	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.032
8'	Jaune verte	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	0.56
	Jaune		-		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.186
S18	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.018
	Jaune verte				<i>Enterobacter cloacae</i>	0.028
S19	Verte	Bacille gram-	-	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.1535
	Jaune verte		+		<i>Enterobacter cloacae</i>	0.023
3	Verte	Bacille gram-	+	-	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0.12
	Jaune		-		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0.01
	Jaune verte		+		<i>Enterobacter cloacae</i>	0.03
S33	Jaune verte	Bacille gram-	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	Indénombrable

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

D'après les résultats obtenus sur Mac conkey et TCBS nous constatons la présence de l'espèce :

- *Enterobacter cloacae* :

un germe considéré parmi les bactéries associées à la flore des poissons mais il peut causer des infections et des maladies chez l'homme à partir une transmission pendant la consommation(PELLI, 2017) et il a été responsable d'un taux de mortalité dans les élevages de poissons exemple l'élevage de *Pangasianodon hypophthalmas*(KUMAR et al., 2013) et chez *Mugil cephalus*(THILLAISEKAR et al., 2008).

Les trois souches probiotiques S1, S'10 et S'2 inhibent complètement la souche *Enterobacter cloacae*. Celles-ci pourraient être appliquées dans l'élevage de *Pangasianodon hypophthalmas* et *Mugil cephalus*, afin de diminuer le taux de mortalité chez ces espèces. Récemment, il a été rapporté le potentiel probiotique d'*E. cloacae* et qu'il peut être utilisé pour prévenir les infections à *Pleisiomonas shigelloides* dans l'eau d'élevage des poissons d'ornement (GIRIJAKUMARI et al, 2018)

- *Stenotrophomonas maltophilia* :

Un bacille à gram négatif, mobile, aérobic et non fermentaire (ADEGOKE et al., 2017), retrouvé lors de l'application des souches S2, 8' et 3. C'est un germe de l'environnement qui peut être responsable de maladies infectieuses chez l'homme et les poissons due à la présence de protéases, lipases et hémolysines (XU et al., 2018). Il a été retrouvé dans la flore associée à l'artémie en Algérie (SOLTANI, 2017). Leur effet reste mal connu chez l'artémie. Cependant, il a été démontré qu'elle possède une activité chitinolytique par la production de chitinase, qui pourrait favoriser l'éclosion (SALAS-OVILLA et al, 2018). REINA et al., (2019) ont démontré le rôle de certaines *Stenotrophomonas maltophilia* isolées à partir d'invertébrés marins dans l'atténuation de la virulence de *Vibrio coralliilyticus* sur *Artémia salina*.

- *Pasteurella pneumotropica*

C'est une bactérie à Gram négatif en forme de bâtonnet considéré comme un agent pathogène opportuniste chez les rongeurs de laboratoire (MANNING, DIGIACOMO et DELONG, 1989). Elle a également été retrouvée dans la flore bactérienne associée à l'Artémie dans la phase de commercialisation (REDONDO et al., 2008) et dans les produits de la mer (IBRAHIM et al.,2016). Dans notre étude, S7, S33 et 8' semblent inhiber complètement la souche de *Pasteurella pneumotropica*. Elles pourraient être appliquées dans l'élevage des poissons, afin de diminuer le taux de risque.

III-2- Résultats de l'application des souches probiotiques dans l'alimentation de l'artémie

III-2-1- Effet des souches probiotiques sur le développement de la taille des artémies (TL, TA et TF).

La croissance des artémies pour être estimée en mesurant les différents paramètres de mensuration à savoir :

TL: mesure de la taille tête- thorax-abdomen –queue

TF : mesure de la taille tête- thorax-abdomen

TA : mesure de la taille à partir de l'extrémité d'appendice gauche à l'extrémité de l'appendice droite de l'abdomen.

III-2-1-1- Effet sur la taille totale TL

- Cas de l'alimentation par la spiruline additionnée de bactéries à potentiel probiotique

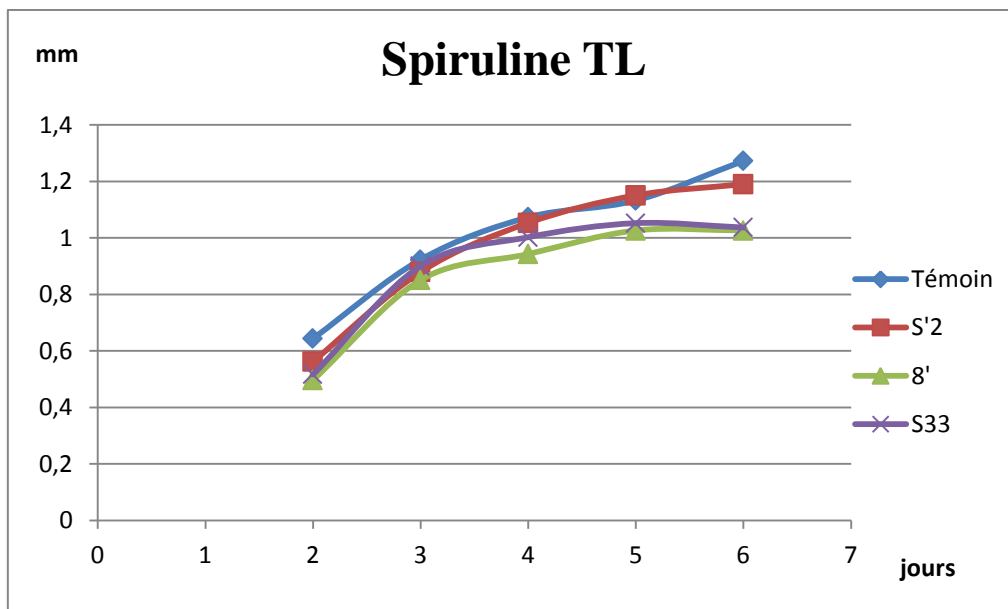


Figure III-4 : Evolution de la taille TL de l'artémie après une alimentation par la spiruline additionnée de souches à potentiel probiotique.

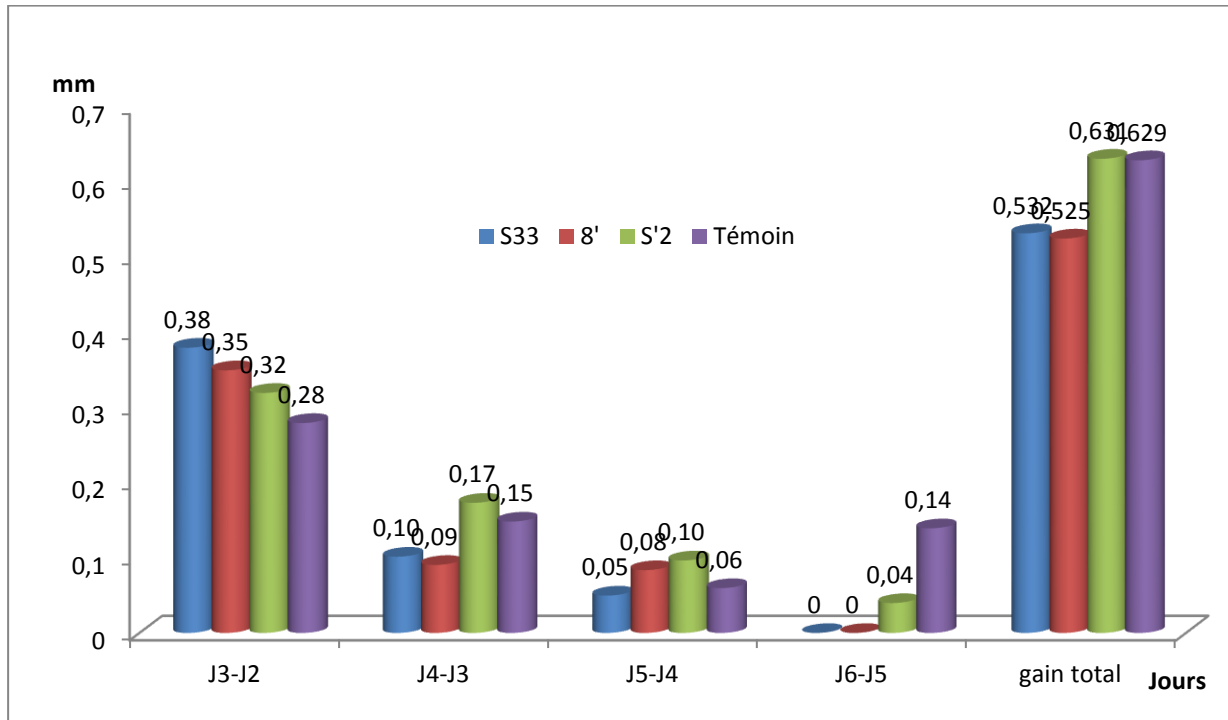


Figure III-5 : Le suivi du gain de la taille (TL) des artémies après une alimentation par la spiruline additionnée de souches à potentiel probiotique.

Le développement de la taille TL des nauplii d'*Artémia sp.* Fraîchement éclos entre le 2^{ème} et 8^{ème} jour, était sous forme d'une courbe croissante (**Figure III-4**). L'allure des courbes révèle que l'application des souches probiotique n'a pas d'influence significative sur le développement de la taille des nauplius. En effet, des tailles finales qui varient entre 1.026mm pour (8') et 1.272mm pour le témoin. Vu que la taille de départ des artémies est légèrement différente d'une expérience à l'autre, les résultats ont été exprimés par le gain de la taille TL des nauplius par jour (**Figure III-5**). Les résultats ont montré que le gain de taille a été important le premier jour il varie entre 0.28mm pour le témoin et 0.38mm en présence de la souche S33. Puis il diminue en fonction des jours.

Le gain total de la taille TL des nauplii d'*Artémie* (j2-j6) du témoin négatif a été supérieur par rapport aux nauplius alimenté par la micro algue spiruline inoculée par les souches probiotiques : un gain de taille de 0,63mm, 0,59 mm, 0,52 mm et 0,53mm pour le témoin négatif, la souche S'2, S33 et 8' respectivement. Cependant, cette variation est statistiquement significative par rapport aux S33 et 8'.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

- Cas de l'alimentation par la Chlorelle additionnée de bactéries à potentiel probiotique :

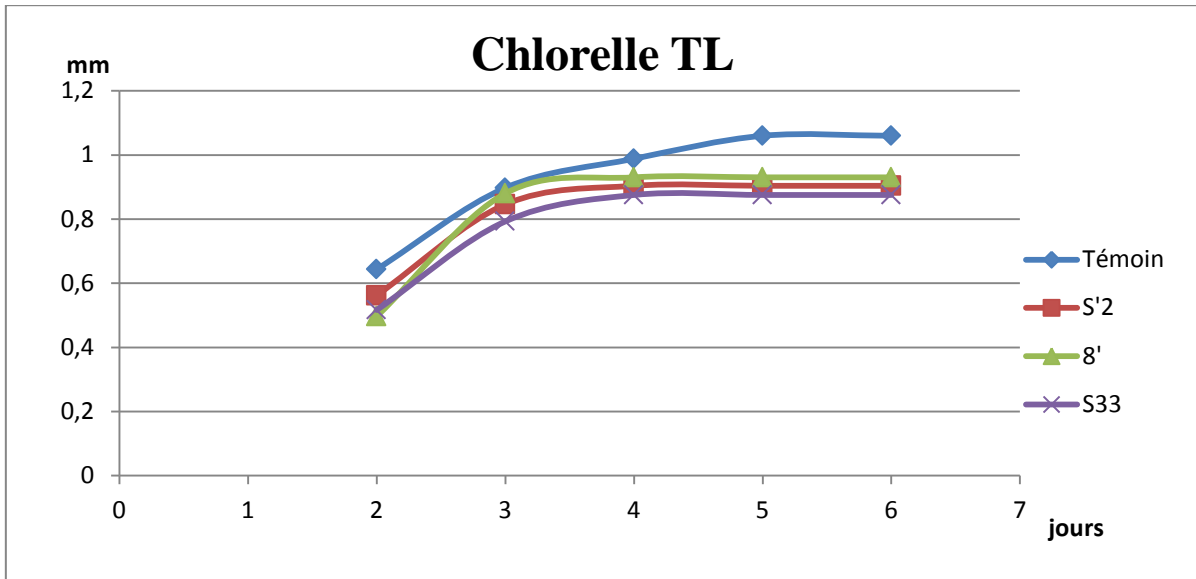


Figure III-6 : Evolution de la taille TL de l'artémie après une alimentation par la Chlorelle additionnée de souches à potentiel probiotique.

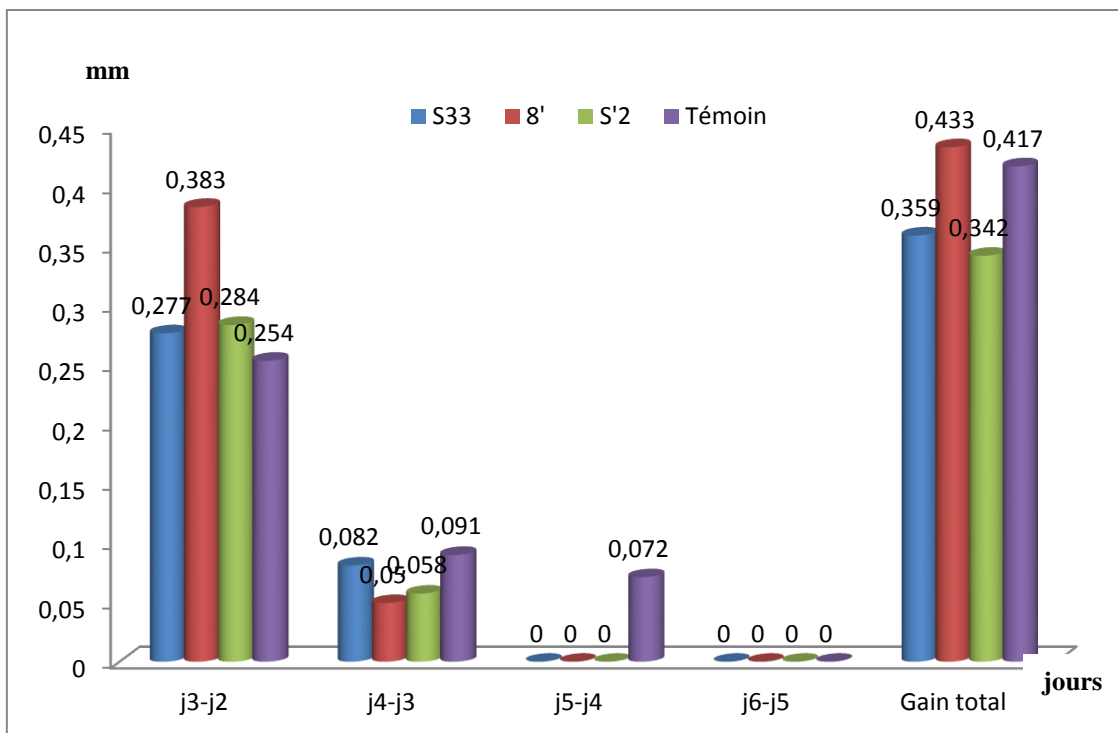


Figure III-7 : Le suivi du gain de la taille (TL) des artémies après une alimentation par la Chlorelle additionnée de souches à potentiel probiotique.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats (**Figure III-6**) ont révélé que l'alimentation par les chlorelles permet d'avoir une croissance importante le premier jour allant de 0.254mm pour le témoin à 0.383mm pour 8'. Ce gain est de même ordre que celui observé pour la spiruline à l'exception de la souche S33 qui présente une valeur double. Aucun gain de taille n'est observé au-delà du 2eme jour (J3-J4) à l'exception du témoin 0.072mm lors du 3^{ème} jour (j4-j5), ce qui n'est pas le cas lors de l'alimentation par la spiruline.

Le gain total de la taille TL des nauplii d'artémie (J2-J6) a été de 0,43 mm, 0,41 mm et 0,36mm et 0.34mm pour la souche 8', témoin négatif, S33 et S'2 respectivement. Les résultats révèlent une variation significative entre le gain obtenu pour le témoin négatif et le gain obtenu pour les lots alimentés en présence de souches probiotique (**Figure III-7**).

Le gain total de la taille (TL) des nauplius obtenu est pratiquement du même ordre quelque soit le type d'alimentation spiruline ou chlorelle.

Selon **KHERARBA (2013)** les résultats de l'enrichissement d'*Artémia* obtenus montrent qu'aux différentes quantités de nourriture de levure boulangère la taille des larves atteint 3.05 mm au 6^{ème} jour et 6.96 mm au 8^{ème} jour, alors que la chlorelle lyophilisée a produit des larves d'une taille moins importante 1.41 mm au 6^{ème} jour et 1.73 mm au 8^{ème} jour. Contrairement à nos résultats les artémies alimentés par la chlorelle ou la spiruline représentent une taille moins importante en comparant à celle de KHERARBA.

III-2-1-2- Effet sur la taille totale TA

- Cas de l'alimentation par la Spiruline additionnée de bactéries à potentiel probiotique :

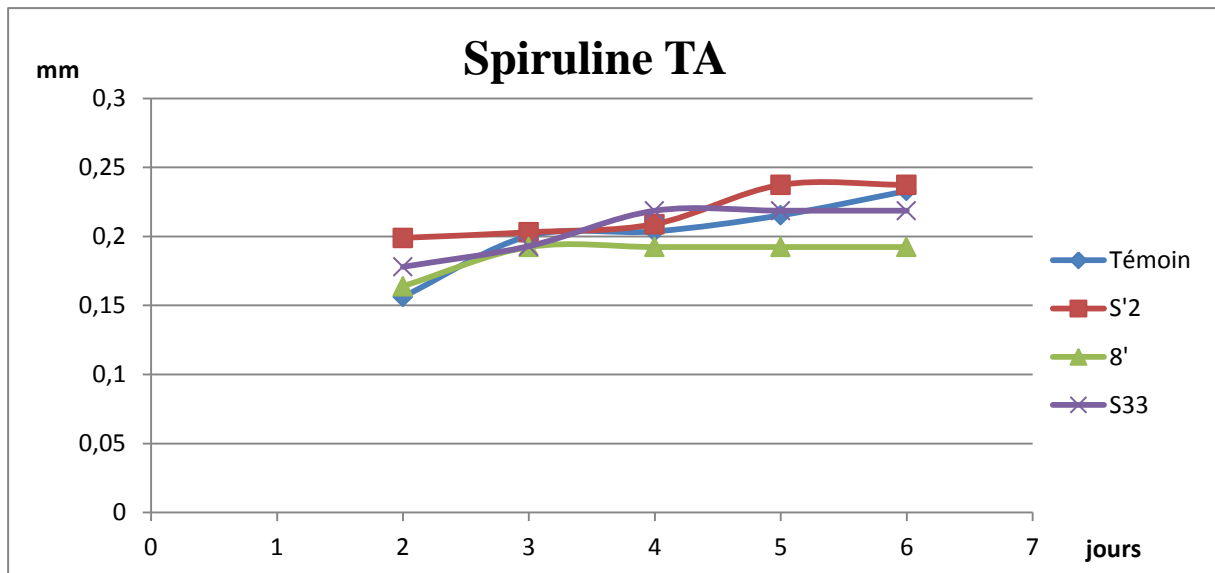


Figure III-8 : Suivi de la croissance de la taille « TA » de l'artémie après une alimentation à la spiruline supplémentée de souche probiotique.

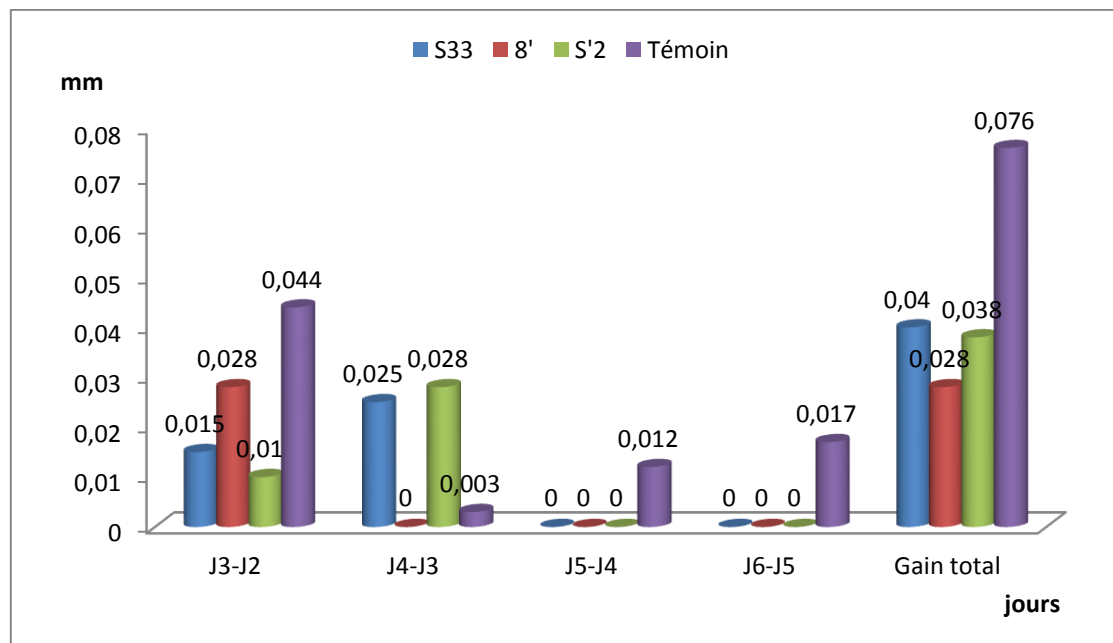


Figure III-9 : Le gain de taille « TA » des nauplius alimenté par la spiruline supplémentée par des souches probiotiques.

Entre le J2-J6 : le gain de la taille TA des nauplius d'Artémie du Témoin négatif était supérieur par rapport aux nauplius alimenté par la micro algue spiruline inoculée par les

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

autres souches probiotiques : un gain de taille de 0.076 mm, 0.04mm, 0.038mm et 0.028 mm a été observé pour le témoin négatif, S33, S'2 et 8' respectivement, (**Figure III-9**) Cette différence est significative pour les souches S'2 et 8'.

➤ Cas de l'alimentation par la Chlorelle additionnée de bactéries à potentiel probiotique :

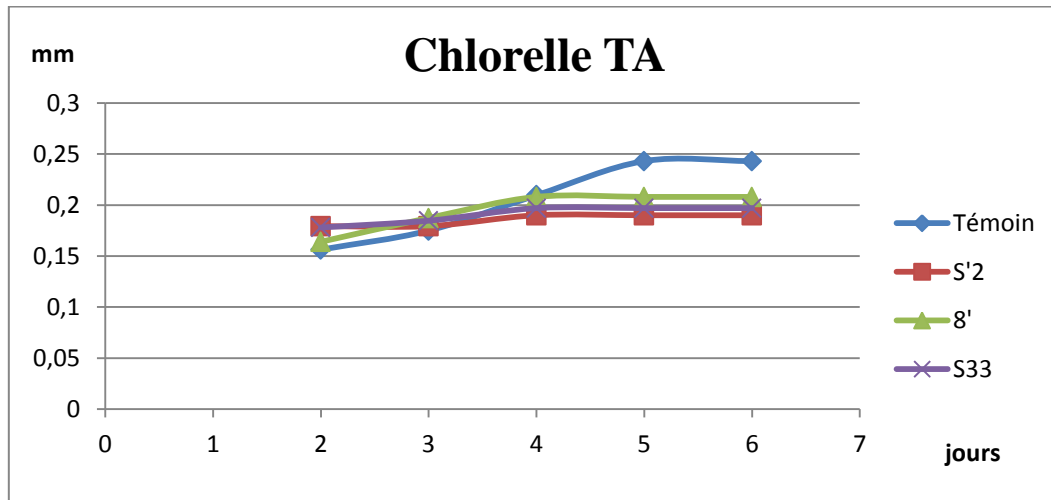


Figure III-10 : Suivi de la croissance de la taille « TA » de l'artémie après une alimentation à la Chlorelle supplémentée de souche probiotique.

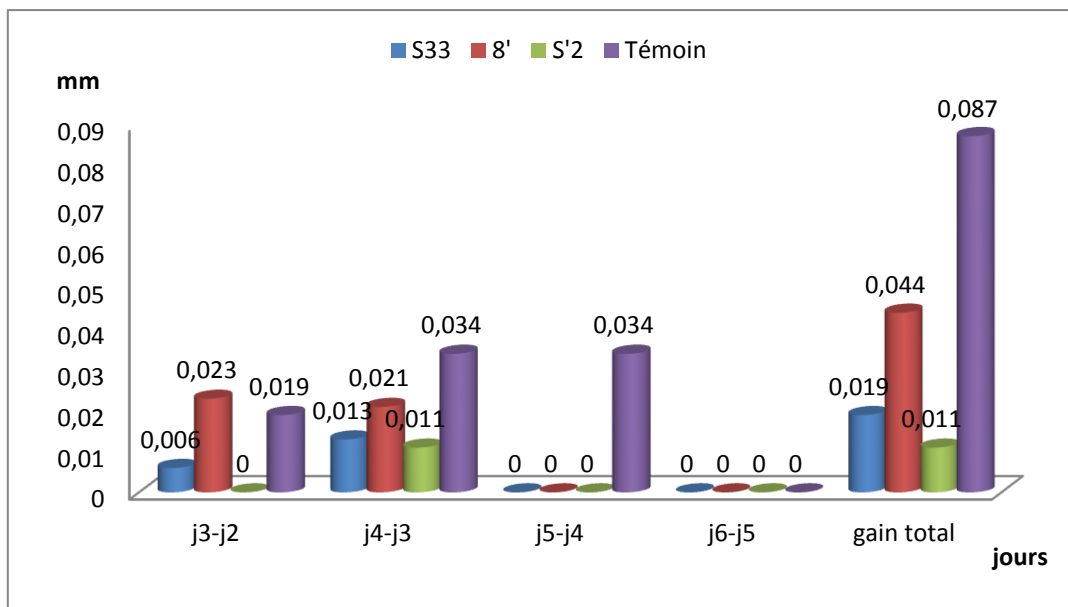


Figure III-11 : Le gain de taille « TA » des nauplius alimenté par la Chlorelle supplémentée par des souches probiotiques.

Entre le J2-J6 : le gain de la taille TA des nauplius d'Artémie du Témoin négatif a été significativement supérieur par rapport aux nauplius alimenté par la micro algue chlorelle

inoculé par les autres souches probiotiques : un gain de taille de 0.087 mm, 0.044mm, 0.19mm et 0.011 mm pour la témoin négatif, 8', S33 et S'2 respectivement (**Figure III-11**).

III-2-1-3- Effet sur la taille TF

Le développement de la taille TF des nauplii d'*Artémia sp.* fraîchement éclos entre le 2^{ème} jour et le 6^{ème} jour, été sous forme d'une courbe croissante, avec une différence de la cinétique de croissance suite à l'intégration des trois souches probiotiques différentes l'une par rapport à l'autre (**Figure III-12, III-13, III-14 et III-15**).

- **Cas de l'alimentation par la Spiruline additionnée de bactéries à potentiel probiotique**

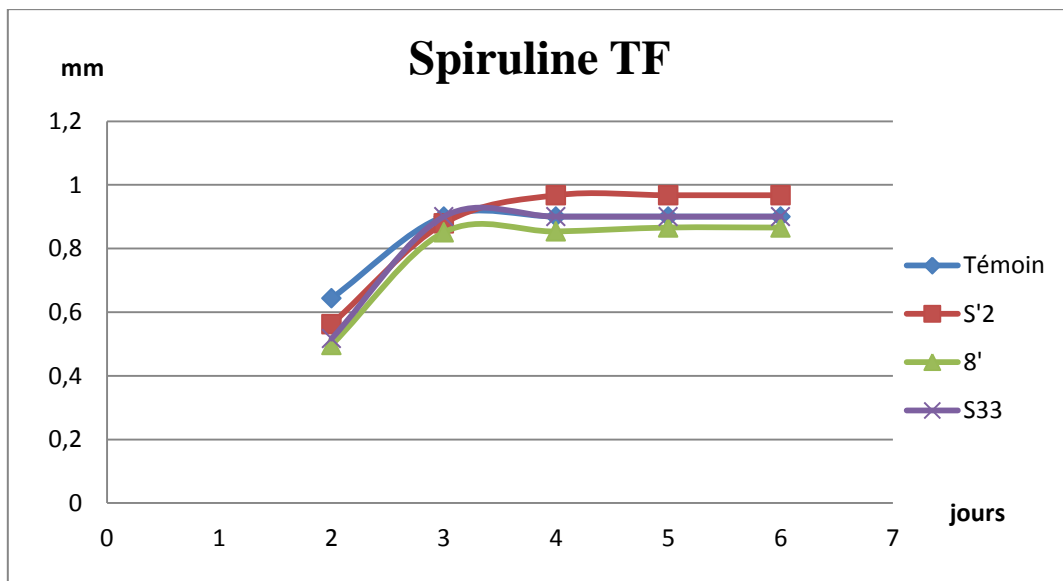


Figure III-12 : Suivi de la croissance de la taille TF des nauplii alimentés par la spiruline supplémentée de souches probiotiques.

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

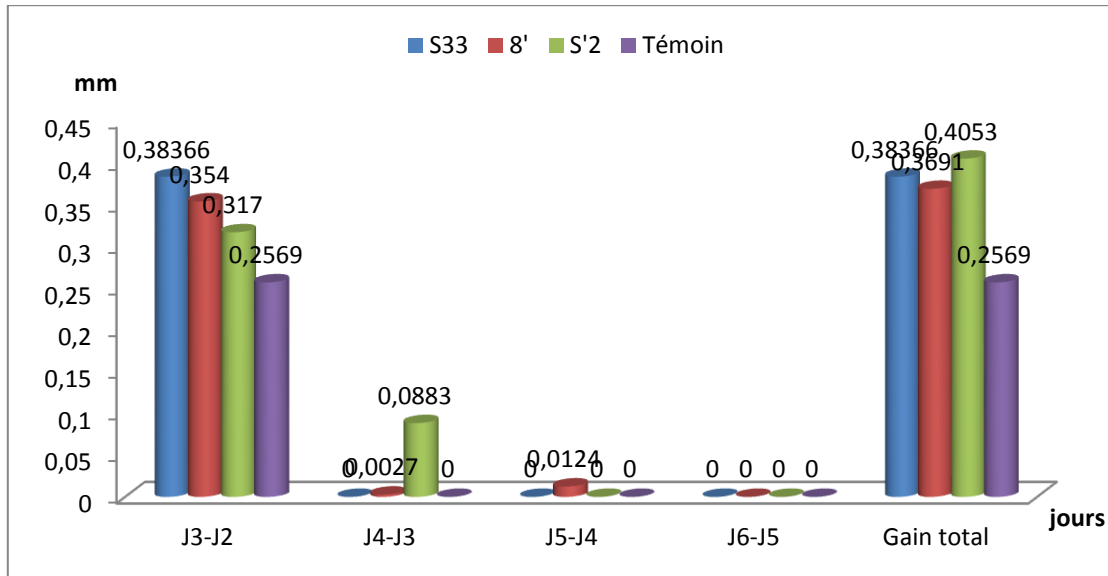


Figure III-13 : Le gain de taille « TF » par les nauplius alimenté par la spiruline supplémentée de souches probiotiques.

Entre le J2-J6 : le gain de la taille TF des nauplii d'Artémie alimentés par la micro algue spiruline supplémentée de souches probiotiques S33 et 8' était significativement supérieur par rapport aux artémies du Témoir avec un gain de taille de 0,383 mm ($p=0.01$) et 0,369 mm ($p=0.004$), pour S33 et 8' respectivement. Cependant, pas de différence significative entre le témoin négatif (0,256mm) et l'application de la souche S'2 (0,405mm) (**Figure III-13**).

➤ Cas de l'alimentation par la Chlorelle additionnée de bactéries à potentiel probiotique

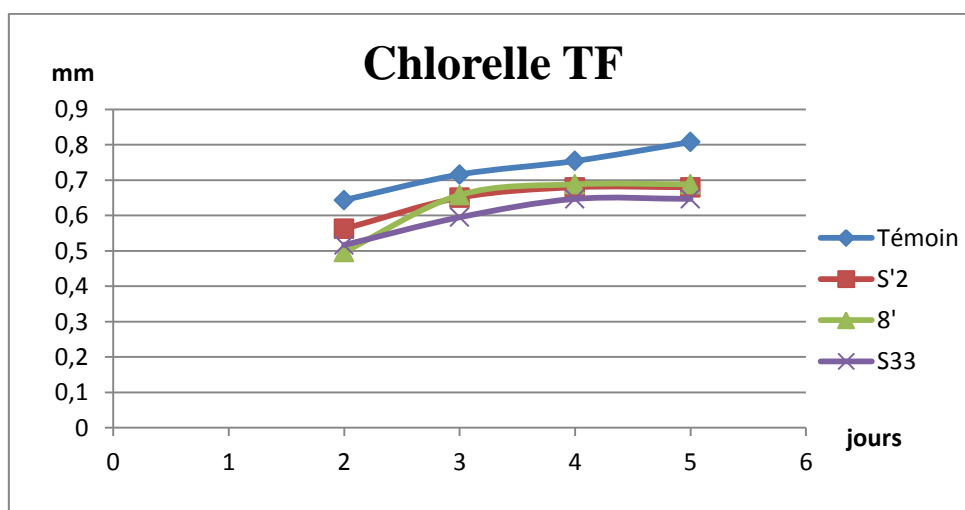


Figure III-14 : Suivi de la croissance de la taille TF des nauplius alimentés par la chlorelle supplémentée de souches probiotiques.

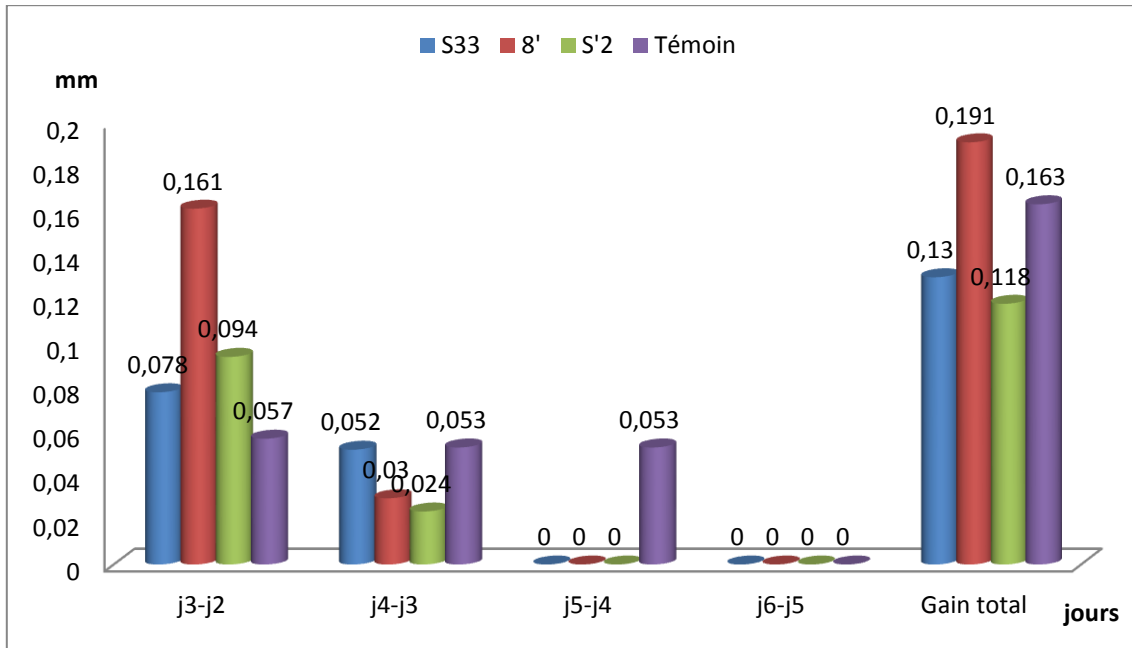


Figure III-15 : Le gain de la taille TF des nauplius alimentés par la chlorelle supplémentée de souches probiotiques.

Entre le J2-J6 : le gain de la taille TF des nauplii d'artémie de la souche 8' a été significativement supérieure (<0.05) par rapport aux nauplius alimenté par la micro algue chlorelle inoculé par les souches probiotiques (S33,S'2) et le témoin négatif : un gain de taille de 0,163 mm, 0,191 mm, 0,118 mm et 0,13mm pour le témoin négatif, 8', S'2 et S33 respectivement(**Figure III-15**).

En résumé, les résultats de l'application des souches probiotiques révèlent qu'un effet négatif sur la croissance (TL, TA et TF) est observé pour les souches S33 et S'2 supplémenté à la chlorelle. Alors que la souche 8' a montré un effet positif sur les paramètres TL et TF et un effet négatif sur le paramètre TA. Dans le cas de l'alimentation à la spiruline, un effet positif sur TF a été observé pour S33, 8' et non significatif pour S'2, un effet négatif sur TA a été observé pour S'2 et un effet négatif sur les deux paramètres (TL et TA) lors de l'application de la souche 8'.

III-2-2- Effet des souches probiotiques sur le taux de survie des artémies alimenté par les micro-algues

- Cas de l'alimentation par la Spiruline additionnée de bactéries à potentiel probiotique

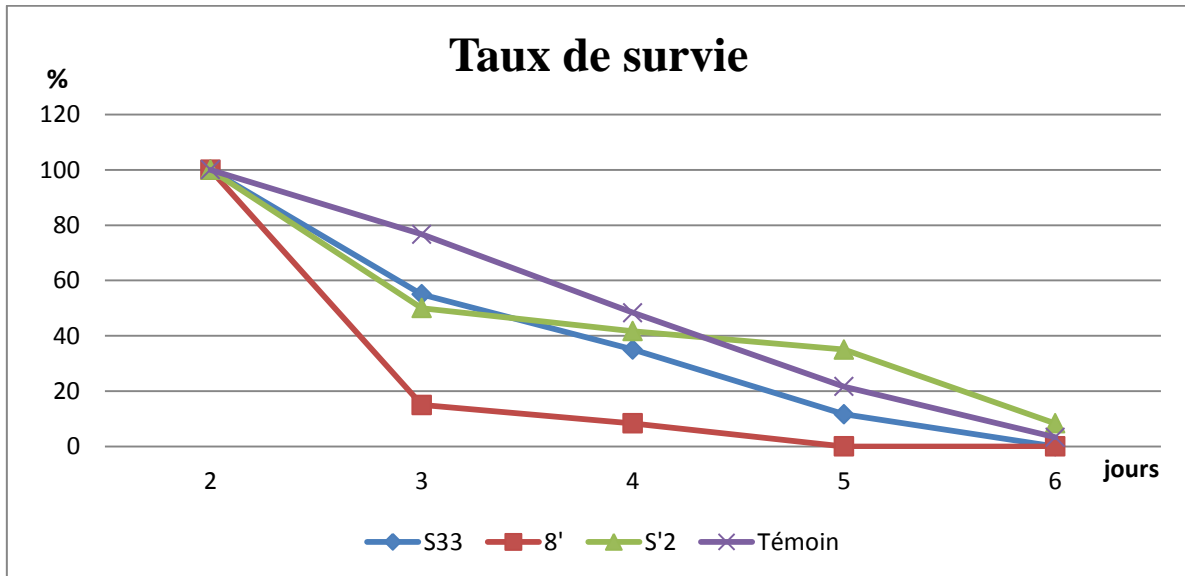


Figure III-16 : Le taux de survie des nauplius alimentés par la spiruline supplémentée par des souches probiotiques.

Le taux de survie des nauplii d'artémie du témoin négatif a été important par rapport aux nauplius alimenté par la micro algue spiruline inoculé par les autres souches (**Figure III-16**).

➤ Cas de l'alimentation par la Chlorelle additionnée de bactéries à potentiel probiotique

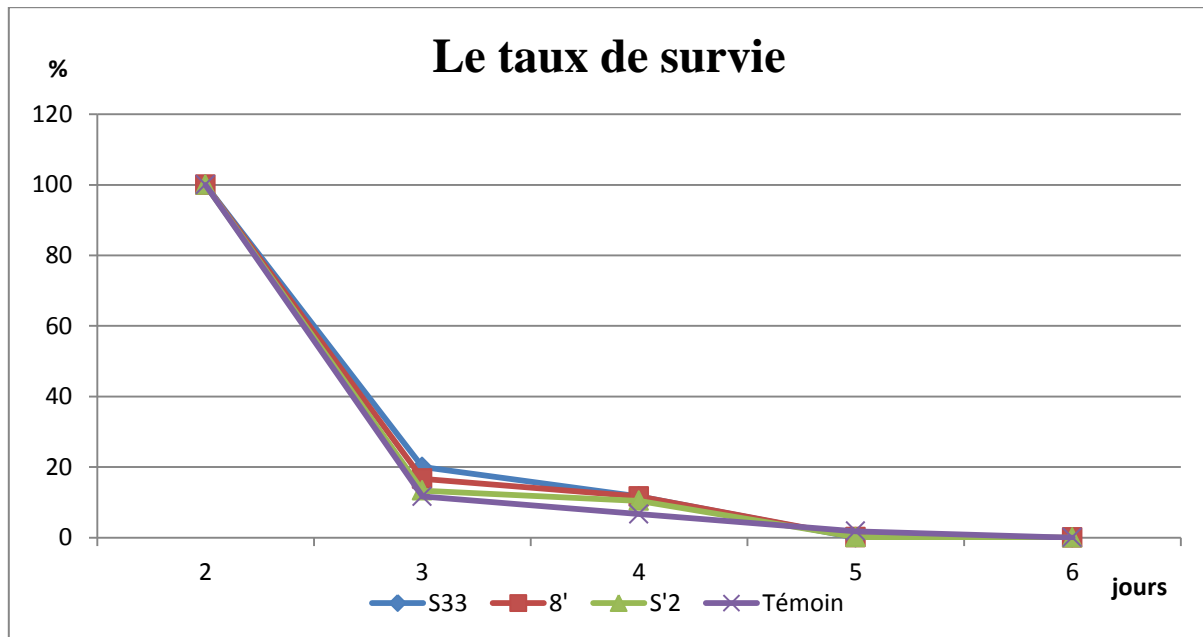


Figure III-17 : Le taux de survie d'artémie alimenté par la souche probiotique intégré dans la chlorelle.

Entre le J2-J4 : Le taux de survie des nauplii d'artémie alimenté par la microalgue chlorelle inoculé par les souches probiotiques (S8, S52 et S33) était très important par rapport au témoin négatif jusqu'au 4^{ème} jour: le taux de survie de 11.67 %, 11.67%,10.42% et 6.67% pour S33, 8', S'2 et le témoin négatif, Respectivement. Comme l'artémie utilisée est de type commercial, le taux de survie est pratiquement nulle à partir du 5^{ème} jour avec des taux respectifs de 1.8% ,0.15%,0.15% et 0% pour le témoin négatif, S'2,8', et S33(**Figure III-17**).

MAHDHI (2011) a indiqué que l'application de trois souches de *Bacillus* en tant que probiotiques améliorées le taux de survie des artémies de façon significative entre 80 et 100 % en 4 jours et ceci a été assuré par l'élimination du *Vibrio alginolyticus*.

L'impact des souches probiotique sur le taux de survie des artémies alimentées par les microalgues sera mieux apprécié en utilisant des souches sauvages d'artémie et non une souche commerciale.

CONCLUSION

Conclusion :

L'objectif de cette étude a été l'essai des souches à potentiel probiotique dans la culture d'artémie afin d'améliorer certains aspects :

1- L'efficacité d'éclosion et la qualité microbiologique du milieu : Les souches S'2 et 8' ont montré une augmentation significative du taux d'éclosion des cystes. L'étude de cet effet doit être approfondie afin de déterminer son origine.

Concernant la qualité microbiologique du milieu d'élevage, nous avons constaté que selon des souches probiotiques appliquées, nous avons constaté une augmentation ou la diminution du nombre des bactéries à Gram négatif avec une prédominance de *P. aeruginosa* et/ou *E. cloacae*. Nous avons noté, une augmentation de la flore à Gram négatif lors de l'application des souches S6, S'2, 8', S19,3, S2, S10, et S33 et une baisse de cette flore lors de l'application des souches S'10, S7, S1 et S18.

L'application des souches probiotiques montre l'élimination ou la dominance de certains types de germes. Exemple : Les trois souches probiotiques S1, S'10 et S'2 inhibent presque complètement la souche *Enterobacter cloacae*, aussi les souches probiotiques S33 et 8' inhibent complètement la souche *Pseudomonas aeruginosa*. Les souches S2, 8' et 3 entraînent l'apparition de la souche *S. maltophilia* alors que l'application des souches S7, S33 et 8' semble inhiber l'espèce potentiellement pathogène *Pasteurella pneumotropica*.

2- Effet des souches probiotiques sur la croissance et le taux de survie des nauplii :

Les souches probiotiques ont été supplémentées dans l'alimentation par les micro-algues (Spiruline et Chlorelle) afin de suivre la croissance et le taux de survie des artémies. Les résultats obtenus ont révélé :

- Un effet positif a été observé pour la souche 8' supplémentée à la chlorelle pour les deux paramètres (TL et TF) et pour les deux souches (8' et S33) supplémentées à la spiruline sur le TF et des effets négatifs pour la majorité des autres applications des souches probiotiques.
- Le taux de survie des nauplii est important dans les 4 premiers jours de l'utilisation des souches 8', S'2 et S33 intégrées à la Chlorelle. L'étude de ce paramètre a été limitée par le taux de survie limité des nauplii de la souche commerciale.

CONCLUSION

D'après les résultats obtenus dans cette étude, nous constatons que les souches trouvées potentiellement probiotique *in-vitro* semblent avoir des effets probiotiques *in vivo* dans un élevage d'artémies. Ces effets bénéfiques doivent faire l'objet d'études plus approfondies afin d'élucider ces phénomènes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADEGOKE, A.A., STENSTRÖM, T.A., OKOH, A.I., 2017.** *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Frontiers in Microbiology* 8.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02276>
- AFRILASARI, W., WIDANARNI, MERYANDINI, A., 2016.** Effect of Probiotic *Bacillus megaterium* PTB 1.4 on the Population of Intestinal Microflora, Digestive Enzyme Activity and the Growth of Catfish (*Clarias* sp.). *HAYATI Journal of Biosciences* 23, 168–172. <https://doi.org/10.1016/j.hjb.2016.12.005>
- AMAROUYACHE M., KARA M.H., 2010.** Qualité et biomasse exploitable d'*Artémia Salina* (Crustacé, Anostracé) du chott Marouane (Nord-Est, Algérie). *Synthèse : revue des sciences et de la technologie*, vol.21, p. 29-39
- AMAT, F.1980.** Antecedentes, estado actual y perspectivas del empleo de *Artemia salina* en acuicultura. *Informe Técnico del Instituto de Investigaciones Pesqueras* 75: 3-75.
- BEZZI, F. HOUHECH, A.,2015.** Etude comparative de la valeur nutritionnelle des cystes d'*Artémia Salina* de la saline betioua(Oran). Master. Hydrobiologie et aquaculture. Khmiss Meliana ; Université de Khmiss Meliana. P43.
- BOWEN, et al. 1985.** Ecological isolation in *Artemia*: population differences in tolerance of anion concentrations. *Journal of crustacean biology*. Vol. 5, n°1, pp.106-129.
- BRUGGMAN, E., SOREGELASSE, P., et al., 1979.** Improvements in the decapsulation technique of *Artemia* cysts.Pp 262-269.
- CASTEX M.et al.,2014** in aquaculture nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics edition.
- GAO, X.-Y., LIU, Y., MIAO, L.-L., LI, E.-W., HOU, T.-T., LIU, Z.-P., 2017.** Mechanism of anti-Vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express* 7.
<https://doi.org/10.1186/s13568-017-0323-3>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GIRIJAKUMARI, N.R., ETHIRAJA, K., MARMUTHU, P.N., 2018.** In vitro and in vivo evaluation of probiotic proprieties of *Enterobacter cloacae* in Kenyicichild, Maylandia lombardoi. *Aquaculture intertionale*. Vol 26, pp 959-980.
- GOROSOPE, J.N., MIKIKO ABE, K.N., HIGASHI,S.,1996 .** Potential use of *Pseudomonas* as food for brine shrimp *Artemia*. *Suisanzoshoku* 315-323.
- TREECE, G.D., 2000.** *Artémia* production for marine Larval Fish culture. Southem Aquaculture Regional Center. SRAC publication NO. 702.
- HAI, N.V., 2015.** The use of probiotics in aquaculture. *Journal of Applied Microbiology* 119, 917–935. <https://doi.org/10.1111/jam.12886>
- HE, S., RAN, C., QIN, C., LI, S., ZHANG, H., DE VOS, W.M., RINGØ, E., ZHOU, Z., 2017.** Anti-Infective Effect of Adhesive Probiotic *Lactobacillus* in Fish is Correlated With Their Spatial Distribution in the Intestinal Tissue. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13466-1>
- IBRAHEM, M.D., 2015.** Evolution of probiotics in aquatic world: Potential effects, the current status in Egypt and recent prospectives. *Journal of Advanced Research* 6, 765–791. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.12.004>
- IBRAHIM M., SAMI SHABEEB AL SHABEEB., NOURELDIN, E.A., AND GHAMRI H. ALRAMADHAN., 2016.** Occurrence of Potentially Pathogenic *Vibrio* and related species in Seafoods obtained from the Eastern Province of Saudi Arabia. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* (2016). 3(12): 71-80.
- JAHANGIRI, L., ESTEBAN, M., 2018.** Administration of Probiotics in the Water in Finfish Aquaculture Systems: A Review. *Fishes* 3, 33. <https://doi.org/10.3390/fishes3030033>
- JATOBA A., VIEIRA F.D., NETO B.C., SILVA B.C., MOURINO J.L.P., 2008.** Lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile Tilapia utilized as probiotic. *Pesq. Agropec. Brasil*, 43: 1201-1207.
- KESARCODI-WATSON, A., KASPAR, H., LATEGAN, M.J., GIBSON, L., 2008.** Probiotics in aquaculture: The need, principles and mechanisms of action and

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

screening processes. *Aquaculture* 274, 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.019>

KHERARBA M.,2013. Comparaison de la valeur alimentaire de *Chlorella* et *Saccharomyces cerevisiae*. Master. Dely Ibrahim Alger. ENSSMAL.

KUMAR, K., PARASAD, K.P., RAMAN, R.P., KUMAR, S., PURUSHOTMAN, C.S., 2013. Association of *Enterobacter cloacae* in the mortality of *Pangasianodon hypophthalmus* (sauvage, 1878) reared in culture pond in Bhimarvaram Andhra Pradesh, India. *Indian J.Fish.*, 60(3) :147-149.

LARA-FLORES, M., 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview 9.

LAUZON H.L et al.,2014 in aquaculture nutrition : Gut Health, Probiotics and Prebiotics edition.

LAVENS, P. ET P. SORGELOOS. 1996. Manuel on the production and the use of live food for aquaculture. *FAO. Fish. Tech. Pap.* Rome. 361.

LEE M., KIM S-K., LI X-H, LEE J-H., 2014. Bacterial virulence analysis using brine shrimp as an infection model in relation to the importance of quorum sensing and proteases *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **60**, 169174. doi 10.2323/jgam.60.169.

LEE, S., KATYA, K., PARK, Y., WON, S., SEONG, M., HAMIDOGHLI, A., BAI, S.C., 2017. Comparative evaluation of dietary probiotics *Bacillus subtilis* WB60 and *Lactobacillus plantarum* KCTC3928 on the growth performance, immunological parameters, gut morphology and disease resistance in Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish & Shellfish Immunology* 61, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.12.035>

LEYTON, Y., SAYES, C., MEJIAS, C., ABARCA, M., WILSON, R., RIQUELME, C., 2017. Increased larval survival of *Seriola lalandi* using *Pseudoalteromonas sp.* as probiotics. *Revista de biología marina y oceanografía* 52, 95–101.
<https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000100007>

LINNAEUS C., 1758. *Systema naturae*. Ed. X, Hafniae, 634 pp.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- MAHDHI, A., BAHI, A., HMILA, Z., BAKHROUF, A., 2010.** Utilisation de la levure et des bactéries pour le contrôle des vibrions pathogènes dans les cultures d'Artemia 8.
- 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, 225–231.
<https://doi.org/10.3354/ab00368>
- MANNING P J DIGIACOMO., DELONG., 1989.** Pasteurellose chez les animaux de laboratoire Adlam C Rutter JM *Pasteurelle et Pasteurellose* Londres, Royaume-Uni Presse académique 1989 263 302.
- MANOPPO, H., TUMBOL, R.A., SINJAL, H.J., NOVITARIZKY, I.A., 2019.** The use of probiotic isolated from Sangkuriang catfish (*Clarias gariepinus* var. Sangkuriang) intestine to improve growth and feed efficiency of carp, *Cyprinus carpio* 12, 7.
- MARTÍNEZ CRUZ, P., IBÁÑEZ, A.L., MONROY HERMOSILLO, O.A., RAMÍREZ SAAD, H.C., 2012.** Use of Probiotics in Aquaculture. *ISRN Microbiology* 2012, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2012/916845>
- ÖZTÜRK, Ç.R., ALTINOK I., 2014.** Bacterial and Viral Fish Diseases in Turkey. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 14: 275-297
- PELLI, A., 2017.** Disease Infection by Enterobacteriaceae Family in Fishes: A Review. *Journal of Microbiology & Experimentation* 4.
<https://doi.org/10.15406/jmen.2017.04.00128>
- PERSON- LE RUYET J., 1975.** Technique d'élevage en masse d'un rotifère (*Branchiomas plicatilis* Müller) et d'un crustacé branchipode (*Artemia salina* L). *Ostened, Belgium, Vol.1 :331-343.*
- PERSOONE, G. ET P. SORGELOOS. 1980.** General aspects of ecology and biogeography of *Artemia*. *Brine Shrimp Artemia: Ecol, Cult, Use Aquacult.* In: Persoone, G., P. Sorgeloos., O.A. Roels., E. Jaspers (eds). Univ. Press. Wett. Belgium., 3: 3-24.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- PROVASOLI, L. ET A. D'AGOSTINO. 1969.** Development of artificial media for *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, 136: 434-453.
- PROVASOLI, L. ET K. SHIRAIISHI. 1959.** Axenic cultivation of the brine shrimp *Artemia salina*. *Biol. Bull.*, 117: 347-355.
- REDONDO, P.N., DOSTA, C.M., JARERO, J.R., 2008.** Daphnia, Tenebrio and Tubifex) for fishes in collection, 15.
- REINA J.C., TORRES M., LLMAS I., 2019.** *Stenotrophomonas maltophilia* AHL- Degrading strains Isolated from marine invertebrate microbiota attenuate the virulence of *Pectobacterium carotovorum* and *Vibrio coralliilyticus*. *Marine biotechnology*, Vol.21:276-290.
- SALAS-OVILLA R, GÁLVEZ-LÓPEZ D, VÁZQUEZ-OVANDO A, SALVADOR-FIGUEROA M, ROSAS-QUIJANO R. 2019.** Isolation and identification of marine strains of *Stenotrophomonas maltophilia* with high chitinolytic activity. *PeerJ* 7:e6102.
- SAYES C., LEYTON Y., RIQUELME C., 2018.** Probiotic bacteria as an healthy alternative for fish aquaculture fish aquaculture <http://dx.doi.org/10.5.772/intechopen.71206>.
- SOLTANI S., 2017.** Determination d'une partie de la flore bactérienne associée aux cystes d'Artémie. Diplôme d'ingénieur. Dely brahim alger.ENSSMAL
- SORGELOOS P., PERSONNE G ET AL., 1979.** The use of *Artemia* cysts in aquaculture : the concept "hatching efficiency" and description of a new method for cyst processing. *Proceedings of the ninth annual meeting ward mariculture society* 715-721.
- SORGELOOS P., 1980.** The use of the brine shrimp *Artemia* in aquaculture. In : *The brine shrimp Artemia*. Vol. 3; Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Eds Persoone G. ; P. Sorgeloos ; O.A. Roels ; E. Jaspers ; Universa Press, Wetteren (Belgium), 25-46.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- SPITCHAK, M.K., 1980.** Artemia in the USSR. *Brine Shrimp Artemia: Ecol, Cult, Use Aquacult.* In: Persoone, G., P. Sorgeloos., O.A. Roels., E. Jaspers (eds). Univ. Press.Wett.Belgium., 3: 127-128.
- TAIYE MICHAEL, E., OLUKAYODE AMOS, S., TAHIR HUSSAINI, L., 2014.** A Review on Probiotics Application in Aquaculture. *Fisheries and Aquaculture Journal* 05. <https://doi.org/10.4172/2150-3508.1000111>
- THILLAI SEKAR, V., SANTIAGO, T.C., VIJAYAN, K.K., ALAVANDI, S.V., STALIN RAJ, V., RAJAN, J.J.S., SANJUKTHA, M., KALAIMANI, N., 2008.** Involvement of Enterobacter cloacae in the mortality of the fish, Mugil cephalus. *Letters in Applied Microbiology* 46, 667–672. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02365.x>
- VERMA, G., GUPTA, A., 2015.** Probiotics Application in Aquaculture: Improving Nutrition and Health. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 3, 13.
- VAN STAPPEN, G. 1996.** Introduction, biology and ecology of *Artemia*. In P. Lavens & P. Sorgeloos, eds. *Manual on the production and use of live food for aquaculture*, pp. 79-136. FAO Fisheries Technical Paper No. 361. Rome.
- VERSCHUERE, L., ROMBAUT, G., SORGeloos, P., VERSTRAETE, W., 2000.** Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 655–671. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.4.655-671.2000>
- VILLAMIL L., FIGUERAS A., PLANAS M., NOVA B., 2003.** Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219(2003) 43-56.
- VOS, J. & A. TRANSUTAPANIT. 1979.** Detailed report on Artemia cysts inoculation in Bangpakong.ChachoengsaoProvince.*FAO/UNDP Field Doc.* 54.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

XU et al., 2018. Identification of immunogenic outer membrane proteins and evaluation of their protective efficacy against *Stenotrophomonas maltophilia*. BMC Infectious Diseases (2018) 18:347

Sites d'internet:

<http://docplayer.fr/81043901-Universite-d-antananarivo-ecole-superieure-des-sciences-agronomiques-departement-elevage.html>

<http://www.fao.org/3/W3732E/w3732e0m.htm>

<http://doi.org/10.7717/peerj.6102>

ANNEXES

Tableau annexe 01: les mensurations de la taille moyenne (TL) des nauplius d'Artémies alimenté par la spiruline inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,516	0,900	1,002	1,052	1,052
8'	0,497	0,851	0,942	1,026	1,026
S'2	0,562	0,879	1,053	1,150	1,190
Témoin	0,643	0,923	1,072	1,132	1,272

Tableau annexe 02: les mensurations de la taille moyenne (TL) des nauplius d'Artémies alimenté par la chlorelle inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,516	0,793	0,875	0,875	0,875
8'	0,497	0,880	0,930	0,930	0,930
S'2	0,562	0,846	0,904	0,904	0,904
Témoin	0,643	0,897	0,988	1,06	1,06

Tableau annexe 03: les mensurations de la taille moyenne (TA) des nauplius d'Artémies alimenté par la spiruline inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,178	0,193	0,218	0,218	0,218
8'	0,164	0,192	0,192	0,192	0,192
S'2	0,199	0,209	0,237	0,237	0,237
Témoin	0,156	0,200	0,203	0,215	0,232

Tableau annexe 04: les mensurations de la taille moyenne (TA) des nauplius d'Artémies alimenté par la chlorelle inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,178	0,184	0,197	0,197	0,197
8'	0,164	0,187	0,208	0,208	0,208
S'2	0,179	0,179	0,19	0,19	0,19
Témoin	0,156	0,175	0,209	0,243	0,243

Tableau annexe 05: les mensurations de la taille moyenne (TF) des nauplius d'Artémies alimenté par la spiruline inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,517	0,900	0,900	0,900	0,900
8'	0,497	0,851	0,854	0,866	0,866
S'2	0,562	0,879	0,968	0,968	0,968
Témoin	0,644	0,901	0,901	0,901	0,901

Tableau annexe 06: les mensurations de la taille moyenne (TF) des nauplius d'Artémies alimenté par la chlorelle inoculé par les souches probiotiques.

JR	2	3	4	5	6
S 33	0,517	0,595	0,647	0,647	0,647
8'	0,497	0,658	0,688	0,688	0,688
S'2	0,562	0,656	0,68	0,68	0,68
Témoin	0,644	0,701	0,754	0,807	0,807

Tableau annexe 07: Détermination de la différence dans la croissance des artémies (TL, TA et TF) alimentées par la spiruline entre les souches appliquées et le témoin négatif.

Spiruline	S'2	8'	S33
TL	0,074	0,012	0,019
TA	0,033	0,043	0,166
TF	0,0518	0,004	0,013

Tableau annexe 08 : Détermination de la différence dans la croissance des Artémies (TL, TA et TF) alimentées par la chlorelle entre les souches appliquées et le témoin négatif.

Chlorelle	S'2	8'	S33
TL	0,001	0,008	0,004
TA	0,001	0,008	0,025
TF	0,002	0,003	0,004

Tableau annexe 09 : les mensurations du taux de survie des nauplius d'Artémies alimenté par la chlorelle inoculé par les souches probiotiques.

jours	2	3	4	5	6
Témoin%	100	11,67	6,67	1,8	0
S'2%	100	13,33	11,67	0,15	0
8'%	100	16,67	11,67	0,15	0
S33%	100	20	11,67	0	0

Tableau annexe10: les mensurations du taux de survie des nauplius d'Artémies alimenté par la spiruline inoculé par les souches probiotiques.

jours	2	3	4	5	6
Témoin %	100	76,67	48,33	21,67	3,33
S'2 %	100	50	41,67	35	8,33
8'%	100	15	8,33	0	0
S33%	100	55	35	11,67	0

Tableau annexe 11 : Détermination l'efficacité d'éclosion des cystes d'artémia commerciale.

		NI	EE	MOY	P	
Témoin	I	1	120120,12	240240,24		
	II	2	240240,24			
	III	3	360360,36			
S1	I	4	480480,48	240240,24	1	Non significatif
	II	1	120120,12			
	III	1	120120,12			
S2	I	3	360360,36	440440,44	0.420	Non significatif
	II	1	120120,12			
	III	7	840840,841			
S7	I	2	240240,24	200200,2	0.643	Non significatif
	II	1	120120,12			
	III	2	240240,24			
S18	I	1	120120,12	280280,28	0.725	Non significatif
	II	3	360360,36			
	III	3	360360,36			
S19	I	1	120120,12	200200,2	0.725	Non significatif
	II	1	120120,12			
	III	3	360360,36			
S'10	I	5	600600,601	400400,4	0.275	Non significatif
	II	3	360360,36			
	III	2	240240,24			

Tableau annexe 12 : Détermination l'efficacité d'éclosion des cystes d'artémia commerciale (suite).

		NI	EE	MOY	P	
S10	I	2	240240,24	200200,2	0.768	Non significatif
	II	0	0			
	III	3	360360,36			
S'2	I	4	480480,48	560560,56	0.039	significatif
	II	4	480480,48			
	III	6	720720,72			
S33	I	2	240240,24	400400,4	0.275	Non significatif
	II	5	600600,6			
	III	3	360360,36			
8'	I	5	600600,6	520520,52	0.025	significatif
	II	4	480480,48			
	III	4	480480,48			
3	I	3	360360,36	240240,24	1	Non significatif
	II	2	240240,24			
	III	1	120120,12			
S6	I	2	240240,24	240240,2	0.643	Non significatif
	II	1	120120,12			
	III	2	240240,24			

Tableau annexe 13 : Dénombrement et identification des colonies apparues sur TCBS et Mac conkey après l'incubation.

	Milieu de culture	Dilution	Type de colonie	Comptage
Témoin	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	136
		10 ⁻²	Colonie rose claire	102
		10 ⁻³	Vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte Colonie jaune verte	5 4
		10 ⁻²	Vide	
		10 ⁻³	Vide	
S6	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	392
		10 ⁻⁴	Colonie rose claire	28
		10 ⁻⁶	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte Colonie jaune verte	1 15
		10 ⁻²	Colonie jaune	3
		10 ⁻³	vide	
8'	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose foncé	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose foncé	Indénombrable
		10 ⁻³	Colonie rose foncé	Indénombrable
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie jaune	186
		10 ⁻²	Colonie jaune verte	56
		10 ⁻³	Colonie jaune	Indénombrable
		10 ⁻⁴	Colonie rose foncé Colonie rose claire entouré par un halo jaune	58 7
		10 ⁻⁶	vide	
S19	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	23
		10 ⁻²	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻³	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻⁴	Colonie rose claire	12
		10 ⁻⁶	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie jaune verte	12
		10 ⁻²	Vide	
		10 ⁻³	Colonie verte	3

Tableau annexe 14: Dénombrement et identification des colonies apparues sur TCBS et Mac conkey après l'incubation.

	Milieu de culture	dilution	Type de colonie	Comptage
S10	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻³	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻⁴	Colonie rose claire	12
		10 ⁻⁶	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie jaune verte	13
		10 ⁻²	Vide	
10 ⁻³		vide		
S7	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	31
		10 ⁻³	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie jaune verte	104
		10 ⁻²	Colonie jaune verte	1
		10 ⁻³	vide	
3	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	308
		10 ⁻²	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻³	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte	6
		10 ⁻²	Colonie jaune colonie verte	1 1
		10 ⁻³	Colonie verte	1
S18	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire Colonie rose foncé	Indénombrable 6
		10 ⁻²	Colonie rose claire	388
		10 ⁻³	Colonie rose claire	36
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte Colonie jaune verte	18 16
		10 ⁻²	Colonie jaune verte	4
		10 ⁻³	vide	
S2	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	81
		10 ⁻³	vide	
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte Colonie jaune verte	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie verte Colonie jaune verte	Indénombrable
		10 ⁻³	Colonie verte Colonie jaune verte	39 1

Tableau annexe 15: Dénombrement et identification des colonies apparues sur TCBS et Mac conkey après l'incubation.

	Milieu de culture	dilution	Type de colonie	Comptage
S33	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose foncé Colonie rose claire entouré par un halo transparent	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose foncé Colonie rose claire entouré par un halo transparent	Indénombrable
		10 ⁻³	Colonie rose foncé Colonie rose claire entouré par un halo transparent	123 50
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie jaune verte	Indénombrable
S'2	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	240
		10 ⁻³	Colonie rose claire	21
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte	32
S'10	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	116
		10 ⁻³	Colonie rose claire	72
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte	56
S1	Mac conkey	10 ⁻¹	Colonie rose claire	Indénombrable
		10 ⁻²	Colonie rose claire	116
		10 ⁻³	Colonie rose claire	36
	TCBS	10 ⁻¹	Colonie verte	17

Pseudomonas aeruginosa(2236000) Très bonne identification



Enterobacter cloacae(3325573) Exilente identification



Enterobacter cloacae(3325533) Exilente identification



Enterobacter cloacae(3327573) Très bonne identification



Figure annexe 01 : Identification des colonies qui apparurent sur MacConkey.

Enterobacter cloacae(3325573) Très bonne identification



Stenotrophomonas maltophilia(1022000) Exilente identification



Figure annexe 02 : Identification des colonies apparues sur TCBS.

Résumé:

Le présent travail a fait l'objet d'une application *in vivo* de 12 souches à potentiel probiotique dans l'élevage d'*Artémia sp* (*in vitro*), du genre *Entérocooccus durans*, *Enterococcus faecium* et *Psychrobacter cibarius* afin d'améliorer l'efficacité d'éclosion et la qualité microbiologique des eaux d'élevage des nauplius, parmi les 12 souches, 3 souches ont été inoculé dans deux différents micro algues (la spiruline et la chlorelle) afin d'améliorer la croissance et le taux de survie d'*Artémia*. Les résultats obtenus ont montré que les deux souches 8' et S'2 ont amélioré significativement ($P < 0,05$) l'efficacité d'éclosion, les souches 8', S33, S7, S1, S'10 et S'2 diminue la charge des bactéries à gram négative tel que : *Pseudomonas aeruginosa* a été éliminé par S33 et 8', *Enterobacter cloacae* par S1, S'10 et S'2, *Pasteurella pneumotropica* par S7, S33 et 8' et d'autre part le développement de certaine flore bénéfique pour les artémies, tel que : la prolifération de *Stenotrophomonas maltophilia* en présence de la souche S2, 8' et 3. Les résultats de l'intégration des trois souches probiotiques aux deux micro algue, a révélé que la taille des nauplius alimenté par la chlorelle inoculé par la souche 8' a amélioré les deux paramètres TL et TF et la taille des nauplius alimenté par la spiruline inoculé par la souche 8' et S33 a amélioré le paramètre TF. L'étude du taux de survie a été limitée vu qu'on a utilisé des individus commerciaux avec une petite longévité. Nous constatons que les souches testées trouvées *in-vitro* semblent avoir des effets probiotiques *in vivo* dans l'élevage d'artémies. Ces effets bénéfiques doivent faire l'objet d'une étude plus approfondies afin d'élucider le mode d'action de ces dernières.

Mots clés : Probiotique, *Artémia*, *Entérocooccus durans*, *Enterococcus faecium* et *Psychrobacter cibarius*.

Abstract :

The present work has been the subject of an *in vivo* application of 12 strains with probiotic potential in the culture of *Artemia sp* (*in vitro*), of the genus *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* and *Psychrobacter cibarius* in order to improve the efficiency hatching and the microbiological quality of the nauplius breeding waters, among the 12 strains, 3 strains were inoculated into two different microalgae (*Spirulina* and *Chlorella*) to improve the growth and survival rate of *Artemia*. The results obtained showed that the two strains 8' and S'2 significantly

improved ($P < 0.05$) the hatching efficiency, the strains 8', S33, S7, S1, S'10 and S'2 decreases the load of gram-negative bacteria such that: *Pseudomonas aeruginosa* was removed by S33 and 8', *Enterobacter cloacae* by S1, S'10 and S'2, *Pasteurella pneumotropica* by S7, S33 and 8' and on the other hand the development of certain flora beneficial for *Artemia*, such as: the proliferation of *Stenotrophomonas maltophilia* in the presence of the strain S2, 8' and 3. The results of the integration of the three probiotic strains to the two microalgae, revealed that the size of nauplius fed by the *Chlorella* inoculated with strain 8' improved the two parameters TL and TF and the size of nauplii fed by *Spirulina* inoculated by strain 8' and S33 improved the TF parameter. The survival rate study was limited because commercial individuals with a short life span were used. We find that the strains tested found in vitro appear to have probiotic effects in vivo in the culture of *Artemia*. These beneficial effects must be studied in greater depth in order to elucidate their mode of action.

Key words: Probiotic, *Artemia*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium* and *Psychrobacter cibarius*..

المخلص:

يهدف العمل الحالي إلى التطبيق الحي في تربية الأرتيميا 12 بروبيوتيك تنتمي إلى فصيلة *Psychrobacter cibarius* *Enterococcus faecium* *Enterococcus durans* من أجل تحسين كفاءة الفقس والجودة الميكروبيولوجية لمياه تربية نوبليوس وتحسين معدل النمو والبقاء على قيد الحياة رتيميا. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن السلالتين 8' S'2 (0.05 > P) S7 S33 8' S'10 S1 S'2 يقلل من حمل البكتيريا مثل: تمت إزالة *Pseudomonas aeruginosa* 8' S33 *Enterobacter cloacae* 8' S33 S7 *Pasteurella pneumotropica* S'2 S'10 S1 ناحية أخرى تطور بعض البكتيري المفيدة لأرتيميا ، مثل: انتشار الميتوفيليا الضيقة في وجود سلالة S2 8' 3. نتائج تكامل ثلاث سلالات بروبيوتيك إلى الطحالب الدقيقة أن حجم الارتيما المغذاه بـ يلا 8' تحسين كل TL TF 8' S33 سلالات تستكمل مع سبيرولينا TF. نجد أن السلالات التي تم اختبارها في المختبر يبدو أنها آثار بروبيوتيك في الجسم الحي في ثقافة ارتيميا. يجب دراسة هذه التأثيرات المفيدة بتعمق أكبر من أجل توضيح طريقة عملها.

الكلمات المفتاحية: البروبيوتيك ، الأرتيميا، *Enterococcus faecium* *Enterococcus durans* *Psychrobacter cibarius*.

