

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE AKLI MOHAND OULHADJ – BOUIRA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2023

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**
Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présenté par :

M^r BOUDHANE Faïçal Abdelhak

Thème

Etude de la diversité bactérienne chez l'oursin violet
Paracentrotus lividus

Soutenu le : 27/ 06/ 2024

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
<i>M^r REMINI Hocine</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Président</i>
<i>M^{me} BENBARA Tassadit</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M^{me} DJENADI Katia</i>	<i>MCB</i>	<i>Univ. de Bouira</i>	<i>Promotrice</i>
<i>M^r BERRAH Anis</i>	<i>Docteur Vétérinaire</i>	<i>Institut Pasteur d'Alger</i>	<i>Co-promoteur</i>

Année Universitaire : 2023/2024

*“ You can be anything you want to be, just turn yourself
into anything you think that you could ever be„.*

Freddie Mercury...

Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord notre Dieu Allah, le tout Puissant de m'avoir donné la bonne santé, la patience, la force et la volonté pour terminer humblement ce travail.

*J'adresse ma vive gratitude et mes sincères remerciements à ma chère promotrice **D^r DJENADI Katia**, qui a toujours été à mes côtés, faisant preuve d'une écoute attentive et d'une disponibilité exemplaire tout au long de la réalisation de mon projet. Je lui suis reconnaissant pour son inspiration, sa motivation, sa patience et le temps précieux qu'elle m'a consacré.*

*Je suis infiniment et éternellement reconnaissant, au plus profond de mon être, à mon co-promoteur **D^r BERRAH Anis**, à qui je dois une immense gratitude. Il a été là pour moi de tout cœur, fournissant une aide inestimable pour atteindre mon objectif. Sa générosité et son soutien indéfectible ont été d'une importance capitale dans mon parcours.*

*Je tiens à exprimer mes remerciements les plus sincères aux membres du jury : **D^r REMINI Hocine** qui a honoré de sa présence ma soutenance et **D^r BENBARA Tassadit** qui a consacré tout son temps pour examiner mon travail. Je me considère extrêmement chanceux d'avoir eu l'occasion de bénéficier de votre expertise et de votre participation en tant que membres du jury.*

*Je remercie chaleureusement, le **P^r BENEDEDDOUCHE Badis**, chef de Laboratoire de Bactériologie des Aliments, des Eaux et de l'Environnement de l'Institut Pasteur d'Alger, pour ses précieux conseils, qui ont été d'une importance incommensurable. Je suis honoré d'avoir bénéficié de sa précieuse expertise et de sa générosité inébranlable.*

*Ma profonde reconnaissance va à toute l'équipe du Laboratoire de Bactériologie des Aliments, des Eaux et de l'Environnement, qui m'a accueillie à bras ouvert et soutenue tout au long de mon stage. Je tiens en particulier à remercier sincèrement **M^{me} Amina**, pour ses encouragements constants qui m'ont fait avancer avec détermination. Sa passion pour la recherche et son soutien inestimable ont été un pilier essentiel de mon succès. Je remercie également chaleureusement, **M^{me} Rachida**, **M^{me} Hamida**, **M^{me} Hissan**, **M^{me} Nora**, **M^{me} Nawel**, **M^{me} Soumia**, **M^r Karim** et bien d'autres membres de cette équipe exceptionnelle. Leur aimable accueil, leur soutien indéfectible et leur esprit de famille seront gravés à jamais dans mon cœur. Je suis infiniment reconnaissant d'avoir eu la chance de les rencontrer.*

*Je tiens à exprimer mes chaleureux remerciements à **tous mes enseignants**, qui m'ont accompagné tout le long de mon cursus universitaire.*

*Ces remerciements vont également au **corps professoral et administratif** de la faculté **SNV-ST** de l'université **Akli Mouhand Oulhadj** de Bouira pour tous les efforts procurés pour assurer aux étudiants une formation actualisée.*

Dédicace

Je remercie Dieu, qui illumine ma route à chaque lever, qui me guide sur le droit chemin, qui approfondit et renforce ma foi et qui a fait de moi ce que je suis,

Je dédie ce travail,

À mes chers parents, Kamal et Malika, ma vie de bonheur. Leur patience sans fin, leur compréhension et leur encouragement sont pour moi le soutien indispensable qu'ils ont toujours su m'apporter. Je vous dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester votre fierté. Que Dieu le tout Puissant vous protège.

À ma chère grand-mère Yamna, ma source de tendresse. Que ce travail, soit l'expression des vœux que tu n'as jamais cessé de formuler dans tes prières. Que Dieu te préserve ta santé et te procure une longue vie.

À ma chère sœur Ryma. Que Dieu le plus Puissant te garde et exhausse tous tes vœux.

À mes oncles, mes tantes, ma grande famille, mon cher trésor. Que Dieu vous bénit.

À ma promotrice M^{me} DJENADI Katia, la bouffée d'oxygène qui me ressource toujours dans les moments pénibles, Je prie Dieu le tout Puissant pour qu'il vous donne bonheur et prospérité.

À tous ceux qui sont proches de mon cœur et dont je n'ai pas cité le nom.

À ceux qui consacrent leur vie à rendre ce monde meilleur.

À vous tous, je présente mes remerciements, mon respect et ma gratitude.

*Faical Abdelhak
Merci ...*

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction 01

Recherche bibliographique

Du microbiote à l'hôte Echinoidea (oursin)

Chapitre I: L'oursin (*Paracentrotus lividus*)

I. L'oursin (*Paracentrotus lividus*) 03

I.1. Description..... 03

I.2. Taxonomie 04

I.3. Habitat, écologie et répartition géographique..... 05

I.4. Anatomie..... 07

I.4.1. Anatomie externe 08

I.4.2. Anatomie interne 09

I.5. Importance 10

Chapitre II : Concepts clés pour la compréhension des relations

hôte, microbiote et environnement

II. Concepts clés pour la compréhension des relations hôte, microbiote et environnement... 12

II.1. Microbiome 12

II.2. Microbiote 13

II.2.1. Diversité des microbiotes chez l'oursin 14

II.2.2. Dynamique de la communauté microbienne de l'oursin..... 17

II.2.3. L'impact de l'environnement sur le microbiote de l'oursin..... 17

Partie expérimentale

Chapitre III: Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes 19

III.1. Les sites d'échantillonnage..... 19

III.1.1. Les Aiguades 20

III.1.2. La Brise de mer..... 21

III.2. La récolte du matériel biologique 21

III.3. Caractéristiques morphologiques des oursins..... 22

III.4. Dissection des oursins et extraction des organes..... 23

III.5. Aspect macroscopique des organes 23

III.6. Etude de la diversité bactérienne des microbiotes de <i>Paracentrotus lividus</i>	24
III.6.1. Dénombrement de la flore mésophile totale	24
III.6.2. Isolement et purification bactérienne	25
III.6.3. Identification des isolats bactériens	26
III.6.3.1. La détermination de l'aspect macroscopique des isolats	27
III.6.3.2. La détermination de l'aspect microscopique des isolats	27
III.6.3.3. Identification enzymatique des isolats bactériens	28
III.6.3.4. Caractère hémolytique	29
III.6.3.5. Identification biochimique des isolats bactériens	30

Chapitre IV: Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion	34
IV.1. Caractéristiques morphologiques des oursins	34
IV.2. Aspect macroscopique des organes	36
IV.3. Diversité bactérienne des microbiotes de <i>Paracentrotus lividus</i>	37
IV.3.1. Dénombrement de la flore mésophile totale	37
IV.3.2. Evaluation de la diversité du microbiote de l'oursin	38
IV.3.3. La caractérisation phénotypique du microbiote de l'oursin	40
Conclusion	59

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

LISTE DES ABREVIATIONS

ADH : L'arginine dihydrolase

ADN : L'acide désoxyribonucléique

AI 1: Oursin 1 des aiguades

API 20E: Appareils et Procédés d'Identification des *Enterobacteriaceae* et apparentés

API 20NE : Appareils et Procédés d'Identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux

API 50 CHB : Appareils et Procédés d'Identification pour *Bacillus* et apparentés

API Staph : Appareils et Procédés d'Identification des *Staphylococcus*, *Micrococcus* et apparentés

API : Appareils et Procédés d'Identification

B1: Oursin 1 de la brise

BHIB : Bouillon cœur-cerveau

CIT : Citrate

EMB : Eosin Methylene Blue

EPT : Eau peptonée tamponnée stérile

ESC : Esculine

GAI 1 : Gonades d'oursin 1 des aiguades

GB 1: Gonades d'oursin 1 de la brise

GEL : Gélatine

GLU : Glucose

IND : Indole

MRS : De Man, Rogosa, Sharpe

NaCl : Chlorure de sodium

NIT1 : Nitrate de potassium 01

NIT2 : Nitrate de potassium 02

NO₃ : Potassium nitrate

PAC : Acide phénylacétique

PAL : Phosphatase alcaline

PCA : Plate Count Agar

PNPG : Para-NitroPhényl-βD-galactopyranosidase

SM : Suspension mère

TDA : Tryptophane désaminase

TRP : Tryptophane

UFC : Unité formant colonie

URE : Urée

VP : Voges Proskauer

Zn : Zinc

ZYM A : Réactif A utilisé avec les galeries API Staph

ZYM B : Réactif B utilisé avec les galeries API Staph

LISTE DE FIGURES

Figure n°01 : Oursin violet « <i>Paracentrotus lividus</i> » couvert de débris	04
Figure n°02: Répartition géographique de l’oursin violet « <i>Paracentrotus lividus</i> ».....	07
Figure n°03 : Anatomie externe de l’oursin comestible « <i>Paracentrotus lividus</i> ».....	09
Figure n°04: Anatomie interne de l’oursin livide « <i>Paracentrotus lividus</i> ».....	10
Figure n°05 : Proportions des études menées sur le microbiote des invertébrés marins en fonction du <i>phylum</i> concerné	12
Figure n°06: Un schéma mettant en évidence la composition du microbiome.....	13
Figure n°07: Facteurs influençant le microbiote de l’oursin violet <i>Paracentrotus lividus</i>	18
Figure n°08: Localisation géographique de la zone d’échantillonnage 1 « Les Aiguades » ..	20
Figure n°09: Localisation géographique de la zone d’échantillonnage 2 « Brise de mer »....	21
Figure n°10: Les différentes étapes d’échantillonnage	22
Figure n°11: Dissection des oursins et extraction des organes	23
Figure n°12: Les étapes de la préparation des dilutions décimales	24
Figure n°13: Principe et résultat de la méthode d’isolement en quadrant.	26
Figure n°14: Les différentes étapes de la coloration de Gram.....	28
Figure n°15: Résultats de dénombrement bactérien effectué sur milieu PCA.....	37
Figure n°16: Pourcentage des isolats obtenus sur chaque milieuensemencé.....	38
Figure n°17: La macromorphologie des isolats sur les différents milieux de culture testés...	40
Figure n°18 : Etat frais d’une colonie isolée sur milieu Baird Parker	41
Figure n°19: Pourcentage des espèces bactériennes mobiles et immobiles isolées.....	41
Figure n°20: Coloration de Gram de quelques isolats	42
Figure n°21: Les proportions de bactéries Gram positives et Gram négatives obtenues.....	42
Figure n°22: Recherche d’une catalase.....	43
Figure n°23: Pourcentage des espèces ayant une oxydase positive ou négative obtenus.....	43
Figure n°24: Test d’oxydase	44

Figure n°25: Recherche d'une coagulase.....	44
Figure n°26: Caractère hémolytique de quelques isolats	45
Figure n°27: Pourcentage des isolats ayant une hémolyse α , β et γ	45
Figure n°28: Galerie API 20E appliquée pour l'identification des entérobactéries.....	47
Figure n°29: Galerie API 20NE appliquée pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires	47
Figure n°30: Galerie API Staph appliquée pour l'identification des staphylocoques et microcoques isolés sur Baird Parker, MRS et Mossel	48
Figure n°31: Galerie API 50 CHB appliquée pour l'identification des <i>Bacillus</i> et apparentés isolés sur milieu MRS et Mossel.....	48
Figure n°32: Principaux <i>phyla</i> composant le microbiote de l'oursin <i>P. lividus</i> isolés sur deux sites différents	50
Figure n°33: Pourcentage des principaux <i>phyla</i> composant le microbiote de l'oursin <i>P. lividus</i>	50
Figure n°34: Les <i>phylums</i> isolés des organes étudiés provenant de deux sites différents	51
Figure n°35: Les souches bactériennes isolées par analyse culture-dépendante	53
Figure n°36: Nombre de souches bactériennes communes et uniques présentées dans les organes (tube digestif et gonades) de l'oursin <i>P. lividus</i> collectés sur deux sites différents. Des diagrammes de Venn ont été construits en tenant compte de toutes les souches bactériennes identifiées	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Position taxonomique de <i>Paracentrotus lividus</i>	05
Tableau II : Rôles probables des bactéries isolées chez <i>P. lividus</i>	16
Tableau III : Coordonnées GPS avec les données climatiques des zones d'étude.....	19
Tableau IV: Caractéristiques morphologiques des individus d'oursin échantillonnés.....	35
Tableau V: Aspect macroscopique des organes extraits.....	36
Tableau VI: Les espèces bactériennes identifiées à l'aide des galeries biochimiques	46

Introduction

Il y a cent millions de fois plus de bactéries dans les océans qu'il y a d'étoiles dans l'univers connu ! En fait, la vie sur terre est apparue dans les océans, il y a environ 3,5 milliards d'années. Cette première trace de vie unicellulaire est constituée de simples cellules d'organismes procaryotes : les bactéries (Boraïy, 2018).

Au fil des millions d'années, les organismes marins ont su développer des stratégies adaptatives pour gérer un environnement changeant et parfois envahissant. S'étendant grâce à une interaction dynamique d'éléments antagonistes à des éléments coopératifs, les organismes eucaryotes marins sont devenus les hôtes d'une communauté vaste et complexe de microorganismes jouant un rôle important dans la nutrition, la réponse aux stimuli environnementaux, la résistance aux maladies et l'évolution, ainsi que la défense chimique contre les prédateurs et les concurrents (Faddetta *et al.*, 2020).

Le royaume microscopique existant au sein du système digestif et reproducteur des êtres vivants recèle des énigmes captivantes affectant profondément leur bien-être et leur vitalité. Son importance cruciale est désormais reconnue quant au maintien de l'équilibre physiologique, à l'influence sur le comportement et même à la prévention des maladies via la synthèse des métabolites secondaires ayant des activités anti-tumorales, anti-inflammatoires, antibiotiques et antifongiques, particulièrement intéressantes dans les campagnes de découverte de médicaments (Danks et Smith, 2017 ; Faddetta *et al.*, 2020).

L'étude des microbiotes des invertébrés marins, notamment les échinodermes, remonte au XIX^{ème} siècle (Laguerre, 2021). En effet, les études réalisées entreprennent l'abondance microbienne et la diversité du système digestif d'espèces distinctes, telles que : *Echinocardium cordatum*, *Lytechinus variegatus* et *Paracentrotus lividus* (Thorsen *et al.*, 2003 ; Meziti *et al.*, 2007 ; Hakim *et al.*, 2015 ; Hakim *et al.*, 2016).

De nos jours, la diversité des microbiotes ainsi que la complexité des relations entre ces invertébrés marins, leur microbiote et leur environnement a pu être appréhendée grâce à l'avènement de nouvelles techniques telles que les empreintes moléculaires et le séquençage (Chiarello, 2017).

À l'heure actuelle, cette espèce est définie comme un très bon bioindicateur de la pollution marine permettant à la fois de détecter le stress biotique et abiotique ainsi que de fournir une indication sur la santé de son environnement. Par conséquent, *Paracentrotus lividus* a suscité son importance dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes marins (Quetglas-Llabrés *et al.*, 2020 ; Khaili *et al.*, 2024).

En raison de sa valeur nutritive marquée, de son importance socio-économique, de sa sensibilité aux changements environnementaux et de son potentiel pharmacologique (une source de métabolites secondaires biologiquement actives ayant un effet antibactérien, antifongique, anti-oxydant, anti inflammatoire etc.), *P. lividus* a suscité une préoccupation mondiale faisant l'objet de diverses études (Pozharitskaya *et al.*, 2015 ; Khaili *et al.*, 2024). Cependant, l'étude de la diversité du microbiome de *P. lividus* reste timide (Faddetta *et al.*, 2020).

À cet effet, nous nous sommes intéressés à la biodiversité des microbiotes chez l'oursin violet *P. lividus* et à l'évaluation du niveau de contamination environnementale de deux sites géographiques distincts, choisis pour leur proximité avec une baie à forte densité de population et avec une réserve naturelle protégée.

L'objectif de notre travail se base sur la caractérisation de la diversité du microbiome bactérien et de définir ses niveaux de variabilité, son importance à l'échelle de l'écosystème et déceler les secrets entourant sa composition, ouvrant ainsi la voie à de futurs projets de recherche passionnants.

Par conséquent, afin d'explorer les différentes facettes de la biodiversité des microbiotes d'oursins, nous avons emprunté une approche phénotypique comportant des techniques d'observation pour identifier les caractéristiques perceptibles de divers taxons microbiens. Les résultats obtenus seront ensuite validés par une analyse biochimique offrant ainsi une compréhension plus holistique des microbiotes étudiés.

Ce document est structuré en quatre grands chapitres. Les deux premiers chapitres consistent en une revue bibliographique mettant en avant l'importance de l'échinoïde modèle *P. lividus*, la diversité, la dynamique et le rôle crucial de ses microbiotes. La partie expérimentale, inclut un troisième chapitre destiné à décrire la démarche générale à poursuivre et les différentes approches disponibles pour identifier les communautés bactériennes de nos échantillons, et un quatrième dédié à présenter et discuter l'ensemble des résultats obtenus pour aboutir à une conclusion.

Partie théorique

**Du microbiote à l'hôte
Echinoidea (oursin)**

Chapitre I

L'oursin *(Paracentrotus lividus)*

Depuis les temps les plus reculés *Paracentrotus lividus*, plus communément appelé « oursin violet » ou « châtaigne de mer », a suscité l'intérêt de l'Homme (Marlétaz *et al.*, 2023). En raison de son abondance au niveau de l'étage infralittoral et de l'impact de son comportement alimentaire souvent plus sélective sur le phytobenthos marin, il joue un rôle prépondérant dans la genèse du paysage végétal sous-marin (Barrier *et al.*, 2024).

Les premiers vestiges de sa consommation ont vu le jour dès le néolithique. Cependant son commerce en méditerranée existait déjà dans l'antiquité grecque (Allain, 1975). C'est l'un des rares animaux à être herbivores et à brouter les algues des rochers à savoir : algues vertes et même algues : coriace encroûtantes brunes ou rouges sur lesquels il niche (Isidro, 2017 ; Milito *et al.*, 2020).

Depuis 1987, les populations d'oursins comestibles *Paracentrotus lividus* devenant de moins en moins importantes et la diminution spectaculaire de leurs stocks semble s'observer sur les côtes méditerranéennes. Ce dernier est lié à une forte pression due à la pêche amateur et professionnelle, à la destruction des habitats par les aménagements du littoral et notamment la pollution urbaine et industrielle (Allain, 1972 ; Régis *et al.*, 1985 ; Le Gall, 1987 ; Ciriminna *et al.*, 2021).

Ce chapitre vise à identifier avec précision « *Paracentrotus lividus* » dit oursin violet, par le biais d'un inventaire suffisamment détaillé (description, taxonomie, anatomie et importance).

I.1. Description

Derrière un aspect banal et piquant se cache une espèce ayant un rôle écologique clé. Capable de consommer une grande quantité de végétation marine benthique (Abadie, 2023 ; Bertucci *et al.*, 2023), *Paracentrotus lividus* formé d'une coque calcaire appelée « test », recouverte de piquants est reconnaissable à sa forme très arrondie et ses piquants courts, peu acérés, de couleur violette, verte ou brune ayant une extrémité blanche. C'est un brouteur herbivore pouvant atteindre 8cm de diamètre, vivant sur les pierres, les algues coralligènes, les rochers et qui se couvre souvent d'algues et de débris de coquilles (Bay-Nouailhat, 2005 ; Boudouresque et Verlaque, 2013 ; Shikov *et al.*, 2018).

Paracentrotus lividus, est un échinoderme subsphérique régulier, sans bras, à symétrie penta-radiale. Cette dernière est acquise en second lieu, lors de la métamorphose de ses larves ayant une symétrie bilatérale et enfermées dans un test rigide, le « dermosquelette », formé de plaques calcaires imbriquées.

La bouche et l'anus de cet oursin comestible étant situés aux deux pôles et son pouvoir régénératif est assez limité (Figure n°01) (Tortonese et Vadon, 1987 ; Wirtz et Debelius, 2003 ; Hermas *et al.*, 2018 ; Marlétaz *et al.*, 2023).



Figure n°01 : Oursin violet « *Paracentrotus lividus* » couvert de débris (Noyer *et al.*, 2021).

I.2. Taxonomie

Apparu il y a 520 millions d'années (Lago et Paredes, 2023), l'oursin violet est l'un des anciens invertébrés marins benthiques appartenant au clade des échinodermes suscitant la curiosité des scientifiques depuis l'Antiquité (Verlaque et Nédelec, 1983 ; Wirtz et Debelius, 2003 ; Agnello, 2017 ; Marlétaz *et al.*, 2023).

La classification des échinodermes est en perpétuelle évolution. De par leur position évolutive, ils représentent un lien entre les invertébrés et les vertébrés, occupent une position phylogénétique stratégique et constituent ainsi l'un des systèmes modèles les plus adaptés en biologie du développement (Agnello, 2017 ; Chiaramonte *et al.*, 2021 ; Thompson *et al.*, 2021 ; Brundu *et al.*, 2023 ; Marlétaz *et al.*, 2023).

Paracentrotus lividus appartient à la classe des échinoïdes et au phylum des échinodermes comprenant environ 1000 à 7000 espèces morphologiquement variés. Ce phylum est réparti en cinq classes principales, entre autres les astéroïdes, les crinoïdes, les ophiuroïdes, les holothuries et les échinoïdes (Pinsino et Matranga, 2015 ; Lago et Paredes, 2023).

Récemment, avec l'avènement de la biologie moléculaire, des études moléculaires soutiennent l'existence d'une autre classe pour ce phylum, à savoir les Asterozoa, un clade ophiuroïde/astéroïde (Pinsino et Matranga, 2015 ; Agnello, 2017).

Parmi les classes d'échinodermes, les échinoïdes dont *Paracentrotus lividus* fait part,

forment un groupe marin très prospère (Pinsino et Matranga, 2015). Cette espèce est localisée dans un grand nombre d'océans et à différents niveaux d'altitudes allant de l'Arctique à l'Antarctique. Elle peut envahir divers substrats et s'étendant de la surface jusqu'à plus de 6000 mètres de profondeur (Yakota, 2002 ; Figueiredo *et al.*, 2016 ; Agnello, 2017 ; Machado *et al.*, 2022). Le genre type de cette classe est *Paracentrotus* et sa position taxonomique est comme suit :

Tableau I: Position taxonomique de *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816 ; Tortonese et Vadon, 1987).

	Nom scientifique	Descriptif
▪ Règne	<i>Animalia</i>	–
▪ Embranchement	<i>Echinodermata</i>	- Symétrie pentaradiaire. - Dermosquelette calcaire. - Système aquifère doté de podia visibles.
▪ Sous-embranchement	<i>Echinozoa</i>	- Echinoderme non étoilé de forme allongée ou globuleuse.
▪ Classe	<i>Echinoidea</i>	- Forme globuleuse ou hémisphérique. - Squelette portant des appendices. - Pouvoir régénératif limité.
▪ Sous-classe	<i>Regularia</i>	
▪ Super ordre	<i>Echinacea</i>	- Dix plaques péristomiales.
▪ Ordre	<i>Diadematoida</i>	–
▪ Sous-ordre	<i>Camarodonta</i>	–
▪ Famille	<i>Echinidae</i>	–
▪ Genre	<i>Paracentrotus</i>	–
▪ Espèce	<i>Paracentrotus lividus</i>	–

I.3. Habitat, écologie et répartition géographique

Originnaire de la mer méditerranée et de l'océan Atlantique tempéré Est, *Paracentrotus lividus* présente une vaste distribution géographique, colonisant ainsi des biotopes très hétérogènes (Figure n°02) (Couvray, 2014 ; Hermas *et al.*, 2018 ; El Idrissi^a *et al.*, 2020).

De l'Écosse à l'Irlande du nord jusqu'au sud du Maroc et aux îles Canaries, en passant par les archipels des Açores et de Madère ; l'oursin livide habite les mares rocheuses

intertidales et la boue, les récifs coralliens subtidaux et les herbiers marins. *Paracentrotus lividus* est localisé dans les zones moins profondes atteignant les 80m de profondeur. Ces sites donnent pour l'individu une résistance au ressac ainsi qu'une protection des courants et d'éventuels prédateurs. Toutefois, retrouver cette espèce à d'autres profondeurs est possible (De La Uz *et al.*, 2018 ; Hermas *et al.*, 2018 ; Duchaud *et al.*, 2021 ; Machado *et al.*, 2022 ; Nicolau *et al.*, 2022 ; Elmasry *et al.*, 2023).

Paracentrotus lividus se caractérise par une forte plasticité phénotypique, ce qui donne la possibilité de s'adapter à un large éventail de conditions environnementales, notamment : l'hydrodynamisme, la température, la qualité environnementale ainsi que la quantité et la qualité de nourriture disponible (Fernandez et Boudouresque, 1997 ; Couvray, 2014).

Son succès, attesté par leur répartition mondiale dans plusieurs environnements océaniques à différentes profondeurs, latitudes et températures. Ce dernier est lié sa capacité de survivre dans des conditions défavorables, grâce à : une structure de défense épineuse, un système de défense immunitaire, un système antitoxine et son aptitude à faire face à l'exposition continue à des facteurs environnementaux tels que les fluctuations de température et de pH, l'anoxie, la prédation, les germes pathogènes, les métaux, et autres formes de pollutions (Pinsino et Matranga, 2015 ; Agnello, 2017 ; Fernández-Boo *et al.*, 2018 ; Casal *et al.*, 2020).

Dans la majeure partie de sa zone de répartition géographique, *P. lividus* est considéré comme une espèce clé dans le fonctionnement des écosystèmes sublittoraux soit comme herbivore vorace et généraliste, soit comme proie de nombreux poissons (étoiles de mer, mollusques etc.). *P. lividus* est fréquent dans les régions là où les températures de l'eau varient entre 4°C à 30°C (de 18 à 25°C en été et entre 10 à 15°C en hiver) (Boudouresque et Verlaque, 2013 ; Boudouresque et Verlaque, 2020 ; Le Gall *et al.*, 2020 ; Bouiba^a *et al.*, 2024).

L'oursin régulier est un organisme adoptant un mode de vie nocturne en raison de sa sensibilité à la lumière et pouvant survivre dans des lagunes à des salinités comprises entre 15 et 40 (Boudouresque et Verlaque, 2007 ; Agnello, 2017 ; García *et al.*, 2018 ; Santos *et al.*, 2022).

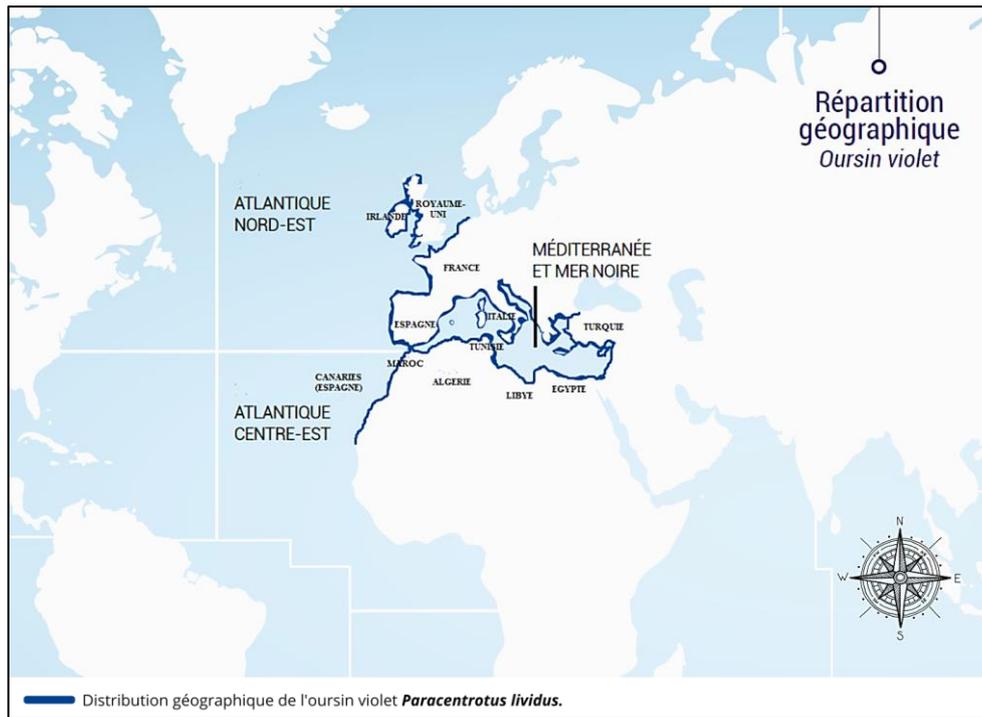


Figure n°02 : Répartition géographique de l'oursin violet « *Paracentrotus lividus* » (lien 01 (modifié)).

I.4. Anatomie

Les échinoïdes réguliers, de quelques centimètres de diamètre, sont généralement globulaires, discoïdaux ou en forme de cœur possédants un squelette constitué de nombreuses plaques calcaires (Thompson *et al.*, 2021). Les échinoïdes réguliers, comme l'oursin, se distinguent facilement des échinides irréguliers par leur corps sphérique, une symétrie radiale et la localisation centrale de l'anus, au-dessus de la bouche (Agnello, 2017 ; Hermas *et al.*, 2018).

Les épines, généralement longues, sont utilisées pour la locomotion, pour la défense passive contre les prédateurs et pour piéger les particules de nourriture flottantes. Les pieds tubulaires sont situés parmi les épines et sont utilisés pour déplacer, capturer la nourriture et se fixer aux substrats.

Une mâchoire piquante formée de petites pinces, appelée « pédicellaire », est également utilisée pour se protéger et capter les aliments. La bouche est située sous l'organisme et est constituée d'une mâchoire à cinq pointes appelée « lanterne d'Aristote » (Agnello, 2017).

I.4.1. Anatomie externe

Selon les conditions environnementales qui prévalent dans leurs habitats, les populations d'oursins comestibles présentent souvent des différences morphologiques et physiologiques (Casal *et al.*, 2020 ; Santos *et al.*, 2022 ; Bouiba^a *et al.*, 2024). Plaques ambulacraires, péristome, lanterne, appareil apical, pédicellaires et piquants, sont les critères les plus importants pour l'identification des espèces (Sellem et M'rabet, 2002).

Paracentrotus lividus, est un échinoderme régulier mesurant 7 à 8 cm de diamètre, exclusivement marin, unicolore (corps majoritairement rouge, orange, noir, marron, blanc et violet) et appartenant aux coelomates deutérostomiens (Wirtz et Debelius, 2003 ; Boudouresque et Verlaque, 2013 ; Boudouresque et Verlaque, 2020). La châtaigne de mer se caractérise par une symétrie pentaradiaire, composée de cinq régions ambulacraires et cinq régions inter-ambulacraires portant respectivement les pieds ambulacraires et les piquants. L'axe de symétrie du corps traverse la bouche et l'anus déterminant ainsi les pôles oraux où se trouve l'appareil masticateur appelée « Lanterne d'Aristote » (Figure n°03) (Thompson *et al.*, 2021 ; Formery *et al.*, 2022).

Paracentrotus lividus doté d'un squelette calcaire continu formé de plaques soudées, nommé « le test d'oursin » (Thompson *et al.*, 2021). Ce dernier se caractérise par une forme arrondie avec un contour circulaire, peu élevé, aplati en face ventrale et hérissé portant différents appendices (Noyer *et al.*, 2021). Les piquants répartis sur tout le corps, assez longs, autour de 3cm, sont pointus, lisses, épais et de forme très diverse. Ils présentent une couleur allant du vert olive au brun, en passant par différentes nuances de violet (Elmasry *et al.*, 2023). Les piquants jouent un rôle dans la protection, la défense et la locomotion (Rouane, 2013). Les podias ou encore dites « pieds ambulacraires », servent à la locomotion, à la respiration, à la fixation et capture de la proie. Ils peuvent s'allonger ou se rétracter et se terminent généralement par une ventouse. Les podias ainsi que les piquants peuvent participer à l'ancrage de l'oursin sur son substrat (Sugni *et al.*, 2013).

Les pédicellaires sont des petits organes calcifiés, en forme de pinces et fixés sur le test entre les piquants. Ils sont munis de glandes à venin ayant des fonctions multiples, entre autres : capturer la proie, nettoyer le test, se défendre, ...etc. (Sugni *et al.*, 2013).

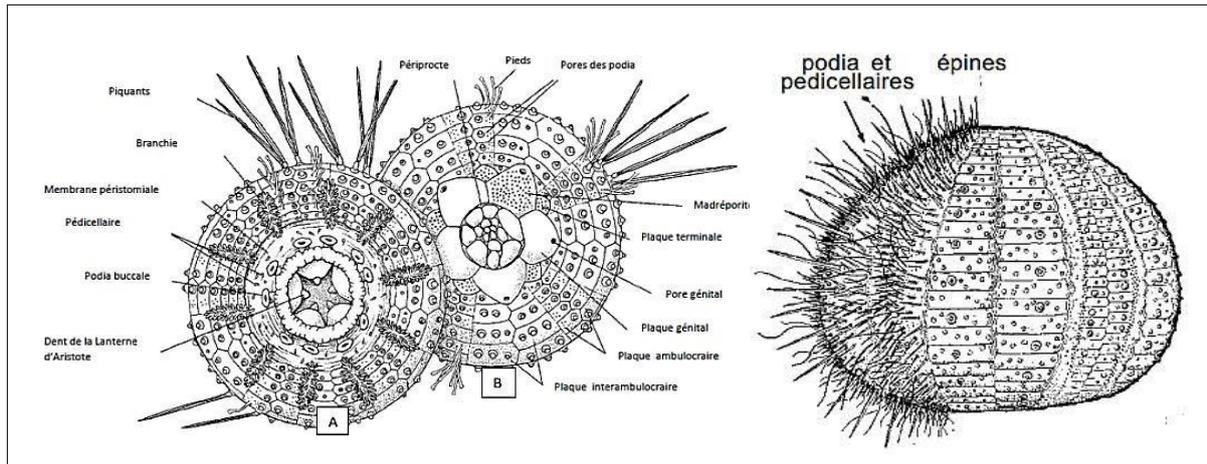


Figure n°03 : Anatomie externe de l'oursin comestible « *Paracentrotus lividus* ». (A) : face orale et (B) : face aborale (Tortonese et Vadon, 1987 ; Grosjean, 2001).

I.4.2. Anatomie interne

Chez tous les oursins réguliers, la cavité cœlomique est remplie en grande partie par les organes digestifs et reproducteurs (Figure n°04). Le système digestif comporte une structure particulière appelée « lanterne d'Aristote », formée par un ensemble de plaques calcaires, des dents externes et de muscles. L'intestin long et contourné qui lui fait suite, se termine par un anus dorsal entre les plaques du périprocte (Sugni *et al.*, 2013).

Le système aquifère possède une organisation typique. En effet, l'anneau ambulacraire est situé au-dessus de la lanterne et est relié par le canal du sable au madréporite et aux canaux radiaires situés sous les zones ambulacraires. Les vésicules de Poli sont généralement petites, sauf chez quelques espèces (Formery *et al.*, 2022).

L'appareil reproducteur est formé généralement de cinq gonades en position interradiariaire. Chacune est reliée à l'extérieur par un conduit génital menant au port de la plaque génitale. Le plus souvent, les sexes sont séparés (Chiarore *et al.*, 2020). Cependant, des cas d'hermaphrodisme chez plusieurs espèces méditerranéennes peuvent être rencontrés (Tortonese et Vadon, 1987).

Paracentrotus lividus est un organisme ovipare ayant un cycle de vie benthopélagique, composé d'un développement larvaire pélagique et des stades benthiques juvéniles et adultes. La fécondation de ses œufs est externe et les larves pluteus ou « echinopluteus » sont planctoniques jusqu'à leur métamorphose en juvéniles benthiques (Barrier *et al.*, 2024).

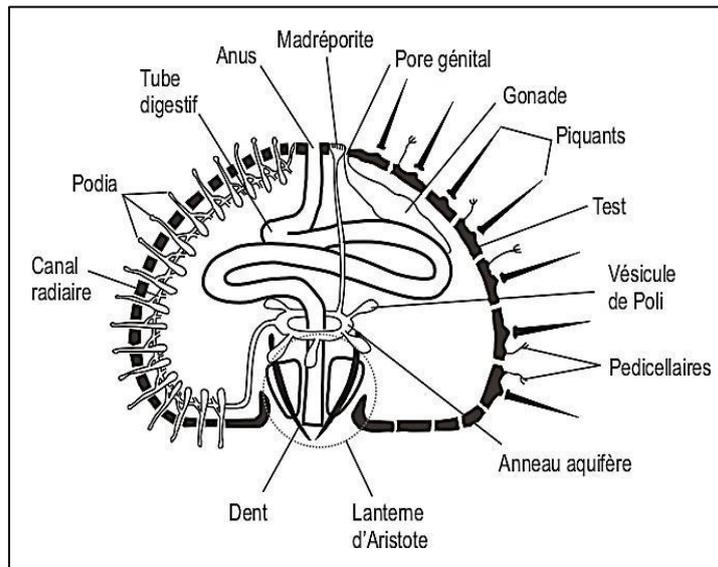


Figure n°04 : Anatomie interne de l'oursin livide « *Paracentrotus lividus* » (Quéro, 1984).

I.5. Importance

À travers les siècles, l'oursin violet a été considéré comme un système modèle clé pour élucider une variété de problèmes classiques de développement, notamment la fécondation, le clivage, la gastrulation et la régulation de la différenciation chez l'embryon précoce. Ayant un vaste répertoire de molécules outils valables, l'oursin livide est largement utilisé pour découvrir et comprendre les mécanismes moléculaires et régulateurs de base des réponses immunitaires (Agnello, 2017 ; Fernández-Boo *et al.*, 2018 ; Albrizio *et al.*, 2019 ; Tacconi *et al.*, 2022 ; Brundu *et al.*, 2023).

De nos jours, avec l'avènement de la biologie moléculaire, *Paracentrotus lividus* est l'échinoïde le plus exploité dans la biologie évolutive expérimentale, fournissant ainsi un bon modèle pour reproduire les étapes évolutives intermédiaires (Agnello, 2017 ; Lago *et al.*, 2024).

Faisant partie des organismes appropriés pour les études éco-toxicologiques comme alternative aux vertébrés, *P. lividus* est considéré comme un excellent bioindicateur de santé marine, ainsi qu'un outil important en biosurveillance aquatique (El Idrissi ^b *et al.*, 2022 ; Gambardella *et al.*, 2023 ; Viel *et al.*, 2024).

À l'heure actuelle, l'utilisation de l'oursin violet connaît un renouveau exceptionnel dans l'évaluation de plusieurs volets à savoir : l'impact anthropique sur l'écosystème marin, la toxicité des molécules environnementales et chimiques et les facteurs de stress dans les écosystèmes naturels (Agnello, 2017 ; Parra-Luna *et al.*, 2020 ; Gambardella *et al.*, 2021 ; Bertucci *et al.*, 2023).

Cette tendance croissante à utiliser cet oursin a été favorisée par son rôle écologique dans la structuration des communautés benthiques et sa capacité de détecter à la fois le stress biotique et abiotique ainsi de reconnaître, transformer et éliminer de nombreuses matières potentiellement nocives (Agnello, 2017 ; Quetglas-Llabrés *et al.*, 2020 ; Fouad *et al.*, 2021 ; Nicolau *et al.*, 2022).

Très estimé depuis toujours pour la qualité gustative de ses gonades (œufs), *P. lividus* a une grande valeur commerciale représentant à la fois une ressource complémentaire pour la pêche artisanale et une espèce appréciée et ciblée par la pêche récréative (Rocha *et al.*, 2019 ; Santos *et al.*, 2020 ; Nicolau *et al.*, 2022 ; Bouiba *et al.*, 2024^b ; Ciriminna *et al.*, 2024).

Chapitre II

**Concepts clés pour la
compréhension des
relations hôte, microbiote
et environnement**

Les invertébrés marins forment un groupe d'usage polyphylétique, constitués de(s): métazoaires non bilatériens ; protostomiens et une partie des deutérostomiens. Depuis les années 1990, plusieurs *Phyla* du groupe des invertébrés marins sont étudiés, et ce, pour plusieurs raisons. D'une part, la majorité de ces organismes vivants se définissent par leur relation symbiotiques composant des écosystèmes riches mais très fragiles. D'autre part, ils sont parmi les premières victimes du réchauffement climatique, par conséquent, deviennent un enjeu de conservation important (Aprill, 2017 ; Laguerre, 2021 ; Bertucci *et al.*, 2023).

Les études antérieures ont mis la lumière sur la complexité des relations entre les invertébrés marins, leur microbiote et leur environnement ; mettant ainsi en exergue la variabilité des microbiotes en fonction du temps, de l'espace, ou encore de la santé de l'hôte (Laguerre, 2021).

Parmi ces *phyla*, les échinodermes dont *Paracentrotus lividus* figure sont communément utilisés en écologie marine et microbienne (Figure n°05).

Ce chapitre est pionnière dans la description de la diversité et de la dynamique des microbiotes de l'oursin violet *Paracentrotus lividus*.

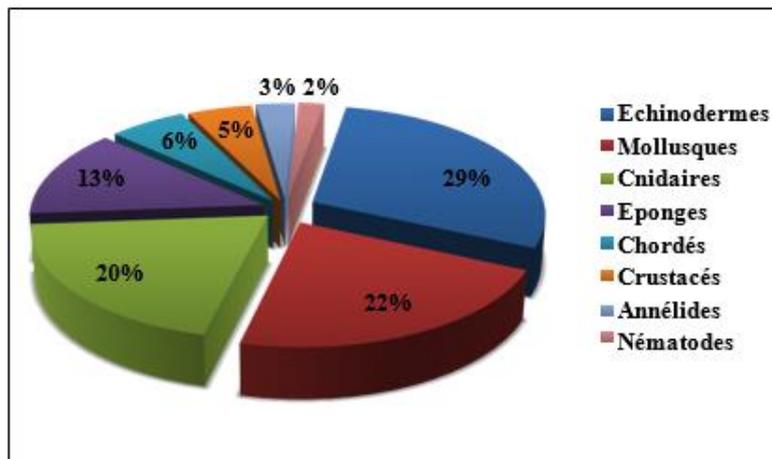


Figure n°05 : Proportions des études menées sur le microbiote des invertébrés marins en fonction du phylum concerné (Laguerre, 2021(modifié)).

II.1. Microbiome

De nombreuses espèces de microorganismes nichent dans les océans sont essentiellement connus pour être planctoniques ou benthiques. De nombreux microorganismes colonisent également la surface et les organes des macro-organismes marins, formant ainsi des communautés appelées « microbiomes » (Aprill, 2017 ;

Chiarello, 2017).

Un microbiome est défini comme une « communauté écologique de microorganismes commensaux, symbiotiques et pathogènes » partageant « l'espace corporel » d'un hôte ainsi que leurs informations génétiques, leurs produits de synthèse et les facteurs de l'environnement (Roughgarden, 2018 ; Berg *et al.*, 2020). Le microbiome désigne l'ensemble des microorganismes caractéristiques d'un habitat pourvu de propriétés physico-chimiques distinctes, ainsi que son théâtre d'activité (Figure n°06) (Berg *et al.*, 2020 ; Laguerre, 2021).

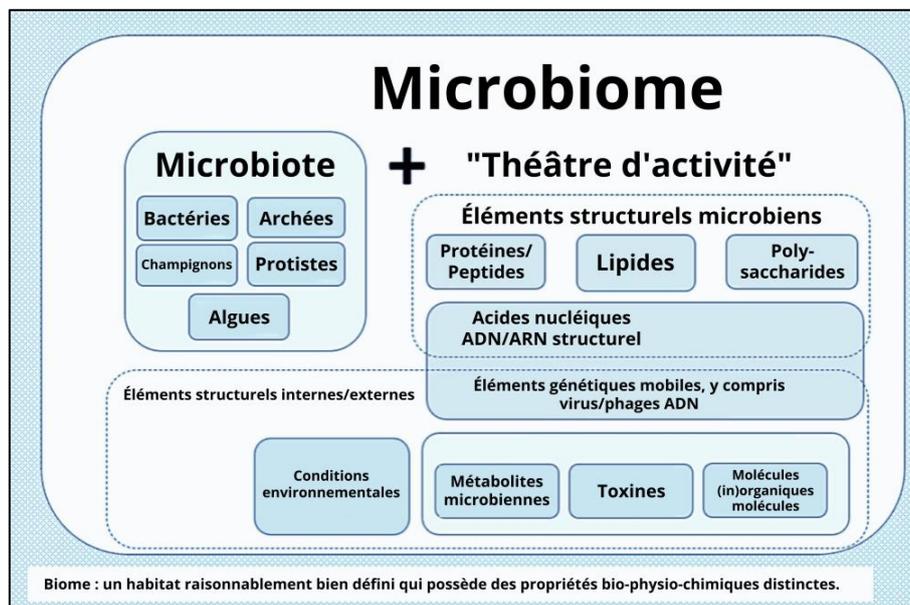


Figure n°06: Un schéma mettant en évidence la composition du microbiome (Berg *et al.*, 2020 (modifié)).

Le microbiome, formant un micro-écosystème dynamique et interactif susceptible de changer dans le temps et à l'échelle. Il est intégré dans des macro-écosystèmes comprenant des hôtes eucaryotes, devenant ainsi crucial pour leur fonctionnement et leur santé (Berg *et al.*, 2020).

II.2. Microbiote

À l'instar de l'empreinte digitale, chaque être vivant possède un microbiote qui lui est propre et unique sur le plan qualitatif et quantitatif (Dominique *et al.*, 2021). Chez un organisme sain, les tissus internes sont normalement stériles tandis que les tissus de surface (peau et muqueuses) sont colonisés par une variété de microorganismes, constituant de véritables écosystèmes. Cet ensemble de communautés microbiennes (bactéries, archées, virus, champignons et protozoaires) présent au niveau d'un environnement défini, c'est-à-

dire: un site anatomique donné ou un organisme entier, constitue le microbiote, anciennement appelé la « microflore » (Denis *et al.*, 2016).

Ces communautés microbiennes co-évoluent au contact des cellules et des tissus de l'être vivant depuis des milliers d'années sous forme d'interactions mutualistes essentielles à sa survie. Elles jouent notamment un rôle crucial dans diverses fonctions vitales de l'hôte à savoir : les fonctions digestives, métaboliques, immunitaires et neurologiques, et ce, depuis ses premiers stades de vie (Denis *et al.*, 2016 ; Dominique *et al.*, 2021).

L'acquisition du microbiome peut obéir à deux voies à savoir : la transmission verticale qui se dirige d'une génération à une autre, et/ou la transmission horizontale qui se fait par imprégnation avec l'environnement (Theis *et al.*, 2016 ; Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2018 ; Laguerre, 2021). Chez les organismes aquatiques, la transmission verticale est plus controversée. En fait, chez certains poissons, la transmission verticale est assurée par l'alimentation des juvéniles avec le mucus des parents. Toutefois, la transmission horizontale est effectuée par imprégnation avec l'environnement tout au long de la vie des hôtes selon différentes voies notamment : par contact, par alimentation et par voie aérienne. Chez les organismes aquatiques, l'imprégnation dans l'environnement est omniprésente avec l'eau de mer. Ce dernier, constitue un vecteur privilégié de transmission horizontale (Apprill, 2017 ; Sylvain et Derome, 2017 ; Laguerre, 2021).

II.2.1. Diversité des microbiotes chez l'oursin

Dans les écosystèmes marins, les organismes vivants sont exposés et colonisés par une pléthore de microorganismes faisant des interactions hôte-microorganismes. La composition du microbiote peut varier, en termes de diversité et d'abondance, en fonction de divers facteurs, de l'environnement, de l'hôte, ou du microbiote lui-même. Il peut être étudié à différentes échelles, depuis le microbiote « total » d'un organisme entier, à un échelon anatomique de l'hôte (organe, système). Par ailleurs, peu importe l'espèce, les microbiotes cutanés et gastro-intestinaux sont les plus communément étudiés (Laguerre, 2021 ; Paillard *et al.*, 2022).

Chez les oursins, la spécificité et l'existence de microbiotes anatomiques distincts est décrite. En fait, les différentes parties du système digestif (antérieure, médiane et postérieure) et les organes reproducteur (gonades) sont constitués chacun d'un microbiote distinct. Cette spécificité est répertoriée chez la plupart des invertébrés marins, et ce, à différents niveaux taxonomiques : entre microbiotes d'hôtes appartenant à des embranchements différents, au

sein d'une même famille ou encore d'un même genre (León-Palmero *et al.*, 2018 ; Bellec *et al.*, 2019 ; Hakim *et al.*, 2019 ; Schwob *et al.*, 2020 ; Laguerre, 2021).

Bien que le changement d'habitat, notamment le passage du milieu naturel à la captivité, impacte les microbiotes entraînant une modification de leur composition et une diminution de leur diversité (Laguerre, 2021). Plusieurs analyses ont révélé que le core du microbiote bactérien chez l'oursin méditerranéen est prédominé par les membres des *Phyla* : *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Fusobacteria*, quel que soit le site d'échantillonnage. Par ailleurs, les taxons minoritaires typiquement liés à la localisation géographique constituaient la partie la plus variable de la structure du microbiote bactérien (Faddetta *et al.*, 2020).

Parmi les souches bactériennes cultivables, de nombreuses espèces appartenant aux genres : *Vibrio*, *Bacillus* et *Shewanella* ont été répertoriées. Outre celles-ci, d'autres espèces à savoir : *Alteromonas sp.*, *Halomonas sp.*, *Idiomarina homiensis*, *Loktanella sp.*, *Pseudoalteromonas piscicida*, *Pseudoalteromonas rubra* et *Psychrobacter sp.*, ont été isolées et identifiées (Boraiy, 2018 ; Faddetta *et al.*, 2020).

Toutes ces bactéries interagissent de manière dynamique avec leurs hôtes et pourraient jouer un rôle présumé dans le métabolisme, l'immunité et le développement de *P. lividus* (Boraiy, 2018 ; Faddetta *et al.*, 2020). Par conséquent, elles offrent la possibilité unique d'être caractérisées pour leurs rôles possibles chez *P. lividus*, ainsi que pour une utilisation potentielle en biotechnologie (Tableau II).

En outre, les microorganismes isolés du milieu marin à partir des invertébrés marins, constituent une source prometteuse largement inexplorée de métabolites secondaires, ayant non seulement des rôles écologiques, mais présentant également plusieurs activités biologiques avec des applications médicales, nutraceutiques, pharmacologiques et cosmétiques (Ruocco *et al.*, 2017).

Tableau II : Rôles probables des bactéries isolées chez *P. lividus*.

Bactéries	Rôles	Références
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Vibrio</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Influence le comportement des cellules immunitaires chez les invertébrés marins. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Boraiy, 2018 ; Faddetta <i>et al.</i>, 2020).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Bacillus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des métabolites biologiquement actifs et/ou de petites molécules et enzymes comme : <ul style="list-style-type: none"> → Des lipopeptides ayant une activité antimicrobienne contre 02 champignons provoquant des maladies chez les plantes : <i>Rhizoctonia solani</i> et <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>. → Un dipeptide cyclique ayant une activité antimicrobienne contre <i>Staphylococcus epidermis</i> et <i>Proteus mirabilis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Fehér <i>et al.</i>, 2008 ; Boraiy, 2018 ; Elkahoui <i>et al.</i>, 2014 ; Nishanth Kumar <i>et al.</i>, 2014 ; Faddetta <i>et al.</i>, 2020).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Shewanella</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des environnements détoxifiants en raison de leur métabolisme polyvalent. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Boraiy, 2018 ; Faddetta <i>et al.</i>, 2020).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Pseudoalteromonas piscicida</i> ▪ <i>Pseudoalteromonas rubra</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des molécules biologiquement actives : <ul style="list-style-type: none"> → De faible poids moléculaire ayant une activité de tensioactifs. → Ayant une cytotoxicité contre les cellules cancéreuses humaines. ▪ Produit des antibiotiques efficaces contre <i>Bacillus cereus</i>, <i>Bacillus subtilis</i> et <i>Halcyon smyrnensis</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Kalinskaya <i>et al.</i>, 2004 ; Fehér <i>et al.</i>, 2008 ; Wang <i>et al.</i>, 2012 ; Hettiarachchi <i>et al.</i>, 2017).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Aliéromonas sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des inhibiteurs enzymatiques. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Ruocco <i>et al.</i>, 2017).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Halomonas sp.</i> ▪ <i>Idiomarina loihiensis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des molécules bioactives ayant des effets cytotoxiques et apoptotiques sur 03 lignées cellulaires humaines. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Sagar <i>et al.</i>, 2013).
<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Psychrobacter sp.</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Produit des molécules empêchant la formation de biofilm bactérien. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ (Papaet <i>et al.</i>, 2015).

II.2.2. Dynamique de la communauté microbienne de l'oursin

Les microbes interagissent de manière dynamique avec leurs hôtes (Park, 2023). En effet, des variations temporelles du microbiote des invertébrés marins sont décrites chez de nombreuses espèces (Laguerre, 2021).

Chez les échinodermes, la captivité influence sur la composition des communautés bactériennes notamment celles des microbiotes gastro-intestinaux. L'impact de celle-ci s'avère d'une part, par une diminution des *Proteobacteria* au profit des *Firmicutes* et d'autre part, par une perte de la différenciation en termes de microbiote pour les segments du système digestif (Barros *et al.*, 2018 ; Pagán-Jiménez, *et al.*, 2019 ; Laguerre, 2021).

Chez les oursins, une dynamique du microbiote intestinal est observée, en lien avec l'environnement et les saisons. Cette variabilité du microbiote est davantage attribuée à : sa composition variant selon les espèces d'oursins et à la « densité » en communautés bactériennes constituant le core microbiote (Laguerre, 2021 ; Park, 2023). À titre d'exemple, chez l'oursin violet, la captivité engendre le développement des *Arcobacteraceae* et du genre *Vibrio* dans le contenu gastro-intestinal (Laguerre, 2021).

II.2.3. L'impact de l'environnement sur le microbiote de l'oursin

Le microbiote des invertébrés marins est soumis à des pressions de différentes natures, qu'elles soient liées à l'hôte, à l'environnement, aux communautés bactériennes du microbiote lui-même, ou à l'ensemble de ces facteurs interagissant entre eux (Figure n°07). De manière générale, le microbiote est clairement influencé par des facteurs hôtes à différentes échelles imbriquées les unes dans les autres : l'espèce, la population concernée, les spécificités phénotypiques et génotypiques de la population, du stade de vie, de l'organe et de son régime alimentaire (Laguerre, 2021 ; Paillard *et al.*, 2022).

Chez l'oursin livide, l'influence des facteurs environnementaux sur son microbiote peut s'expliquer par : son mode de vie benthique, son hétérogénéité à petites échelles spatiales (niches écologiques etc.) et la variation spatiale et temporelle d'un ensemble de facteurs, entre autres : (1) les facteurs biotiques comme : la nature de la source alimentaire, les pathogènes, la présence d'espèces concurrentes et/ou prédatrices, la présence des communautés bactériennes des compartiments de l'habitat de l'hôte et la présence d'espèces proches contribuant à la transmission horizontale et/ou verticale etc. ; (2) les facteurs abiotiques tels que : la température, la photopériode, la saison, les phénomènes naturels (captivité etc.), la

profondeur d'eau etc. et (3) les activités anthropiques entraînant des perturbations et/ou modifications des habitats (tourisme, agriculture, énergies marines renouvelables etc.) ainsi que des apports de polluants organiques et inorganiques impactant l'holobionte directement ou indirectement via la perturbation de son environnement (Rosenberg *et al.*, 2007 ; Björk *et al.*, 2017 ; de Albuquerque *et al.*, 2020 ; Laguerre, 2021 ; Palladino *et al.*, 2021).

Face au stress environnemental, la nature des échanges et donc des interactions avec l'environnement seront plus ou moins fortes en fonction de la position taxonomique de l'hôte. L'ensemble de ces interactions hôte, microbiote et environnement confèrent au microbiote une résilience et une grande plasticité adaptative (Laguerre, 2021 ; Paillard *et al.*, 2022).

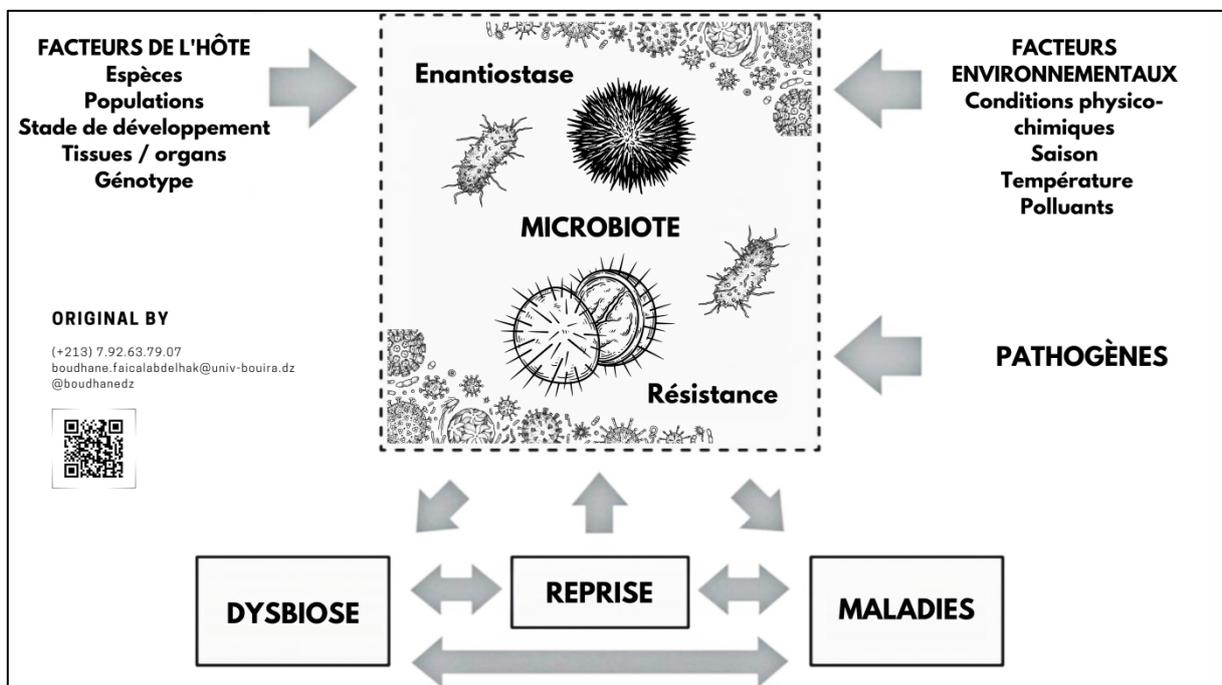


Figure n°07: Facteurs influençant le microbiote de l'oursin violet *Paracentrotus lividus* (Paillard *et al.*, 2022 (modifié)).

Partie expérimentale

Chapitre III

Matériel et méthodes

Dans notre travail expérimental sur l'évaluation de la diversité bactérienne du microbiome du système digestif (intestin) et de l'appareil reproducteur (gonades) de l'oursin violet *Paracentrotus lividus* qui baigne dans les eaux de la mer méditerranéenne d'Algérie (Béjaïa) ; deux zones, distinguées par leur degré de pollution variable, ont été choisies dans la wilaya de Béjaïa pour effectuer notre échantillonnage (*P. lividus*). L'oursin violet *Paracentrotus lividus* a été identifié par l'équipe du laboratoire de Zoologie Appliquée et d'Ecophysiologie Animale, Faculté des Sciences Naturelles et de la Vie, Université de Bejaia, Algérie. Nos investigations ont été élaboré au sein du Laboratoire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre à l'Université de Bouira et le Laboratoire de Bactériologie des Aliments, des Eaux et de l'Environnement, à l'institut Pasteur, Alger.

Pour évaluer la diversité du microbiote intestinal et le microbiote des gonades, une approche culture-dépendante suivie d'une série de tests biochimiques et microbiologiques a été conduite pour identifier les différents isolats obtenus des différents organes, à savoir : tube digestif et gonades.

III.1. Les sites d'échantillonnage

Dans une journée ensoleillée du 18 mars 2024, entre 7h00 et 10h00 du matin, deux séries d'oursins formées chacune de 06 échantillons ont été récoltées dans deux zones côtières de la région de Bejaïa « les Aiguades » et « la Brise de mer » (Tableau III) (Figure n°08 et Figure n°09).

Tableau III : Coordonnées GPS avec les données climatiques des zones d'étude.

Site	Coordonnées (GPS)	Jour/heure	Climat	Données climatique	Références
Brise de mer	36°45'25.5"N 5°05'37.3"E	18/03/2024 à 7h00	Climat méditerranéen, généralement humide avec un léger changement de température saisonnier	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Température : 16.5°C ▪ Humidité : 55% ▪ Température de l'eau : 14°C ▪ Vent : 22Km/h 	Lien 02 Lien 03
Aiguades	36°45'54.3"N 5°06'07.9"E	18/03/2024 à 10h00		<ul style="list-style-type: none"> ▪ Température : 22.3°C ▪ Humidité : 40% ▪ Température de l'eau : 14°C ▪ Vent : 33Km/h 	

III.1.1. Les Aiguades

Une station jugée moins polluée, « les Aiguades » représentent une petite baie sise au centre du parc national de Gouraya (PNG), localisé à 3.8 km de Béjaïa centre (Figure n°08) (Tableau III). Il s'agit d'un littoral avec plusieurs baies douillettes propices à la baignade, recouvertes avec de l'eau turquoise et cristalline et de roches.

Cette zone rocheuse renferme par ailleurs, de nombreuses espèces végétales rares comme les pins d'Alep, les genévriers et l'absinthe. Pour ce qui est de la faune, le sanglier, le singe magot, le chacal et le lapin ont été distingués. Les Aiguades compte des espèces menacées de disparition entre autres : *Paracentrotus lividus* qui est fréquemment abondant approximativement à une profondeur qui varie de 0.5m allant aux grandes profondeurs.

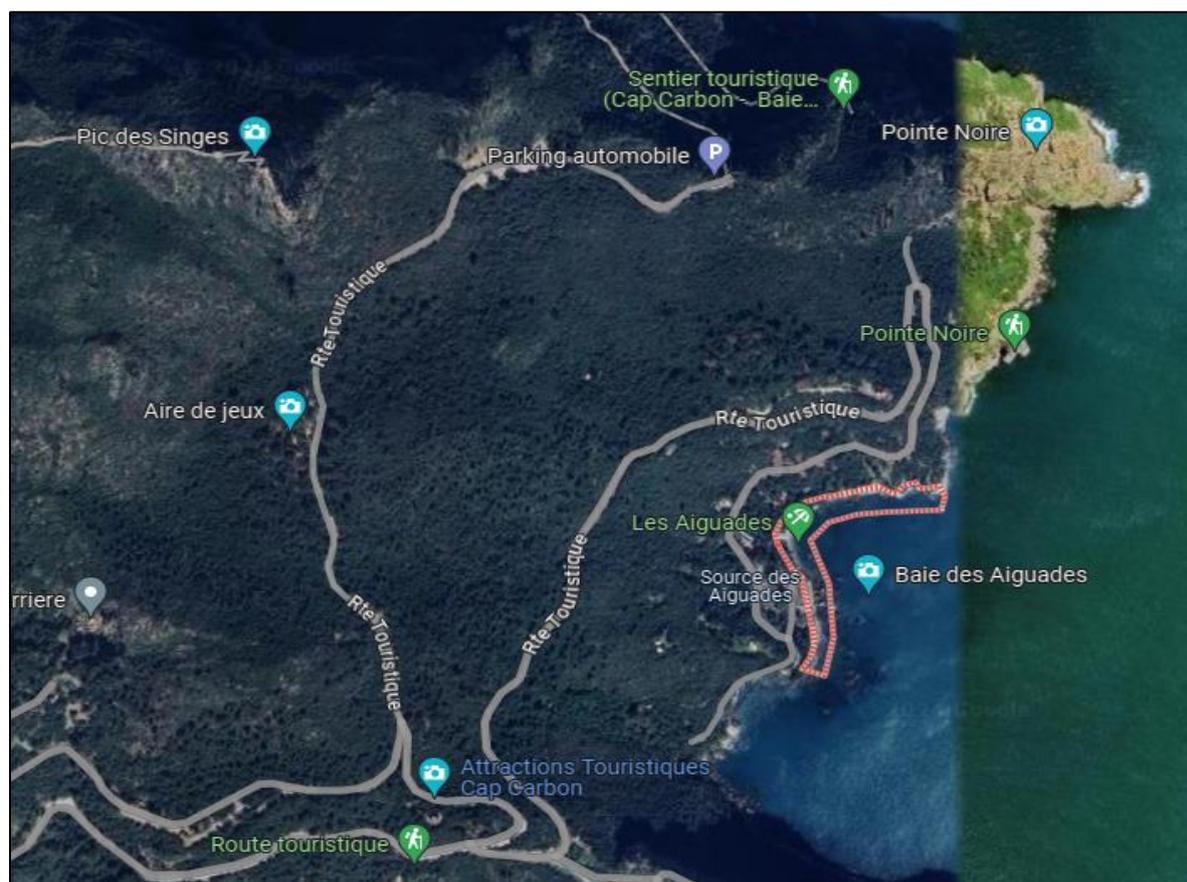


Figure n°08: Localisation géographique de la zone d'échantillonnage 1 « Les Aiguades » (Lien 04).

III.1.2. La Brise de mer

La brise de mer « Nassim El Bahr » en arabe, est située au pied de l'ancienne ville de Bejaia, pas loin de la zone urbaine. Elle est un lieu de détente idéal offrant de la douceur, une vue sur la mer, le port pétrolier et la jetée (Figure n°09) (Tableau III).

D'une surface approximative de quatre hectares, la Brise de mer construite sur un espace gagné sur la mer est entourée d'un côté par le port de pêche et la jetée, de l'autre par le port pétrolier, à l'arrière-plan par la grande forêt des oliviers et devant par la mer méditerranée, la grande bleue qui s'étend vers l'infini (Figure n°09).

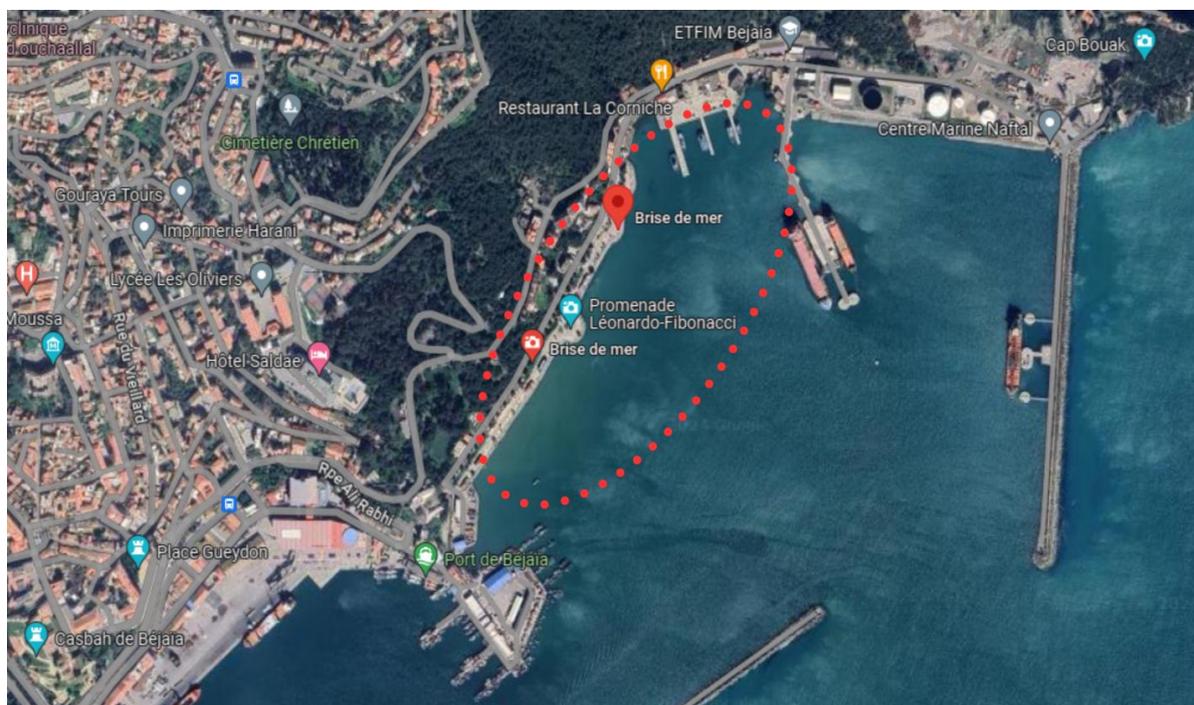


Figure n°09 : Localisation géographique de la zone d'échantillonnage 2 « Brise de mer »
(Lien 05).

III.2. La récolte du matériel biologique

Au total, douze échantillons d'oursins violets correspondant à douze tubes digestifs et douze gonades ont été isolés.

L'échantillonnage a été réalisé le 18 mars 2024 matin au niveau de la Brise de mer et des Aiguades, respectivement, en suivant les étapes décrites ci-dessous :

Dès notre arrivée à l'endroit de prélèvement présélectionné, les oursins violets ciblés ont été collectés à l'aide d'un haveneau puis, introduits dans la glacière préalablement remplie avec l'eau de mer (Figure n°10).

L'eau de mer dans la glacière garde la fraîcheur et la vitalité des échantillons biologiques, empêchant ainsi la dégradation des échantillons microbiens dans leur intestin et gonades.

Une fois que les glacières sont pleines avec les échantillons à raison de six oursins par site, elles ont été hermétiquement fermées. Ensuite, une bouteille d'eau de mer de chaque site de prélèvement a été remplie.

Les glacières contenant le matériel biologique (*Paracentrotus lividus*) ont été transportées au laboratoire de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre de l'Université Akli Mohand Oulhadj de Bouira.

À notre arrivé au laboratoire de Bouira, nos échantillons biologiques ont été conservés au réfrigérateur à une température de 4°C jusqu'au processus d'investigation.

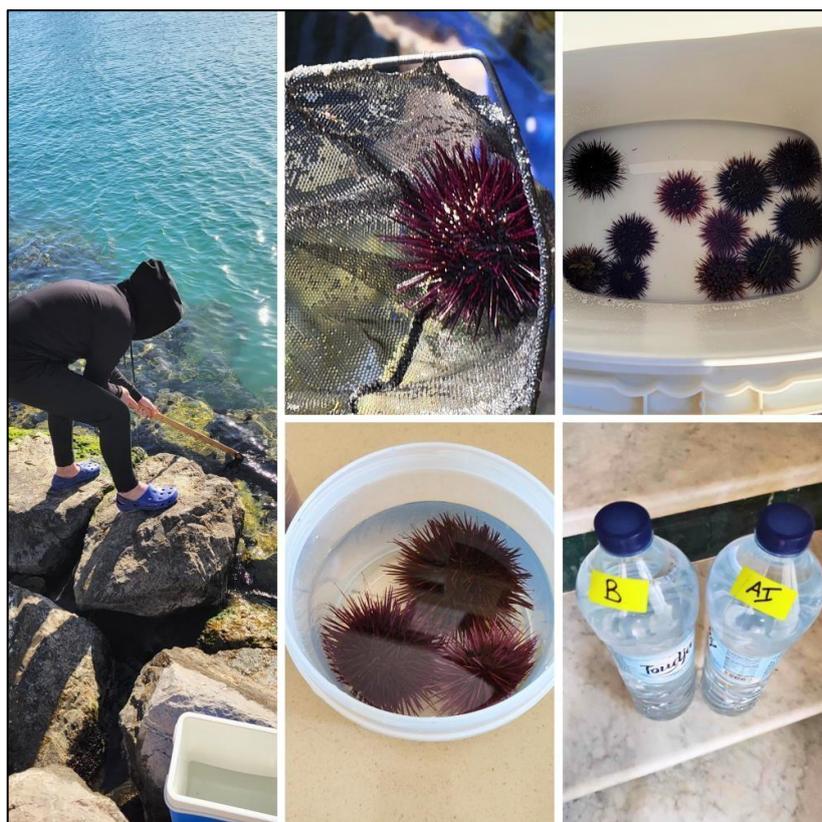


Figure n°10: Les différentes étapes d'échantillonnage (Prise par moi-même).

III.3. Caractéristiques morphologiques des oursins

Arrivé au laboratoire, le poids en gramme (g) de chaque oursin a été déterminé. Par la suite, les caractéristiques morphologiques des oursins y compris : la couleur, la forme et la consistance de leur coquille ainsi que la longueur des piquants ont été également déterminés.

À préciser, la détermination du sexe des oursins ne se fait généralement qu'après dissection. C'est la couleur et la texture des gonades qui font la différence entre les deux sexes.

III.4. Dissection des oursins et extraction des organes

Afin de lancer nos recherches sur la diversité du microbiome des systèmes intestinaux et reproducteurs, le tube digestif et les gonades des oursins collectés ont été extraites.

Dans des conditions aseptiques, la dissection des oursins a été effectuée et les organes ont été collectés dans des tubes flacons stériles bien étiquetés contenant un mélange de bouillon cœur-cerveau et de glycérol (50/50) (v/v) (Figure n°11).

Ensuite, les tubes contenant les organes de reproduction et digestif ont été conservés à 4°C jusqu'au processus d'investigation.

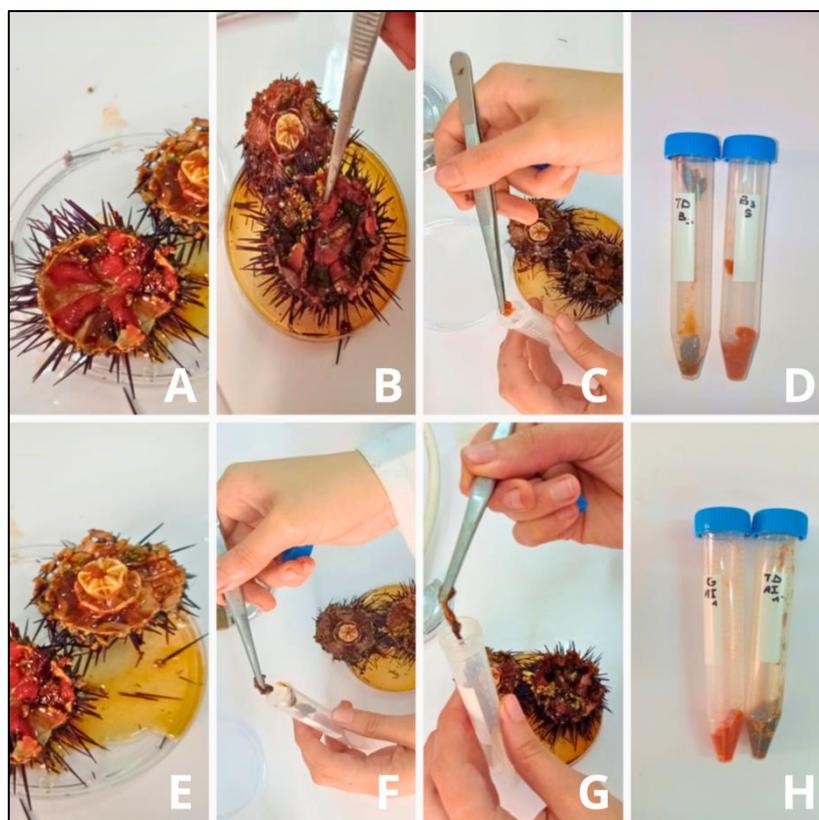


Figure n°11: Dissection des oursins et extraction des organes. **A.** Aspect macromorphologique des gonades ; **B.** Aspect macromorphologique du tube digestif ; **C.** Prélèvement des gonades ; **D.** Echantillons (tube digestif et gonades) de la Brise de mer ; **E.** Aspect macromorphologique du tube digestif et des gonades d'un oursin disséqué ; **F.** et **G.** Prélèvement du tube digestif ; **H.** Echantillons (tube digestif et gonades) des Aiguades (Prise par moi-même).

III.5. Aspect macroscopique des organes

L'aspect macroscopique des organes extraits (tubes digestifs et gonades), à savoir : la forme, la texture ainsi que la couleur a été déterminé.

III.6. Etude de la diversité bactérienne des microbiotes de *Paracentrotus lividus*

Le microbiote joue un rôle essentiel dans la santé et le développement de l'hôte, depuis ses premiers stades de vie. Avec l'avènement des techniques d'analyses et d'études de la biodiversité microbienne, la compréhension des interactions hôte, microbiote et environnement est devenue possible.

De ce fait, cette section vise principalement à caractériser la composition et l'abondance du microbiote des systèmes digestifs et reproducteurs de 12 individus (*Paracentrotus lividus*) en suivant une approche d'étude bien déterminée décrite ci-dessous.

III.6.1. Dénombrement de la flore mésophile totale

L'expérimentation a commencé par la préparation des suspensions mères. À cet effet, un volume de 5ml de bouillon cœur-cerveau (BHIB) a été ajouté à chaque tube flacon contenant l'organe. Puis, à l'aide d'une tige en verre stérile, les tubes digestifs et les gonades ont été écrasés dedans jusqu'à ce que leur contenu se libère.

À l'aide d'un vortex, les tubes contenant le BHIB et les organes écrasés ont été bien agités et la suspension mère (SM) est obtenue. À partir des suspensions mères préparées, une série de dilutions décimales allant de 10^{-1} à 10^{-3} a été réalisée.

Ensuite, 1ml de chaque suspension mère a été prélevé puis versé aseptiquement dans un tube contenant 9ml d'eau peptonée tamponnée (EPT) stérile. Ce dernier a été bien agité pour homogénéiser et la dilution 10^{-1} est obtenue.

Selon un schéma de dilution précis, l'opération a été répétée pour les tubes restants dans le but de préparer le reste des dilutions (10^{-2} et 10^{-3}) (Figure n°12).

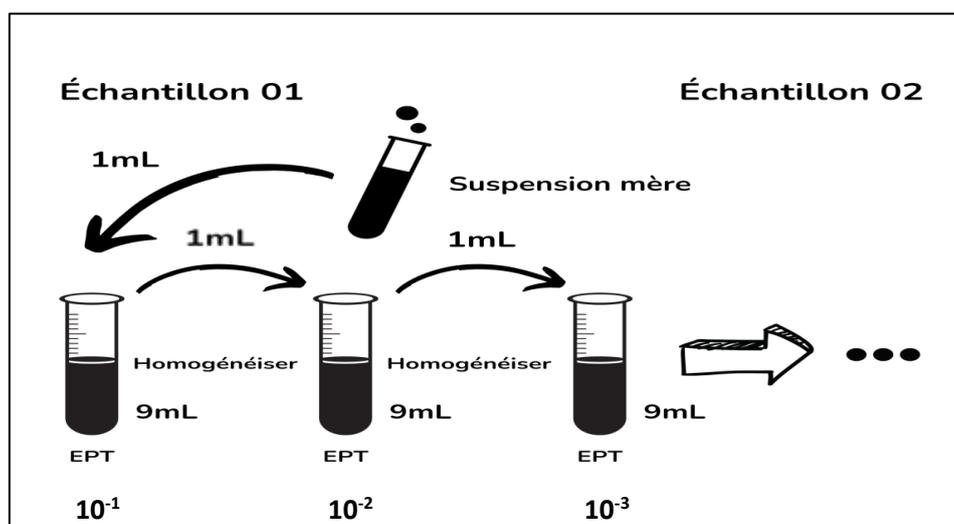


Figure n°12 : Les étapes de la préparation des dilutions décimales (Réalisé par moi-même).

Une fois les dilutions sont prêtes, seules les dilutions 10^{-1} et 10^{-3} de chaque échantillon ont étéensemencées sur milieu PCA (Plate Count Agar).

Un volume de 100µl de chaque suspension a été déposé aseptiquement dans une boîte de pétri vierge. Puis, une quantité du milieu PCA en surfusion a été versée au-dessus et homogénéisée en faisant des mouvements en chiffre de huit. Une fois l'inoculation terminée, les boîtes ont été incubées couvercle en bas à une température constante de 37°C pendant 72 heures.

Le dénombrement des bactéries viables a été réalisé par la méthode du comptage sur boîte en marquant chaque colonie sur le fond avec un marqueur indélébile et le nombre d'UFC (unité formant colonie) a été déterminé.

III.6.2. Isolement et purification bactérienne

Comme le BHIB est un milieu d'enrichissement non sélectif permettant de favoriser une croissance bactérienne à partir de prélèvements pauci microbiens, l'ensemble des échantillons (tubes digestifs et gonades) préalablement enrichis ont été dilués à raison 10^{-1} puis isolés sur des milieux sélectifs appropriés.

Les milieux sélectifs utilisés comprenaient : Mossel pour les *Bacillus*, MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) pour les *Lactobacillus*, Baird Parker pour les *Staphylococcus*, Hektoen et EMB (Eosin Methylene Blue) pour les bacilles à Gram négatif notamment les entérobactéries et gélose à l'eau de mer pour les halophiles. Leur composition est donnée dans l'annexe I.

L'isolement sélectif des bactéries a été fait à partir des dilutions 10^{-1} par ensemencement en quadrants. Ce mode d'ensemencement permet d'isoler les différentes bactéries contenues dans un mélange suivant les différentes étapes schématisées dans la figure n°13. Au terme de l'incubation, des colonies bien isolées et caractéristiques permettant de s'orienter vers une espèce ou un genre voire une famille de bactérie peuvent être obtenues dans le dernier quadrant. C'est à partir de ces colonies bien distinctes et isolées qu'une série de tests d'identification pourront être élaborés. Parfois, une subculture peut être nécessaire pour parfaire l'obtention d'une culture pure avec un inoculum suffisant pour les tests à effectuer (Denis *et al.*, 2016).

Une fois les boîtes de pétri sont inoculées, elles ont été incubées couvercle en bas à 37°C. Après 24 à 72 heures d'incubation, les boîtes on fait l'objet d'une lecture par observation macroscopique des colonies développées sur les différents milieux. Par la suite, une série de purifications par repiquage successifs a été effectuée en transférant une colonie

distincte de chaque boîte vers le même milieu sélectif approprié. Les boîtes ont ensuite été incubées dans des conditions appropriées à chaque milieu.

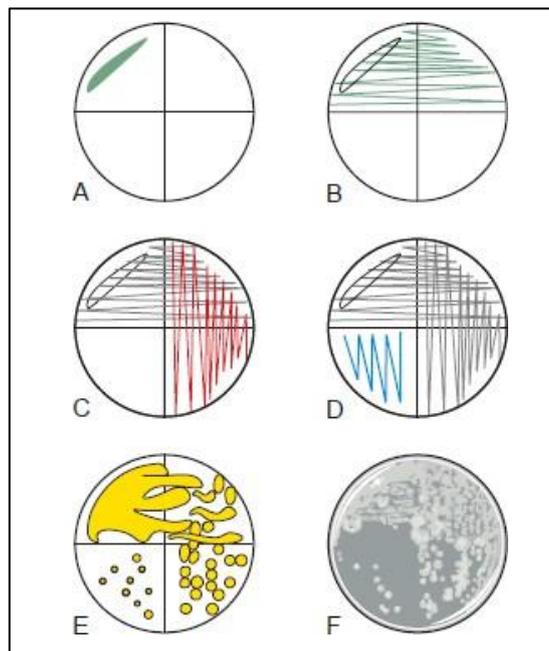


Figure n°13: Principe et résultat de la méthode d'isolement en quadrant. **A.** Dépôt de l'échantillon ; **B.** Stries serrées sur la première moitié de la boîte (stries vertes) ; **C.** Après avoir tourné la boîte de 90°, des stries serrées sont à nouveau effectuées sur une moitié de boîte (stries rouges) ; **D.** Le dernier quadrant estensemencé sans rentrer au contact des quadrants précédents. Cette technique permet d'obtenir dans le dernier quadrant des colonies isolées schématisées en **E** et en pratique en **F** (Denis *et al.*, 2016).

Après avoir confirmé la pureté des boîtes, une colonie de chaque boîte purifiée a été repiquée et conservée dans des cryotubes contenant 1ml de BHIB additionné avec du glycérol 80% à raison 50/50 (v/v). Les tubes sont ensuite conservés dans une chambre froide pour une utilisation ultérieure.

L'ensemble du protocole a été réalisé sous des mesures d'asepsie strictes pour éviter toute contamination éventuelle et garantir la fiabilité des résultats obtenus.

III.6.3. Identification des isolats bactériens

L'identification des isolats se fait à l'aide de méthodes automatisés et/ou classiques. Les méthodes classiques sont couramment adoptées. Elles se basent sur l'élaboration d'une série d'épreuves notamment : un examen macroscopique, microscopique et une galerie biochimique. Ensuite, les différents caractères morphologiques et biochimiques de l'espèce inconnue sont comparés avec une espèce déjà décrite (une souche type) (Denis *et al.*, 2016).

Il est à noter que tous ces tests d'identification ont été réalisés à partir de cultures pures et jeunes de 18 à 24 heures.

III.6.3.1. La détermination de l'aspect macroscopique des isolats

« *Sens primordial en bactériologie: l'observation... ».*

L'aspect macroscopique des cultures sur milieu solide constitue encore une part préliminaire de l'identification d'un microorganisme.

Sur des milieux de cultures sélectifs, les bactéries forment des colonies caractéristiques ayant : une forme, une taille, un contour, un relief, une surface, une couleur, une consistance et une odeur bien définie.

Après un temps d'incubation approprié (24 à 72h), une lecture de boîtes ensemencées a été effectuée par observation macroscopique des colonies développées sur les différents milieux.

III.6.3.2. La détermination de l'aspect microscopique des isolats

L'aspect microscopique après examen à l'état frais et après coloration de Gram constituent une étape clé dans la démarche analytique en bactériologie permettant d'orienter l'étude vers un groupe bactérien.

A. Etat frais

L'état frais correspond à l'observation entre lame et lamelle (objectif 40), d'un matériel biologique ou d'une suspension bactérienne sans fixation préalable par la chaleur ou l'alcool.

À cette fin, une goutte d'eau physiologique a été déposée stérilement sur une lame propre. Ensuite, avec une pipette Pasteur stérile, une colonie bien distincte a été dissoute dans la goutte puis une lamelle a été déposée au-dessus tout en évitant la formation des bulles d'air.

L'observation a été effectuée au microscope optique à l'objectif 40 et les renseignements obtenus concernent principalement la mobilité et la forme des bactéries.

B. Coloration de Gram

Avant d'entamer l'identification biochimique des isolats, nous avons effectué une coloration de Gram pour chaque colonie isolée à partir des différents milieux de culture ensemencés (Figure n°14).

La coloration de Gram est définie comme une coloration différentielle permettant de distinguer entre les bactéries à Gram positif des bactéries à Gram négatif en fonction de la composition chimique de leur paroi (Denis *et al.*, 2016).

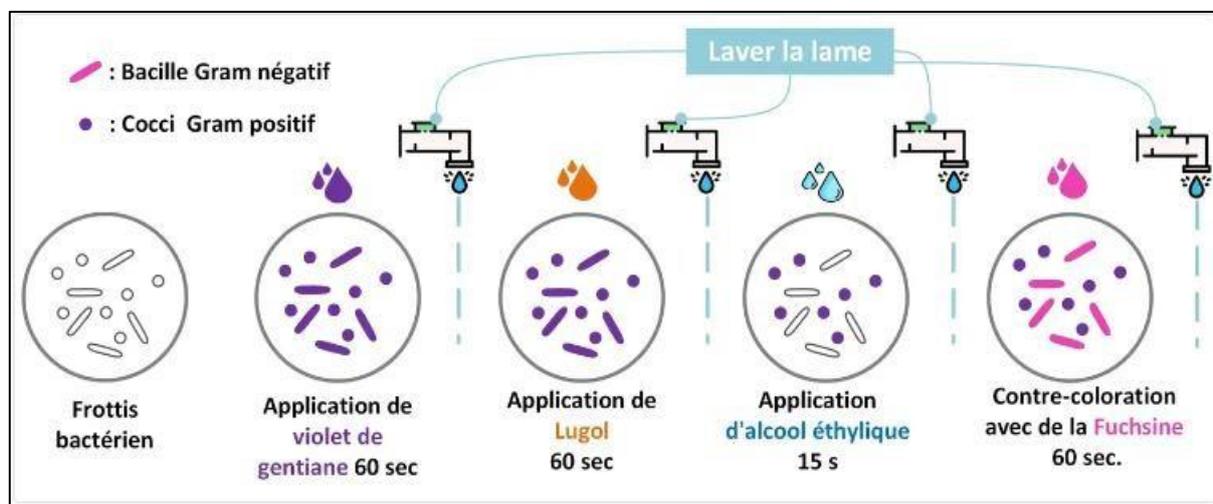


Figure n°14: Les différentes étapes de la coloration de Gram (Lien 06).

L'observation microscopique des cellules a été réalisée au microscope optique (objectif à immersion Gx100). Le Gram, la forme, la taille et le mode d'association des cellules ont été notés.

III.6.3.3. Identification enzymatique des isolats bactériens

A. Le test de catalase

La catalase est une enzyme catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène, considéré comme un poison cellulaire, en eau et dioxygène (Denis *et al.*, 2016).

Sur une lame propre et sèche, une goutte du peroxyde d'oxygène a été déposée. À l'aide d'une pipette Pasteur, une colonie bactérienne isolée a été prélevée puis déposée sur la goutte.

- ❖ Si des bulles d'oxygènes (effervescence) se forment immédiatement, la bactérie est catalase positive.
- ❖ Si rien n'est observable au contact de la colonie avec le peroxyde d'oxygène, la bactérie est catalase négative.

B. Le test d'oxydase

L'essai de l'oxydase permet de révéler la production de la phénylène diamine oxydase par la bactérie. La révélation de cette enzyme se fait à partir d'une culture

bactérienne ensemencée sur un milieu gélosé en présence d'oxygène et de N-diméthylparaphénylène diamine. Ce dernier est un réactif formant un complexe violet au contact de cette enzyme (Denis *et al.*, 2016).

À l'aide d'une pipette pasteur stérile, une colonie bactérienne bien isolée a été prélevée puis déposée sur le disque pré-imprégné par le réactif.

Après 30 secondes environ d'incubation à température ambiante, la lecture a été faite comme suit :

- ❖ Si le disque prend une teinte violette : le substrat a été oxydé, la bactérie est oxydase positive.
- ❖ S'il reste incolore : la bactérie est donc oxydase négative.

C. Le test de coagulase

Parmi les cocci Gram positive, seules les souches de *Staphylococcus aureus* déterminent la coagulation des plasmas citratés humains ou de lapin dans un délai de 24 heures. À partir des cultures pures et jeunes des staphylocoques sur milieu Baird Parker, un ensemencement du bouillon BHIB a été réalisé. Ce dernier a été incubé à 37°C pendant 18 heures. Le lendemain, le plasma du lapin lyophilisé a été reconstitué en ajoutant 2ml d'eau distillée stérile à chaque tube puis agité légèrement en évitant la formation de mousse.

Dans des tubes à hémolyse, 0.5ml du plasma dissous additionnée de 0.5ml de la culture en bouillon du staphylocoque à tester ont été mélangés et incubés au bain marie à 37°C pendant 24 heures. Des lectures toutes les heures au moins pendant les quatre premières heures ont été effectuées.

III.6.3.4. Caractère hémolytique

Ayant un rôle important dans la pathogénicité des microorganismes, l'hémolysine est une toxine de nature protéique produite par certaines bactéries, provoquant l'hémolyse.

Le test d'hémolyse sur gélose au sang est un critère de sélection très important permettant de cultiver un large éventail de microorganismes d'importance indicative.

Ce test a été adopté dans notre étude pour l'identification présomptive des espèces de *Bacillus* et de *Lactobacillus* isolées sur milieu MRS et Mossel.

Pour y parvenir, des géloses au sang de mouton à 5% ont été ensemencées en stries par les souches pures préalablement isolées sur les milieux sélectifs cités au-dessus puis incubées

à un temps et température adaptés.

Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, l'aspect de la gélose autour des colonies a été examiné et les schémas d'hémolyse typiques obtenus ont été notés :

- ❖ L'hémolyse α (partielle): se présente sous forme d'une zone verdâtre, étroite et à bords flous due à une dégradation incomplète de l'hémoglobine.
- ❖ L'hémolyse β (totale) : s'avère sous forme d'une auréole claire, assez souvent large et à bords nets due à une digestion complète de l'hémoglobine.
- ❖ L'hémolyse γ (pas d'hémolyse) : aucune modification du milieu n'est observable.

III.6.3.5. Identification biochimique des isolats bactériens

Bien que, l'apparence macromorphologique des colonies bactériennes, la micromorphologie des bactéries après coloration, leurs caractéristiques de croissance, leur odeur, leur pigmentation, leur caractère hémolytique sur gélose au sang permettent au bactériologiste de se diriger vers une famille bactérienne ou un genre bactérien spécifique ; ils ne sont pas suffisamment distinctifs pour avoir l'identité d'une espèce (Denis *et al.*, 2016).

À cet égard, l'identification précise des espèces bactériennes fait appel à des galeries d'identification biochimique manuelles ou automatisés (Denis *et al.*, 2016).

Le type, universellement employé, des galeries d'identification biochimique s'agit du système API® de bioMérieux (France). Ce dernier a été adopté dans notre étude pour l'identification à la fois des bactéries à Gram positif et à Gram négatifs.

A. Principe général des galeries biochimiques

Les galeries biochimiques miniaturisés se compose d'une série de microcupules dites : tubules, contenant chacun un substrat déshydraté correspondant à un test biochimique spécifique avec lequel les microorganismes réagissent différemment. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure permettant de les remplir de liquide et de les placer dans des conditions particulières (Denis *et al.*, 2016).

Afin d'obtenir des résultats reproductibles et comparables, le système API® de bioMérieux (France) a tracé une démarche expérimentale. En premier lieu, un inoculum bactérien des isolats à tester est préparé à raison 0,5 McFarland pour l'API 20E, l'API 20NE et l'API Staph. Cependant pour l'API 50 CHB la suspension bactérienne doit correspondre à 2 McFarland. Ensuite, un volume de 5 ml d'eau distillée stérile est réparti

dans les alvéoles du fond pour humidifier l'atmosphère. Pour les substrats dont le nom est encadré (CIT par exemple), il convient de remplir la cupule. Tandis que pour ceux soulignés (ADH, etc.), le volume doit être complété avec de l'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose et empêcher les composés volatils synthétisés lors de la réaction de s'échapper du tube. Au terme de l'incubation de 18 à 48 heures à une température adaptée, on procédera à la lecture des résultats. Un virage de couleur du milieu dans le tube, signifie que le test est positif. Par la suite les résultats sont résumés dans un tableau et interprétés pour définir le nom de l'espèce.

B. Galerie API 20E

La galerie API 20E est préconisée pour l'identification des entérobactéries et d'autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. C'est pourquoi nous l'avons opté pour identifier les souches d'entérobactéries isolées sur les milieux EMB, Hektoen et gélose à l'eau de mer.

À partir d'un inoculum de 0.5 McFarland, les cupules préalablement hydratées sont ensemencées puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après incubation, certains réactifs (VP1 et VP2, Kovacs, TDA) ont été ajoutés à quelques tests (VP, IND, TDA) respectivement. Puis, la lecture de la galerie a été faite en se référant au tableau de lecture. Toutes les réactions spontanées ont été notées sur la fiche de résultat et l'identification a été réalisée à partir logiciel d'identification APIWEB™ bioMérieux (France).

C. Galerie API 20NE

La galerie API 20NE est recommandée pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux. Par conséquent, nous l'avons opté pour identifier les souches de *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* etc. probablement isolées sur les milieux EMB, Hektoen et gélose à l'eau de mer.

Le fond et le couvercle d'une boîte d'incubation ont été réunis. Une quantité d'eau distillée stérile a été répartie dans les alvéoles du fond. Puis, la galerie a été déposée stérilement dans la boîte d'incubation. Un inoculum de 0,5 McFarland a été préparé en faisant dissoudre 1 à 4 colonies bactériennes jeunes, morphologiquement identique sur l'un des milieux, dans l'API NaCl 0,85% Medium.

À l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les compartiments de la galerie ont été remplis avec la suspension bactérienne tout en évitant la formation de bulles d'air : pour les caractères

(NO₃, TRP, ESC, GEL et PNG), seul le tube a été rempli avec la suspension bactérienne. Pour les substrats dont le sigle est souligné (GLU, ADH, URE), les tubes ont été remplis avec la suspension bactérienne et la cupule avec de l'huile de paraffine.

Un volume de 200µl (correspondant à 8 gouttes) de la suspension précédente a été transféré dans une ampoule AUX Medium. Puis, il a été bien homogénéisé. Par la suite, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les compartiments restant de la galerie ont été remplis tout en évitant la formation de bulles d'air : pour les substrats dont le sigle est encadré (du GLU à PAC), le tube et la cupule ont été rempli entièrement avec la suspension bactérienne en veillant à créer un niveau horizontal ou légèrement convexe, mais jamais concave.

La galerie a été refermée, étiquetée puis incubée à une température de 37°C pendant 24 à 48 heures. Après incubation, certains réactifs (VP1 et VP2 ; James ; NIT1, NIT2 et Zn) ont été ajoutés à quelques tests (VP ; TRP ; NO₃), respectivement. Puis, en se référant au tableau de lecture, la lecture de la galerie a été faite. Toutes les réactions spontanées ont été notées sur la fiche de résultat et l'identification a été réalisée à partir logiciel d'identification APIWEB™ bioMérieux (France).

D. Galerie API Staph

L'API Staph a été utilisée dans notre investigation pour identifier les *Staphylococcus* et les *Micrococcus* à partir des souches pures isolées sur milieu Baird Parker.

Pour cette raison, la même procédure d'inoculation de la galerie API 20E a été suite ici à l'exception de la suspension bactérienne qui a été réalisée dans l'API Staph Medium au lieu de l'eau physiologique et les réactifs ajoutés après incubation pour la révélation de certains tests: VP1 et VP2 pour le VP, NIT 1 et NIT 2 pour le test NIT et ZYM A et ZYM B pour le test PAL.

E. Galerie API 50 CHB

La galerie API 50 CHB est un système standardisé destiné à l'identification des *Bacillus* et apparentés, associant 50 tests biochimiques et permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone.

Hormis les mediums utilisés pour la préparation des inoculum d'opacité 2 McFarland, 14 galeries API 50 CHB et API 20E ont été inoculées à partir des cultures jeunes isolées sur milieu Mossel et MRS en suivant les mêmes étapes énumérés au-dessus.

En fait, pour chaque isolat, deux suspensions bactériennes ont été préparées en vue d'inoculer l'API 50 CHB et son API 20E associée :

- ❖ Pour l'API 50 CHB : un inoculum d'opacité 2 McFarland a été préparé à partir de plusieurs colonies dissoutes dans une ampoule d'API 50 CHB Medium. Puis, il a été bien homogénéisé. Tout en évitant la formation de bulles d'air, l'API 50 CHB Medium ainsi préparé a été réparti dans les tubes seulement de la galerie API 50CHB.
- ❖ Pour l'API 20E: une suspension d'opacité 2 McFarland a été préparé à partir de plusieurs colonies identiques dissoutes dans une ampoule d'API NaCl 0.85% Medium. Puis, elle a été homogénéisée. Tout en évitant la formation de bulles d'air, l'API NaCl 0.85% Medium ainsi préparé a été réparti seulement dans les 12 premiers tubes de la galerie API 20E.

Les galeries inoculées ont été refermées, étiquetées puis incubées à 30°C pendant 24 et 48h.

Deux lectures ont été effectuées. Une 1^{ère} lecture après 24 heures d'incubation : pour l'API 50 CHB, l'acidification des milieux révélée par un virage de couleur (rouge au jaune à l'exception d'esculine au noir) a été recherchée puis notée. Pour l'API 20E, le virage de couleur des différents milieux a été noté sans aucun ajout de réactifs.

Une 2^{ème} lecture est faite après 48 heures d'incubation : pour l'API 50 CHB, si un test initialement positif devient négatif, seul le résultat positif a été pris en considération. Il s'agit d'une alcalinisation due à la synthèse d'ammoniaque à partir des peptones. Pour l'API 20E, l'addition des réactifs a été effectuée et la lecture a été faite en se référant à la notice API 20E.

Le profil biochimique ainsi obtenu après la lecture finale des galeries a été identifié à l'aide du logiciel d'identification APIWEB™ bioMérieux (France).

Chapitre IV

Résultats et discussion

L'échantillonnage est un point clé pour l'obtention de résultats valides. Sa bonne mise en œuvre nous permet d'obtenir une bonne représentativité de l'échantillon prélevé (Pointurier, 2003). Pour se faire, il faut choisir des échantillons représentatifs, définir le lieu et les conditions de prélèvement et les acheminer dans les bonnes conditions au laboratoire d'analyse. Afin de concrétiser l'objectif de notre étude, douze échantillons d'oursins violets correspondant à douze tubes digestifs et douze gonades ont été isolés de deux régions de Bejaïa, à savoir : la Brise de mer et les Aiguades. Ensuite, une estimation et une caractérisation phénotypique de la biodiversité de ces échantillons a été effectuée.

Tout d'abord, un dénombrement sur milieu PCA a été réalisé en vue d'estimer la densité bactérienne présente dans les échantillons.

Plus tard, nous avons procédé à un isolement sélectif de nos échantillons sur des milieux spécifiques permettant la croissance et l'identification de certains types de bactéries, suivi d'une purification sur les mêmes milieux appropriés.

Enfin, nous avons soumis les isolats obtenus à des tests de caractérisation phénotypique, notamment une coloration de Gram, des tests d'orientation enzymatique (catalase, oxydase et coagulase), des tests d'hémolyse et des tests biochimiques (galerie API 20E, API 20NE, API Staph et API 50 CHB).

IV.1. Caractéristiques morphologiques des oursins

Les caractéristiques morphologiques des oursins y compris : leur poids, leur forme, la couleur et la consistance de leur coquille ainsi que la couleur et la longueur des piquants sont mentionnées dans le tableau IV. En ce qui concerne le sexe des oursins, il n'a été déterminé qu'après dissection.

Les douze individus échantillonnés des deux sites ont un poids qui varie de 23 à 46.90g. Après avoir déterminé le sexe de ces individus échantillonnés, on a constaté que cinq individus sur douze sont affiliés au sexe femelle dont quatre sont récoltés de la Brise de mer. Cependant, sept individus des douze individus récoltés sont du sexe mâle, dont la majorité sont de la région des Aiguades.

Nos résultats corroborent avec ceux obtenus par Bouiba et ses collaborateurs (Bouiba^a *et al.*, 2024). D'après ces derniers, la divergence dans la distribution des individus mâle et femelle de *Paracentrotus lividus* peut être influencée par un ensemble de facteurs parmi, on citera la richesse en source de nutriment du site, la pollution et l'activité humaine (Fernandez et Boudouresque, 2000).

Tableau IV: Caractéristiques morphologiques des individus d'oursins échantillonnés.

Echantillon	Sexe	Poids (g)	Morphologie externe	Echantillon	Sexe	Poids (g)	Morphologie externe
B1	F	27,40	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : courts, violet foncé 	AI 1	F	43,79	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : assez longs, violet foncé
B2	F	32,80	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, violet foncé ▪ Piquants : assez longs, violet clair 	AI 2	M	32,26	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, violet foncé ▪ Piquants : courts, violet foncé
B3	F	27,80	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : courts, violet foncé 	AI 3	M	31,45	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : assez longs, violet clair
B4	F	26,10	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : assez longs, violet foncé 	AI 4	M	46,20	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : courts, violet foncé
B5	M	23,45	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, violet foncé ▪ Piquants : assez longs, violet foncé 	AI 5	M	23,48	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, violet foncé ▪ Piquants : courts, violet foncé
B6	M	28,42	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : assez courts, violet foncé 	AI 6	M	46,90	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Forme : arrondie, légèrement aplatie du côté de la face orale ▪ Coquille : rigide, noir ▪ Piquants : assez longs, violet foncé

AI 1: signifie oursin 1 des Aiguades, ... **AI6**; **B1**: signifie oursin 1 de la Brise, ... **B6**.

F : Femelle ; **M** : Male.

D'autre part, les résultats de la morphologie externe de *Paracentrotus lividus* exprime une distribution homogène de ce caractère entre les différents sites soit la Brise de mer ou les Aiguades.

IV.2. Aspect macroscopique des organes

Le tube digestif des oursins collectés présente une forme de faisceaux, une texture molle et une faible viscosité, tandis que leurs gonades se présentent sous forme de bandes avec une texture molle (Tableau V).

Les gonades mâles apparaissent avec une couleur claire (orange ou brune) par contre les gonades femelles apparaissent avec une couleur plus foncée comme de l'orange foncé ou du violet avec une texture granuleuse.

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par Lourenço et ses collaborateurs. Selon ces résultats, les femelles montrent un taux plus élevé d'œufs orange vif, attribué aux concentrations de caroténoïdes au sein des gonades (Lourenço *et al.*, 2022).

La couleur distincte des gonades de *P. lividus* est le résultat de l'accumulation de pigments caroténoïdes dans ses tissus. En fait, cette dernière est affectée par un ensemble de facteurs environnementaux et physiologiques tels que : le sexe des oursins et le niveau de maturité des gonades, le régime alimentaire et la saison. Cependant, quelle que soit la source de caroténoïdes, les femelles se caractérisent par une couleur plus prononcée par rapport aux mâles. Cette divergence est accordée au métabolisme et au mécanisme de stockage des caroténoïdes chez les femelles (Lourenço *et al.*, 2022).

Tableau V: Aspect macroscopique des organes extraits.

Les tubes digestifs			
Échantillons de la Brise		Échantillons des Aiguades	
B1	Couleur : Marron, noir + Petites granules jaune-verdâtre	AI 1	Couleur : Marron-vert, noir + Petites granules jaune
B2	//	AI 2	Marron vert + Petites granule jaunes
B3	//	AI 3	//
B4	//	AI 4	//
B5	//	AI 5	//
B6	//	AI 6	//
Les gonades			
Échantillons de la Brise		Échantillons des Aiguades	
B1	Rouge-orangé + Granules verts	AI 1	Orange
B2	Brun-orangé	AI 2	Marron
B3	Orange + Granules verts	AI 3	Orange, marron
B4	Brun-orangé	AI 4	Orange foncé
B5	Marron	AI 5	Orange clair
B6	Orange	AI 6	Orange foncé

IV.3. Diversité bactérienne des microbiotes de *Paracentrotus lividus*

IV.3.1. Dénombrement de la flore mésophile totale

La gélose PCA est un milieu de croissance non sélectif couramment utilisé pour évaluer la croissance bactérienne « totale » ou « viable » d'un échantillon.

Après incubation à 37°C pendant 72 heures, le nombre total de bactéries (exprimé en UFC) a été déterminé à partir des 24 spécimens (tubes digestifs + gonades) provenant des 2 sites d'échantillonnage (Annexe II).

D'après les résultats obtenus, quoi que ce soit l'organe en cause (tube digestif ou gonades), les échantillons provenant des Aiguades montrent une forte charge microbienne par rapport à ceux provenant de la Brise de mer. Cette divergence peut être reliée à la variation du degré de pollution de ces deux zones. Encore, les tubes digestifs (52.4%) représentent une abondance microbienne importante par rapport à celle des gonades (47.6%) (Figure n°15). Cette abondance dans le tube digestif peut être liée au régime alimentaire et aussi à l'antagonisme chimique qui peut structurer le microbiome de *Paracentrotus lividus* (Laport *et al.*, 2018).

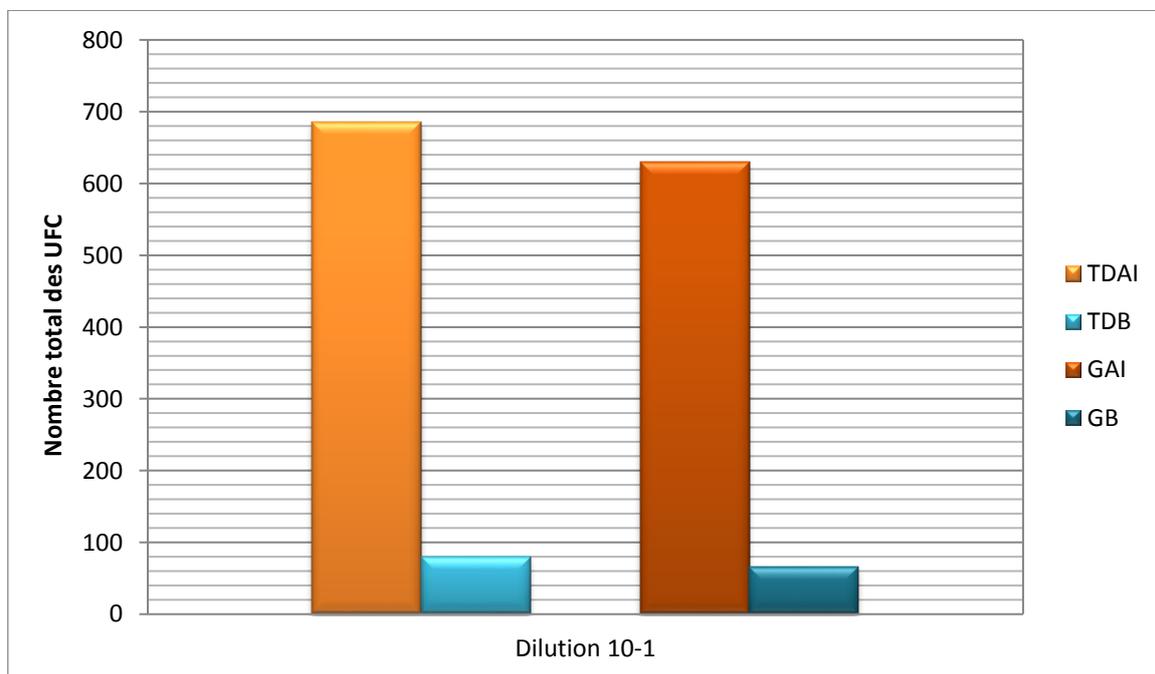


Figure n°15: Résultats de dénombrement bactérien effectué sur milieu PCA.

IV.3.2. Evaluation de la diversité du microbiote de l'oursin

Afin d'explorer la diversité des microbiotes d'oursin violet, le microbiote de 12 tubes digestifs et 12 gonades a été analysé par une approche cultivable, donnant lieu à plus de 80 isolats.

Parmi ces isolats, 30% ont été développés sur milieu EMB, 17,5% sur milieu MRS, 16,25% sur milieu Mossel, 13,75% sur milieu Baird Parker, 13,75% sur milieu Hektoen et 8,75% sur gélose à l'eau de mer. Ce qui pourra confirmer notre hypothèse concernant la diversité du microbiote de *Paracentrotus lividus* (Figure n°16).

L'analyse des résultats obtenus a mis en évidence la présence : des microbiotes spécifiques et sélectionnés chez l'oursin et des variations inter- et intra-individuelle de ces microbiotes. Cette variabilité peut être attribuée à la composition chimique, la densité et la nature de la nourriture retrouvée par l'oursin dans les sites d'échantillonnages (Annexe III).

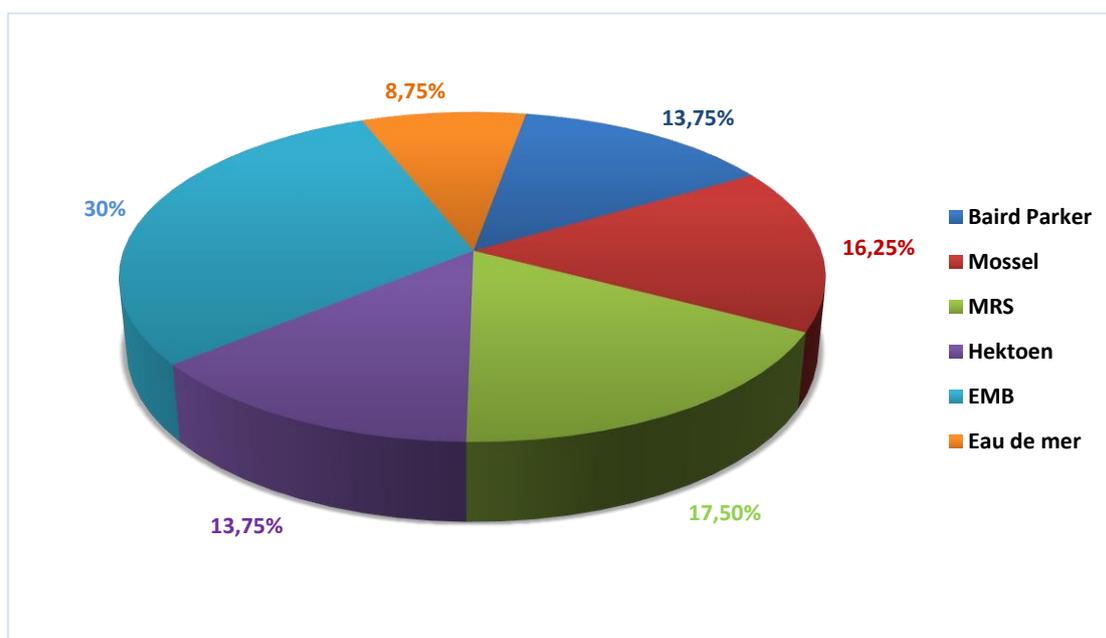


Figure n°16: Pourcentage des isolats obtenus sur chaque milieu ensemencé.

Lorsqu'une cellule bactérienne est placée dans un milieu de culture convenable et lorsque les conditions physico-chimiques approchant des conditions de leur écosystème naturel, elle va assurer ses biosynthèses, augmente de taille puis se divise. Cette croissance s'avère sous forme de colonies caractéristiques sur chaque milieu de culture (Figure n°17).

Afin d'identifier une souche microbienne, la première étape du biotypage est la description macroscopique des colonies bien isolées. Parfois, cette seule étude permet de connaître le germe en cause car les colonies sont vraiment typiques.

Le tableau dans l'annexe IV illustre la macromorphologie des isolats sur les différents milieux de culture testés.



A



B



C



D

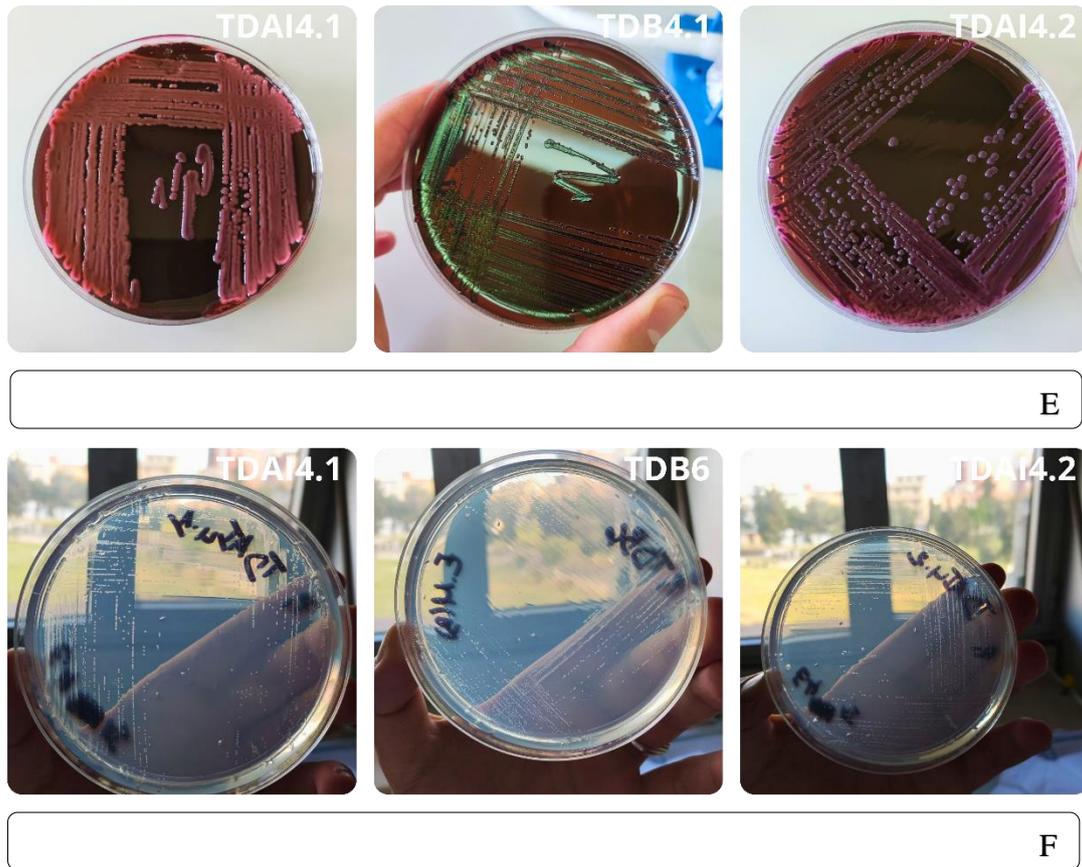


Figure n°17: La macromorphologie des isolats sur les différents milieux de culture testés. **A.** Sur milieu Baird Parker ; **B.** Sur milieu Mossel ; **C.** Sur milieu MRS ; **D.** Sur milieu Hektoen, **E.** Sur milieu EMB et **F.** Sur gélose à l'eau de mer (Prises par moi-même).

IV.3.3. La caractérisation phénotypique du microbiote de l'oursin

En se basant sur la similarité entre les isolats, 77 isolats sont sélectionnés des 80 isolats. Ces derniers sont soumis à la caractérisation phénotypique.

L'identification présomptive des souches isolées a été faite sur la base des caractéristiques culturelles sur gélose Baird Parker, Mossel, MRS, Hektoen, EMB et gélose à l'eau de mer associée à l'examen direct par coloration de Gram, complétée par des tests biochimiques complémentaires, à savoir: la recherche d'une catalase, oxydase et coagulase, test d'hémolyse et les galeries biochimiques classiques disponibles (API 20E, API 20NE, API Staph et API 50 CHB).

Cette approche phénotypique basant sur l'aspect macroscopique sur les différents milieux nous a apporté différents aspects concernant les différents milieux sélectifs utilisés, indiquant la variété bactérienne présente à la fois dans le microbiote intestinal et les gonades de nos oursins (Figure n°17).

Les examens microscopiques directs des colonies ayant poussées sur les milieux sélectifs utilisés montrent un polymicrobisme (Annexe V). En effet, on y distingue des cocci immobiles, isolés, par paire ou groupés en grappes et/ou en tétrades sur milieu Baird Parker, Mossel et MRS (Figure n°18) et des bâtonnets courts ou longs, isolés, en diplobacilles parfois en chaîne, certains mobiles (par ciliature péritriche) et d'autres immobiles sur milieu Hektoen, EMB, Mossel, MRS et gélose à l'eau de mer.

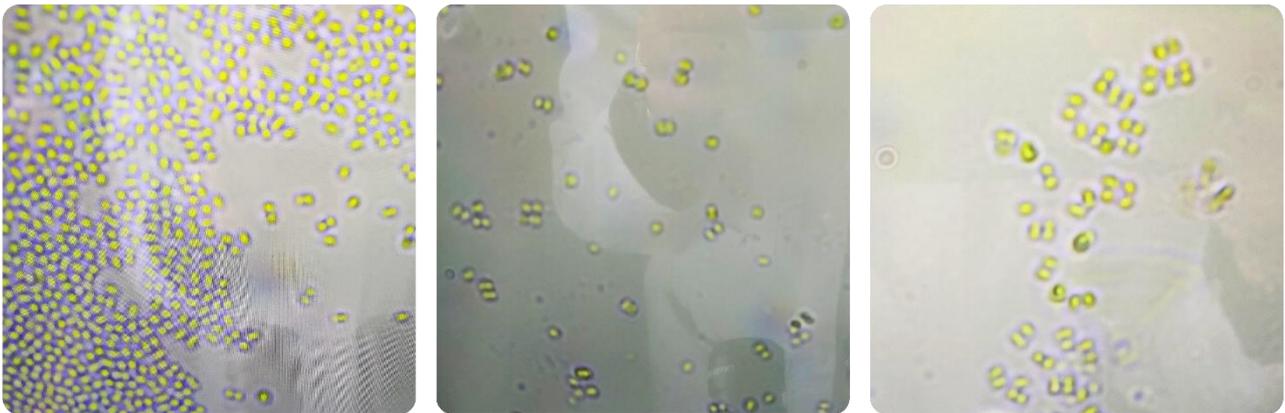


Figure n°18 : Etat frais d'une colonie isolée sur milieu Baird Parker.

Il convient de souligner que les microbiotes de l'oursin violet étaient principalement composés de bactéries mobiles (59.6%). En fait, quel que soit l'organe en question, les proportions des bactéries mobiles isolées des échantillons provenant de la Brise de mer étaient significativement plus élevées que celles des Aiguades.

Encore, 77% des isolats issus des gonades étaient mobiles contre seulement 47.5% des souches isolées des tubes digestifs (Figure n°19).

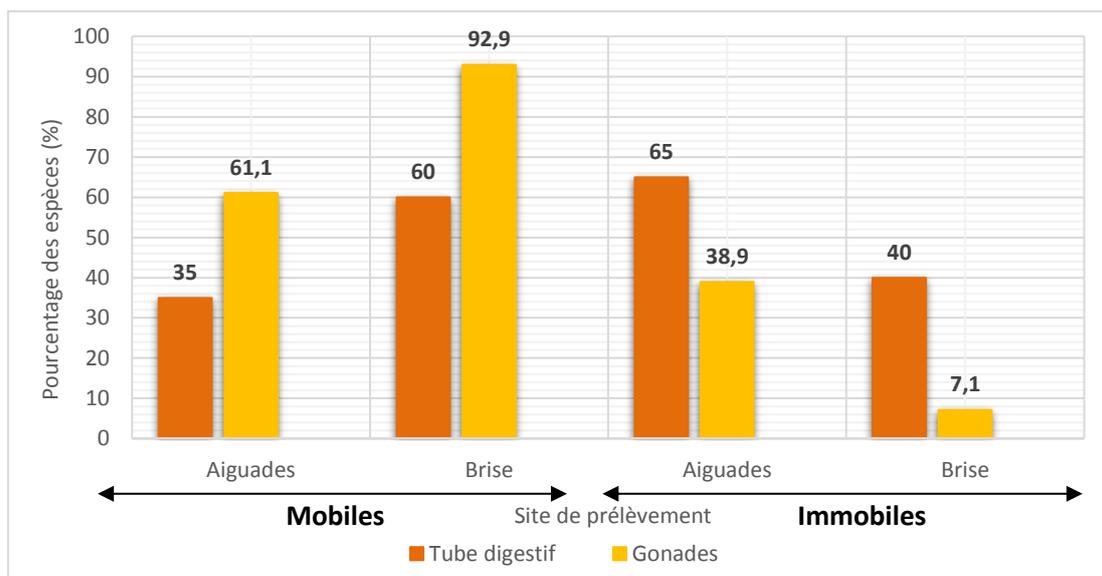


Figure n°19: Pourcentage des espèces bactériennes mobiles et immobiles isolées.

Selon les résultats obtenus, la composition des microbiotes (tube digestif et gonades) de *Paracentrotus lividus* était globalement dominée par les bactéries Gram négatives qui représentait plus de la moitié de l'abondance totale avec une moyenne de 70%, et dans une moindre mesure, par les bactéries Gram positives 30% (Annexe V) (Figure n°20).

Pour être plus précis, parmi les 77 isolats caractérisés : 73,4% de bactéries isolées des gonades étaient Gram négatif, tandis que 26,6% étaient Gram positif. Cependant, 68,5% de bactéries isolées des tubes digestifs étaient Gram négatif, alors que 31,5% étaient Gram positif.

La figure n°21 illustre les différentes proportions de bactéries Gram positives et Gram négatives obtenues.

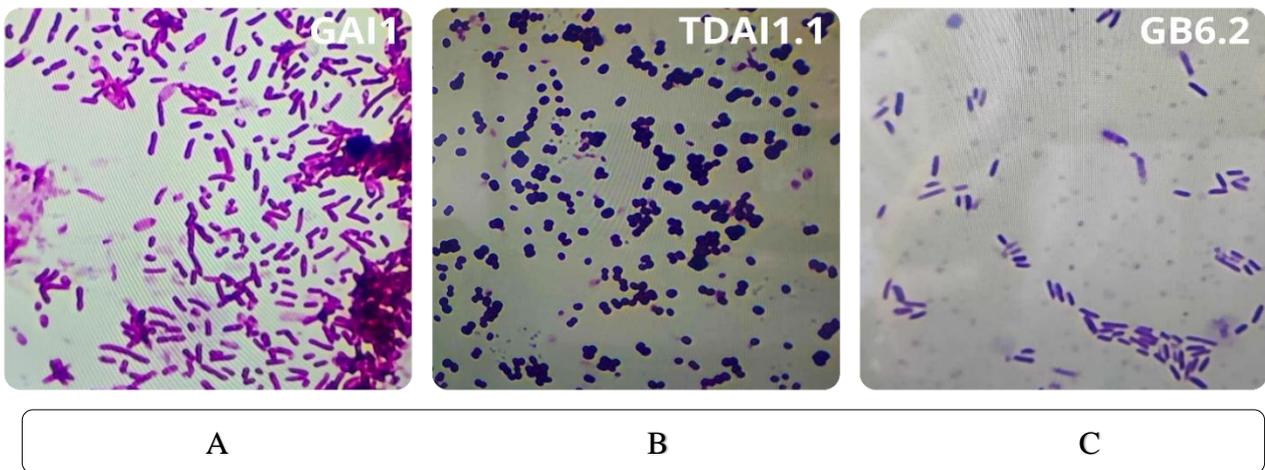


Figure n°20: Coloration de Gram de quelques isolats. **A.** Bacille à Gram négatif isolé sur milieu Hektoen ; **B.** Cocci à Gram positif isolé sur milieu Baird Parker et **C.** Bacille à Gram positif isolé sur milieu Mossel (Prise par moi-même).

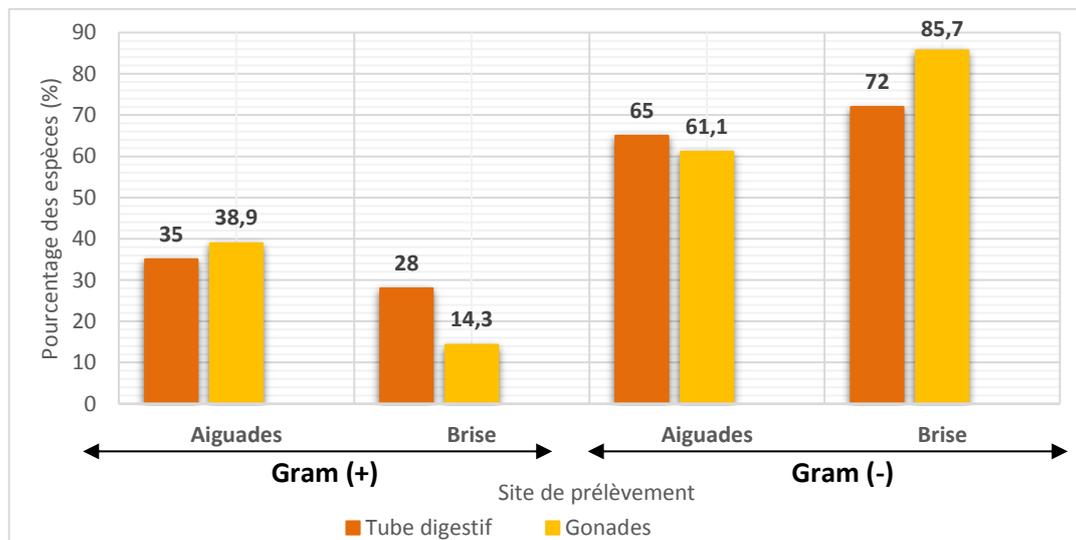


Figure n°21: Les proportions de bactéries Gram positives et Gram négatives obtenues.

Durant nos expérimentations nous avons pu exploiter le volet du potentiel enzymatique des isolats à savoir la catalase, l'oxydase, la coagulase et l'hémolyse.

Au contact de chaque colonie isolée avec le peroxyde d'oxygène, une effervescence plus au moins importante a été notée. En effet, les bactéries composant le microbiote intestinal et le système reproducteur (gonades) de l'oursin violet *Paracentrotus lividus* étaient principalement catalase positif (100%) (Annexe V) (Figure n°22).



Figure n°22: Recherche d'une catalase.

D'autre part, 92,2% de la totalité des isolats soient oxydase négative (Annexe V) (Figure n°23) et 80,2% et 19,9% des bactéries isolées des gonades étaient respectivement oxydase négative et oxydase positive (Figure n°24). 100% des souches isolées des tubes digestifs étaient oxydase négative.

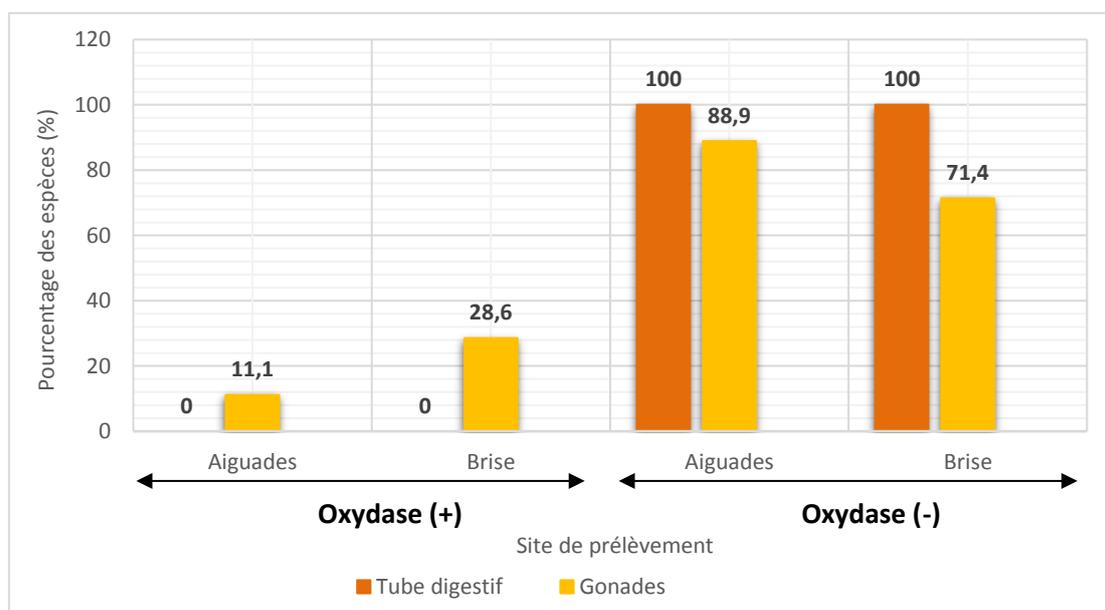


Figure n°23: Pourcentage des espèces ayant une oxydase positive ou négative obtenus.

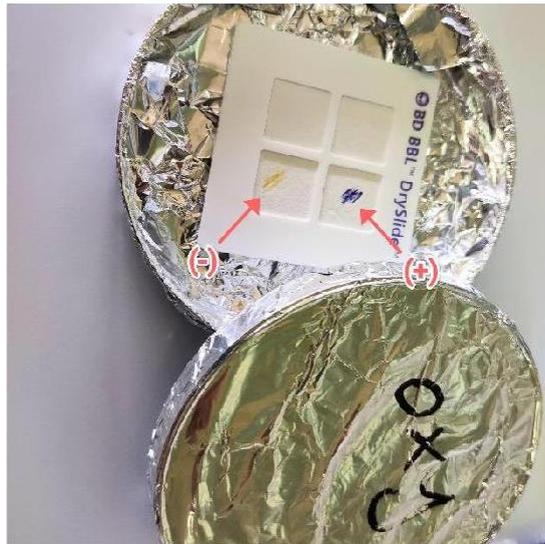


Figure n°24: Test d'oxydase.

Sur la base de l'aspect macroscopique et microscopique des colonies isolées sur milieu Baird Parker, Mossel et MRS, ainsi que leurs caractéristiques enzymatiques, 18 isolats sélectionnés parmi 38 ont été soumis au test de la coagulase (Annexe V).

Parmi ceux-ci, 03 uniquement ayant le code GAI1 ont présentés une coagulase positive, ce qui confirme que ces isolats sont affiliés à l'espèce de *Staphylococcus aureus* (Figure n°25).

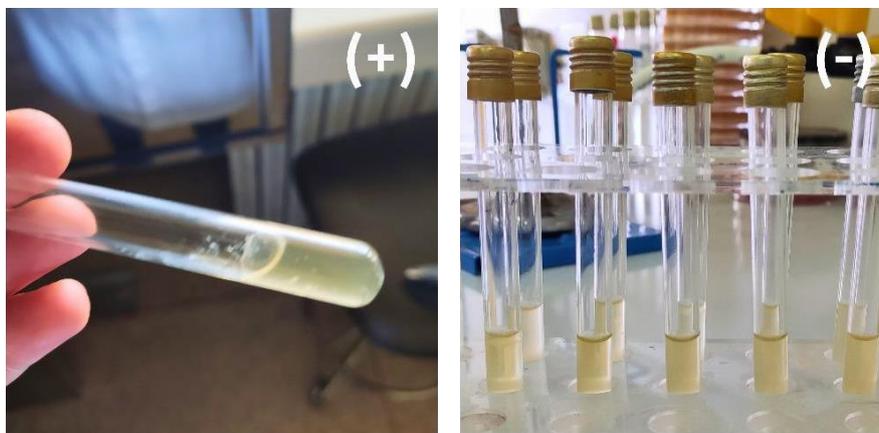


Figure n°25: Recherche d'une coagulase.

Même si elles prédominent encore dans de nombreuses pratiques de microbiologie, l'identification des *Bacillus* par les méthodes classiques est souvent difficile en raison de similitudes entre des espèces étroitement apparentées partageant un modèle de caractéristiques morphologiques, biochimiques et génétiques.

C'est pourquoi, parmi 27 isolats obtenus sur milieu Mossel et MRS, 20 ont été soumis au test d'hémolyse sur gélose au sang de mouton (5%).

Bien que 75% des isolats ont présentait une hémolyse de type α , 15% et 10% des isolats ont présentait une hémolyse de type γ et β respectivement (Annexe V) (Figure n°26).

Les bactéries composant le microbiote intestinal de *P. lividus* étaient majoritairement α hémolytiques (84,6%) et γ hémolytiques (15,4%), pendant que celles composant le microbiote des gonades étaient 57,1% α hémolytiques, 28,6% β hémolytiques et 14,3% γ hémolytiques (Figure n°27).



Figure n°26: Caractère hémolytique de quelques isolats. A. Hémolyse α ; B. Hémolyse β et C. Hémolyse γ (Prise par moi-même).

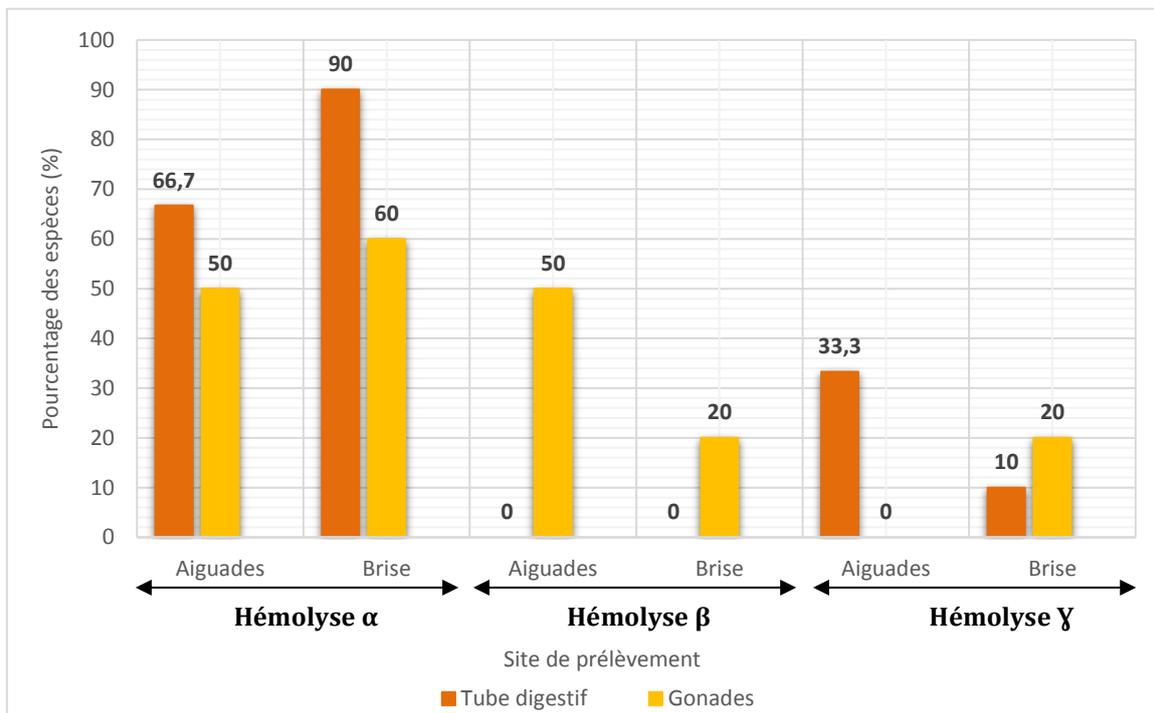


Figure n°27: Pourcentage des isolats ayant une hémolyse α , β et γ .

L'évaluation biochimique de nos isolats a fourni des informations supplémentaires sur les caractéristiques phénotypiques des bactéries isolées.

Le tableau VI illustre l'ensemble des espèces bactérienne identifiées en utilisant l'API 20E (Figure n°28), l'API 20NE (Figure n°29), l'API Staph (Figure n°30) et l'API 50 CHB (Figure n°31).

Tableau VI: Les espèces bactériennes identifiées à l'aide des galeries biochimiques.

	Tube digestif	Gonades
Aiguades	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ▪ <i>Micrococcus spp.</i> ▪ <i>Staphylococcus lentus</i> ▪ <i>Staphylococcus capitis</i> ▪ <i>Bacillus lentus</i> ▪ <i>Klebsiella oxytoca</i> ▪ <i>Enterobacter cloacae</i> ▪ <i>Kluyvera spp.</i> ▪ <i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 2</i> ▪ <i>Citrobacter youngae</i> ▪ <i>Serratia odorifera1</i> ▪ <i>Pantoea spp2</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Staphylococcus aureus</i> ▪ <i>Staphylococcus xylosus</i> ▪ <i>Micrococcus spp.</i> ▪ <i>Bacillus cereus</i> ▪ <i>Enterobacter cloacae</i> ▪ <i>Cronobacter spp.</i> ▪ <i>Aeromonas hydrophila gr2</i> ▪ <i>Kluyvera spp.</i> ▪ <i>Klebsiella oxytoca</i> ▪ <i>Citrobacter youngae</i> ▪ <i>Pseudomonas luteola</i>
Brise de mer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ▪ <i>Providencia rettgeri</i> ▪ <i>Morganilla morgani spp morgani</i> ▪ <i>Escherichia coli 1</i> ▪ <i>Klebsiella oxytoca</i> ▪ <i>Citrobacter amalonaticus</i> ▪ <i>Enterobacter cloacae</i> ▪ <i>Pantoea spp4</i> ▪ <i>Citrobacter freundii</i> ▪ <i>Klebsiella oxytoca</i> ▪ <i>Salmonella spp.</i> ▪ <i>Raoultella ornithinolytica</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>Staphylococcus epidermidis</i> ▪ <i>Bacillus cereus</i> ▪ <i>Providencia rettgeri</i> ▪ <i>Aeromonas hydrophila 1</i> ▪ <i>Pseudomonas oryzihabitans</i> ▪ <i>Citrobacter freundii</i> ▪ <i>Citrobacter youngae</i>



Figure n°28: Galerie API 20E appliquée pour l'identification des entérobactéries.



Figure n°29: Galerie API 20NE appliquée pour l'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires.



Figure n°30: Galerie API Staph appliquée pour l'identification des staphylocoques et microcoques isolés sur Baird Parker, MRS et Mossel.



Figure n°31: Galerie API 50 CHB appliquée pour l'identification des *Bacillus* et apparentés isolés sur milieu MRS et Mossel.

Les écosystèmes marins abritent une diversité notable de microorganismes, notamment dans l'intestin des macro-organismes. Ces écosystèmes sont vulnérables aux changements anthropiques, en particulier au réchauffement et à l'acidification des océans (Chiarello, 2017 ; Hughes *et al.*, 2017).

Malgré que les communautés microbiennes habitant les invertébrés marins jouent un rôle capital dans la condition physique de l'hôte, la médiation d'une résistance aux agents pathogènes et la tolérance aux perturbations environnementales ; la majeure partie de leur diversité, y compris la variabilité entre les espèces et les groupes d'animaux, est encore largement méconnu (Chiarello, 2017).

Afin de comprendre les interactions existantes entre l'hôte *Paracentrotus lividus*, son microbiote et l'environnement, notre étude a été menée entre deux sites géographiques distincts: la Brise de mer et les Aiguades.

Ces sites d'étude ont été choisis pour diverses raisons. Premièrement, en raison de leur facilité d'accès et leur exposition à différents degrés de pressions anthropiques. Deuxièmement, ils se caractérisent par la présence continue de *P. lividus* tout au long de l'année. Troisièmement, ils bénéficient d'une situation géographique unique soumise à de nombreux défis écologiques, notamment à différentes formes de pollution dues aux rejets des ports et d'entreprises à caractères industriels, agricoles et urbains.

Dans les études dépendantes des cultures bactériennes, savoir quelles sont les espèces présentes dans les échantillons originaux est critique. Par conséquent, les profils de la communauté bactérienne des oursins ont été analysés avec 77 isolats provenant du système digestif et reproducteur de 12 spécimens de *P. lividus*.

Sur la base des caractéristiques morphologiques, les souches ont été sélectionnées, identifiées phénotypiquement et classées en 4 *phyla*. Les analyses effectuées ont montré que peu de souches bactériennes isolées étaient spécifiques à chaque site.

En fait, nos résultats démontrent la présence de trois *phyla* communs aux Aiguades et à la Brise de mer à savoir: *Pseudomonadota*, *Bacillota* et *Firmicutes*, contre 1 seul *phylum* inclus exclusivement dans les Aiguades : *Actinomycetota* (Figure n°32).

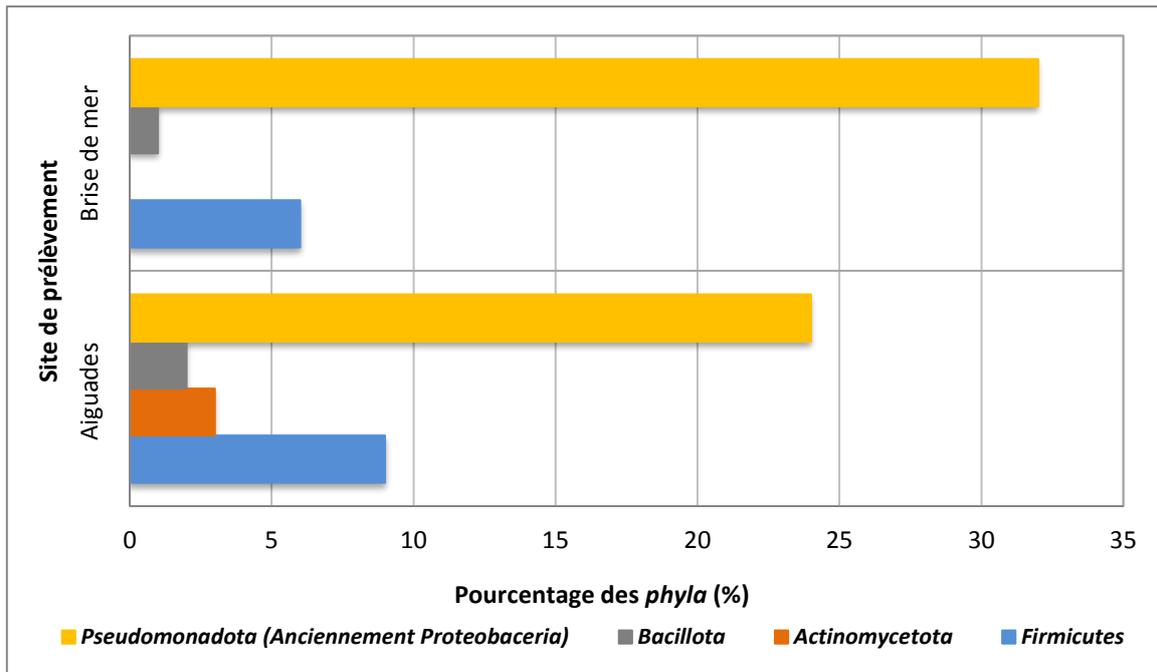


Figure n°32: Principaux *phyla* composant le microbiote de l'oursin *P. lividus* isolés sur deux sites différents.

Par ailleurs, l'existence de microbiotes anatomiques distincts (tube digestif et gonades) a été décrite. Leur composition était principalement dominée par le *phylum* des *Pseudomonadota* (anciennement Protéobactéries) (72,7%), et dans une moindre mesure, par les *Firmicutes* (19,5%), les *Actinomycetota* (3,9%) et les *Bacillota* (3,9%) (Figure n°33).

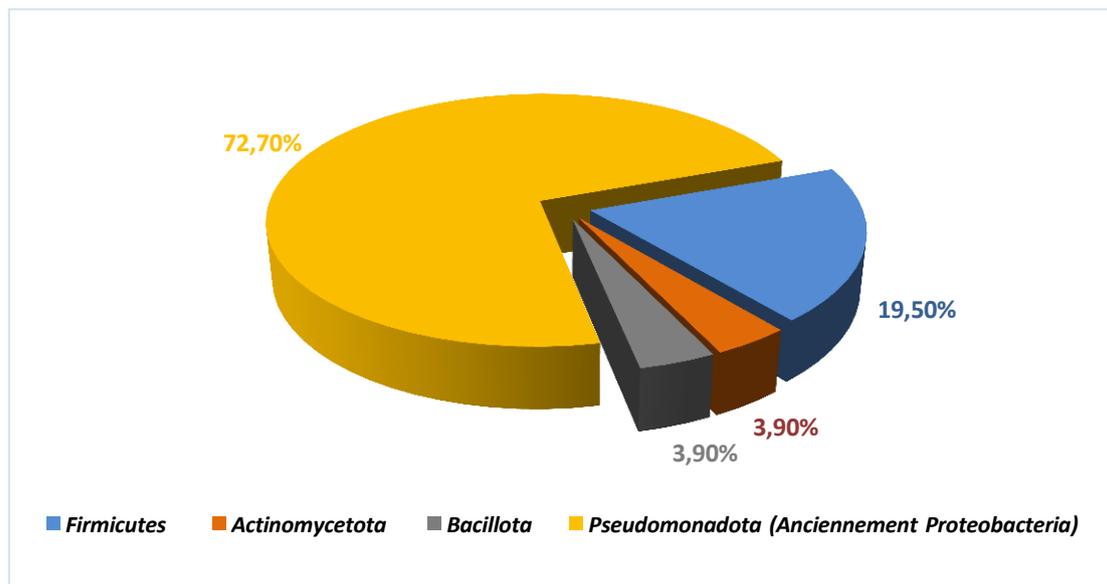


Figure n°33: Pourcentage des principaux *phyla* composant le microbiote de l'oursin *P. lividus*.

Dans cette étude, nous avons constaté qu'il n'y a pas de différence significative entre le microbiote composant le tube digestif et les gonades d'oursins, pendant que la composition bactérienne du système digestif des oursins provenant des Aiguades était remarquablement différente de celle observée chez ceux issus de la Brise de mer. De même, la constitution bactérienne des gonades provenant des Aiguades était autre que celles provenant de la Brise de mer (Figure n°34).

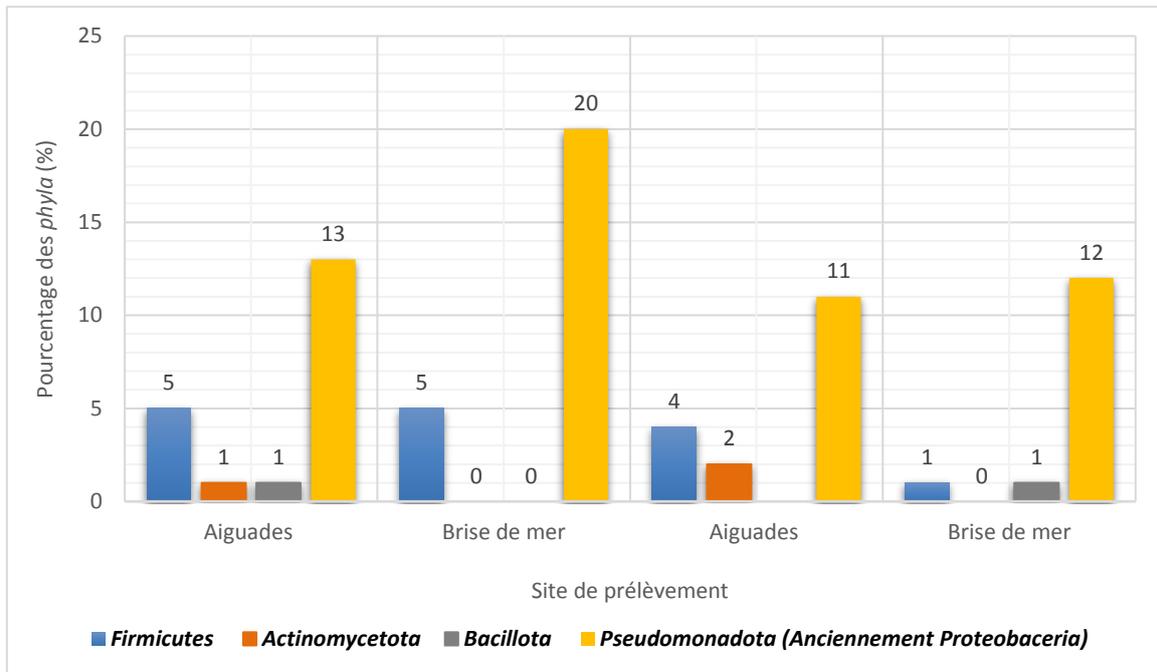


Figure n°34: Les *phylums* isolés des organes étudiés provenant de deux sites différents.

Cette constatation, nous a permis de révéler qu'un noyau de microbiote bactérien formé de membres des *phyla* *Proteobacteria* et *Firmicutes* est établi dans tous les échantillons analysés, quel que soit l'organe ou le site d'échantillonnage.

En particulier, un tel noyau comprend la famille des *Aeromonadaceae* (3,9%), *Enterobacteriaceae* (49,4%), *Erwiniaceae* (2,6%), *Morganellaceae* (13%), *Pseudomonadaceae* (2,6%) et *Yersiniaceae* (1,3%) appartenant au *phylum* des *Proteobacteria*, ainsi que la famille des *Staphylococcaceae* (19,5%) appartenant au *phylum* des *Firmicutes*.

Par ailleurs, les taxons minoritaires typiquement liés à la localisation géographique, représentés par les membres de la famille des *Micrococcaceae* (3,9%) et *Bacillaceae* (3,9%) appartenant respectivement aux *phyla* *Actinomycetota* et *Bacillota*, constituaient la partie la plus variable de la structure des microbiotes bactériens d'oursin.

La figure n°35 illustre l'ensemble de souches bactériennes isolées par analyse culture-dépendante. Elle révèle une diversité significative parmi les isolats provenant des 2 sites d'échantillonnage avec une dominance notable des entérobactéries.

Compte tenu des souches identifiées dans les 2 sites de collecte (Figure n°36A), seules 5 souches (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* et *Citrobacter youngae*) ont été partagées entre les oursins collectés.

À partir des échantillons des Aiguades, 13 souches spécifiques ont été trouvées, à savoir: *Staphylococcus aureus*, *S. xylosum*, *S. lentus*, *S. capitis*, *Micrococcus spp.*, *Bacillus lentus*, *Kluyvera spp.*, *Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae2*, *Serratia odorifera1*, *Pantoea spp2*, *Cronobacter spp.*, *Aeromonas hydrophila gr2* et *Pseudomonas luteola* ; contre 10 souches exclusivement incluses dans la Brise de mer, notamment: *Aeromonas hydrophila1*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Providencia rettgeri*, *Raoultella ornithinolytica*, *Pantoea spp4*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter amalonaticus* et *Morganella morganii spp morganii*.

Lorsque la répartition des souches a été analysée entre les organes provenant du même site ou non, cinq souches bactériennes étaient partagées entre le tube digestif et les gonades des Aiguades (Figure n°36B), trois entre le tube digestif et les gonades de la Brise de mer (Figure n°36C), trois entre les tubes digestifs provenant des Aiguades et la Brise de mer (Figure n°36D) et seulement deux partagées entre les gonades issues des différents sites (Figure n°36E). La figure n°36F démontre les souches partagées par les différents organes et sites de collecte des oursins.

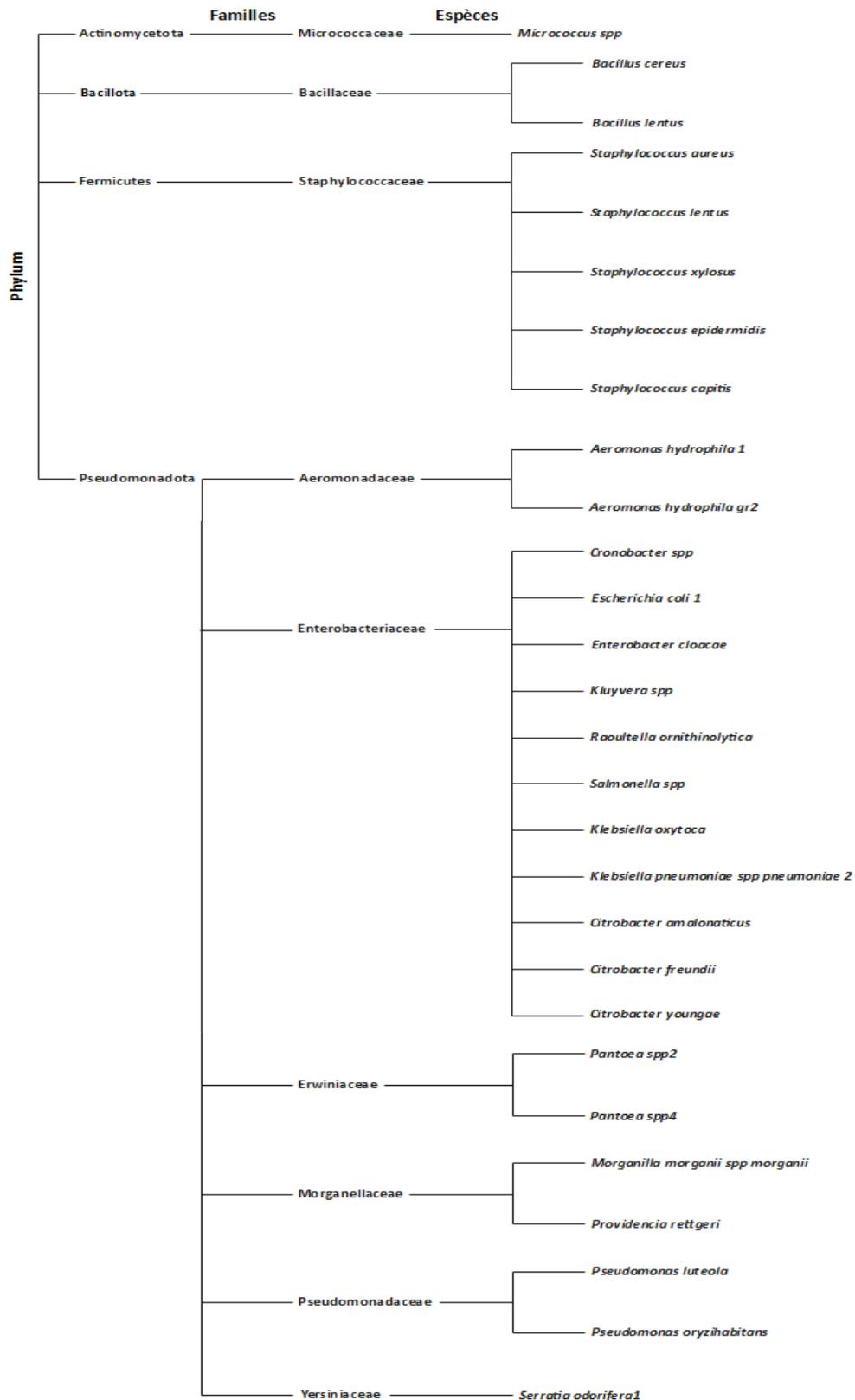


Figure n°35: Les souches bactériennes isolées par analyse culture-dépendante (Réalisé par moi-même-EdrawMax).

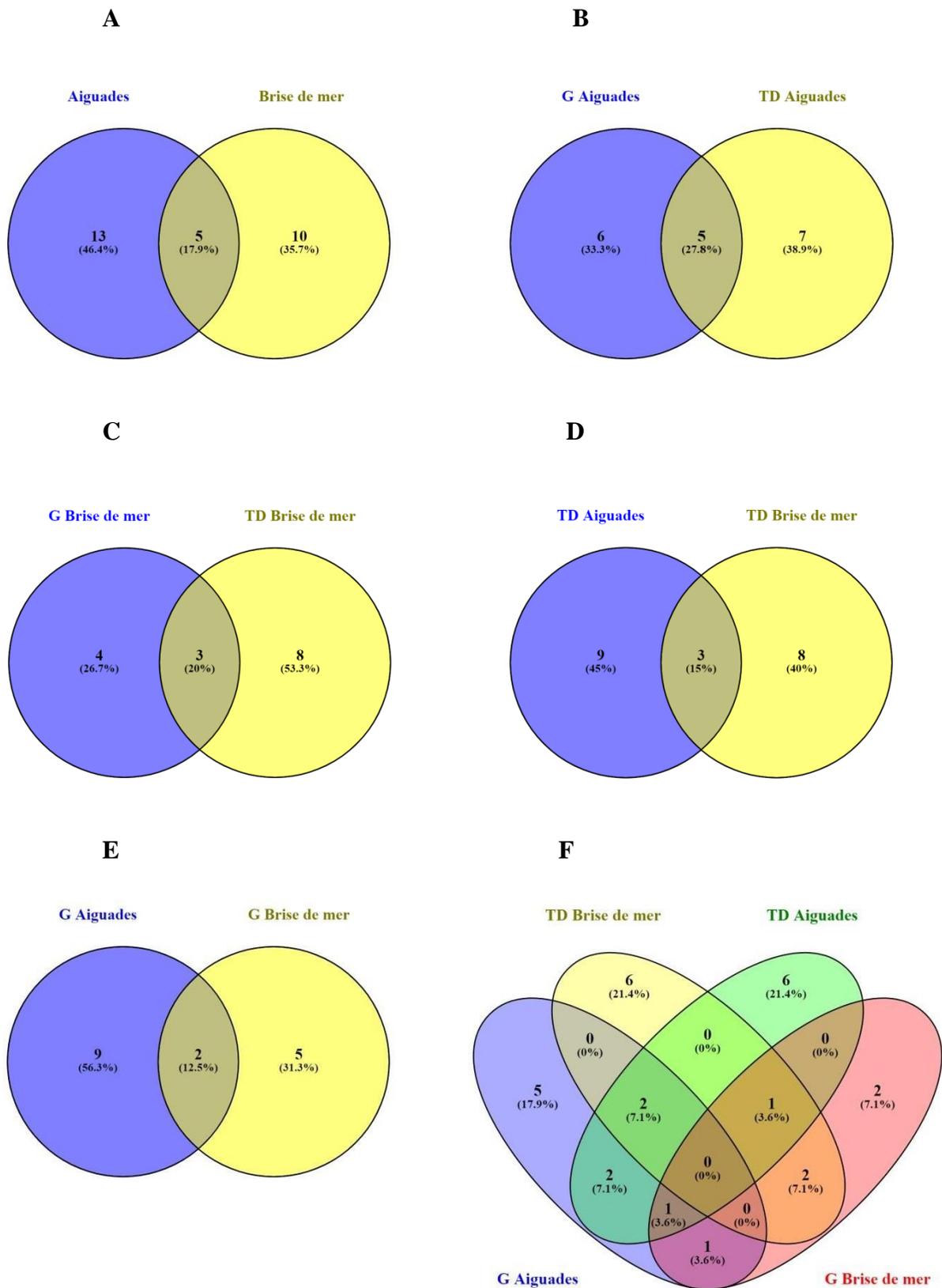


Figure n°36: Nombre de souches bactériennes communes et uniques présentées dans les organes (tube digestif et gonades) de l’oursin *P. lividus* collectés sur deux sites différents. Des diagrammes de Venn ont été construits en tenant compte de toutes les souches bactériennes identifiées (Réalisé par moi-même-Venny 2.1.0).

La présence de bactéries au sein des invertébrés marins présente des avantages à la fois pour les bactéries et pour l'hôte. En fait, les microorganismes peuvent fournir aux cellules hôtes des sources alternatives de carbone, de protéines et d'énergie ainsi que l'hydrolyse de composés organiques complexes (Laport *et al.*, 2018).

À son retour, l'hôte fournit aux microorganismes un environnement stable, exempt de prédateurs (Laport *et al.*, 2018).

Paracentrotus lividus, une espèce utilisée comme animal modèle dans les études écotoxicologiques et largement appréciée pour ses gonades (Khaili *et al.*, 2024), est constamment exposés à de fortes concentrations de microorganismes dont certains sont pathogènes (Laport *et al.*, 2018).

En effet, des asymétries individuelles dans la composition des microbiotes bactériens des oursins ont été rapportées par plusieurs auteurs (Faddetta *et al.*, 2020).

Par exemple, Enomoto *et al.* (2012) ont signalé une structure distincte du microbiote bactérien chez les échinodermes. Ces découvertes, couplées au fait que le liquide cœlomique des échinodermes est en équilibre dynamique avec l'environnement marin, soulèvent des questions sur la stabilité de la composition du microbiote intestinale et gonadique des oursins individuels selon les saisons et les sites géographiques (Faddetta *et al.*, 2020).

Ce point a été abordé dans la présente étude en décrivant et en analysant de manière comparative le microbiote bactérien résidant dans le tube digestif et les gonades d'oursins collectés sur deux sites géographiques distincts.

Sur la base des données obtenus, nos résultats concordent parfaitement avec les études antérieures réalisées sur les microbiotes des oursins. L'ensemble de ces études fait part d'une composition bactérienne distincte et omniprésente, visiblement différente de la communauté bactérienne des aliments ingérés, de l'environnement marin et des fèces évacuées dépendant de nombreux facteurs, parmi lesquels l'affiliation taxonomique de l'hôte, le compartiment anatomique ciblé, l'environnement etc. (Hakim *et al.*, 2016).

À titre d'exemple, une étude récente réalisée sur l'impact du réchauffement océanique sur le microbiome d'oursin commun suggère que les augmentations de la température de l'eau de mer induites par le climat dans un avenir proche pourraient modifier la composition et la fonction de la communauté microbienne et avoir un impact sur la physiologie digestive et immunitaire des oursins (Brothers *et al.*, 2018).

Une autre hypothèse suggérée par la présence de souches spécifiques présentes uniquement dans un microbiote et absentes dans un autre, était la sélection du microbiote. Qui et comment a été effectuée cette sélection : par l'hôte, par le microbiote lui-même ou par l'holobionte ? C'est la question qui se pose (Laguerre, 2021).

Chez les échinodermes, plusieurs études affirment qu'une imprégnation des larves par les communautés bactériennes de l'environnement (transmission horizontale), s'effectue en premier lieu par l'épiderme dès les premiers stades embryonnaires, ensuite par le système digestif pour les stades larvaires qui s'alimentent. Outre cet enrichissement temporel quantitatif, le microbiote évolue en fonction du stade larvaire, en qualité (Carrier et Reitzel, 2020). Par ailleurs, la présence de nombreux taxons communs entre l'eau de mer et les microbiotes des échinodermes, notamment celui de *P. lividus* pose l'hypothèse d'une transmission horizontale avec l'environnement (Nakagawa *et al.*, 2017), pendant que la présence de taxons spécifiques dès les premiers stades de vie pose l'hypothèse d'une sélection précoce par l'holobionte (Asmani *et al.*, 2016).

Par conséquent, notre étude portant sur l'analyse de la diversité bactérienne de l'oursin violet *P. lividus*, a mis en évidence des microbiotes spécifiques et sélectionnés par rapport aux communautés bactériennes.

Conformément aux observations de Laport *et al.* (2018) et Faddetta *et al.* (2020), le profil bactérien de l'oursin *P. lividus* a révélé d'une part, une occurrence quasi exclusive des *Pseudomonadota*, un des principaux *phyla* marins impliqués dans les cycles d'azote, carbone et soufre, ayant un rôle clé dans le recyclage de la matière organique dissoute.

Ce *phylum* majoritaire était également l'un des *phyla* les plus isolées par Meziti et ses collègues et Nelson et ses collègues à partir des organismes marins. Il occupait les mêmes rangs d'abondance, dans les microbiotes d'autres échinodermes, ou chez d'autres invertébrés marins. D'autre part, des taxons minoritaires notamment *Actinomycetota* et *Bacillota* typiquement liés à l'emplacement géographique et/ou à l'espèce ont été identifiés. Ils constituaient la partie variable du microbiote bactérien de l'oursin (Meziti *et al.*, 2007).

Ces résultats pourraient : affirmer que la composition du microbiote peut varier, en termes de diversité et d'abondance, en fonction de différents facteurs, de l'environnement, de l'hôte, ou du microbiote lui-même ; refléter des stimuli environnementaux et physiologiques pour chaque individu de *P. lividus*, pouvant être très variables dans les zones proches des régions fortement anthropisées (Faddetta *et al.*, 2020).

L'influence des facteurs environnementaux sur le microbiote des oursins peut s'expliquer par leur mode de vie benthique, leur hétérogénéité à petites échelles spatiales, ainsi que par la variation spatiale et temporelle des facteurs abiotiques et biotiques (pollution, pathogènes etc.) (Laguerre, 2021).

En outre, la distribution des communautés microbiennes dans un écosystème aussi unique et compartimenté suggère soit un attribut sélectif de l'hôte pour favoriser la croissance de membres microbiens clés, une stratégie de vie microbienne sélectionnant l'environnement intestinal et gonadique de l'hôte comme propice à la croissance et à la division ou une combinaison complexe des deux circonstances (Hakim *et al.*, 2016).

Il convient de mentionner que tous les *phyla* identifiés dans la présente étude ont été précédemment décrits comme communément associés aux écosystèmes marins et en particulier aux invertébrés marins.

Ces *phyla* pourraient avoir des rôles métaboliques et physiologiques importants chez leurs espèces hôtes, un rôle présumé dans le développement embryonnaire de *P. lividus* et occuper différentes fonctions depuis la dégradation des composés organiques, jusqu'à la production de peptides antibactériens ou à l'inverse responsables de réactions pathogènes (Desriac *et al.*, 2013 ; Boraiy, 2018 ; Faddetta *et al.*, 2020).

Chez les échinodermes, l'impact de la maladie sur le microbiote a été décrit chez les oursins. En effet, l'évolution d'une pathologie a pour conséquence une modification des microbiotes des compartiments anatomiques affectés. Ces modifications s'accompagnent d'une diminution de la richesse et la diversité, traduisant le développement des microorganismes pathogènes et/ou opportunistes, et conduisent, inexorablement, à une dysbiose (Laguerre, 2021).

Quoique le *Vibrio* constitue l'un des principaux genres isolés du milieu marin, sa faible prévalence ou son absence parmi les souches fréquemment isolées des oursins, soulève de nombreuses questions.

Toutefois, de nombreux travaux récents ont prouvés que *P. lividus* maintenu dans des conditions non polluées, était apte d'éliminer efficacement les bactéries pathogènes, entre autres *Vibrio sp.* et *Aeromonas sp.*, connus pour être mortel pour cette espèce (Böttger et McClintock, 2009). Cela, justifie probablement la faible fréquence d'isolement des *Vibrio* à partir d'oursins sains.

Il est important de souligner qu'après isolement sélectif des échantillons sur milieu Mossel et MRS, des souches appartenant au *phylum* des *Pseudomonadota* ont été identifiées. Vu qu'il s'agit des milieux destinés à la sélection des Gram positifs et donc à l'inhibition totale des Gram négatifs, il apparaît soupçonneux.

Ce constat peut probablement s'expliquer par le fait que dans un écosystème donné, les bactéries peuvent acquérir un ADN exogène. En fait, les bactéries disposent de différentes méthodes pour transférer l'ADN d'une cellule à une autre à savoir : la transformation, correspondant à l'incorporation d'un ADN extracellulaire, linéaire ou circulaire, libéré par la lyse de cellules mortes ou de particules virales ou excrété par des cellules viables (Prescott *et al.*, 2003 ; Zaneveld *et al.*, 2008) et la transduction, consistant en l'acquisition de séquences d'ADN par la bactérie suite à une infection par un bactériophage.

À la lumière de cette étude, nous avons montré que la diversité bactérienne de l'oursin violet *P. lividus* peut varier en fonction des conditions environnementales dans lesquelles se trouve.

Nos résultats fournissent non seulement une source inexplorée et inexploitée de diversité microbienne, mais pourraient également être utiles pour décoder les fonctions biologiques du microbiote des échinodermes et comprendre les rôles des bactéries dans leur physiologie et écologie, notamment leur capacité de détecter à la fois le stress biotique et abiotique ainsi de reconnaître, transformer et éliminer de nombreuses matières potentiellement nocives.

Conclusion

La biodiversité peut être déclinée à différentes échelles d'organisation, depuis l'écosystème jusqu'au gène.

Au cours des dernières années, de nombreuses approches intégratives à la croisée des disciplines ont été développées pour explorer le système environnement, hôte et microbiote d'un large éventail d'échinodermes. Celles-ci, ont montré que la structure et la composition du microbiote sont influencées par l'écologie et la géographie du site d'échantillonnage, la saison, le stade de vie de l'hôte et l'état de santé, entre autres facteurs.

À la lumière de ces résultats, notre étude a justement visée à étudier la biodiversité entre et à l'intérieur des individus d'une même espèce, « *Paracentrotus lividus* ».

L'analyse des microbiotes de deux compartiments anatomiques de *Paracentrotus lividus*, le tube digestif et les gonades, sur deux sites différents répond à la question de la spécificité du microbiote à l'échelle intra-anatomique. Des microbiotes spécifiques et distincts sont associés à chacun des deux compartiments anatomiques étudiés, argumentant en faveur d'une spécialisation anatomique. Des variations spatio-temporelles des microbiotes ont été observées, cependant, une part des microbiotes s'est avérée prévalent, démontrant l'existence de core microbiote. La présence de ce core microbiote dominant (*Pseudomonadota*) et de taxons spécifiques minoritaires (*Firmicutes*, *Actinomycetota* et *Bacillota*) pose la question du rôle des microbiotes chez l'holobionte, et de leur acquisition durant la vie de l'hôte.

Au terme de ce travail, le constat est que ces souches sont géo-spécifiques. En effet, les résultats que nous avons obtenus dévoilent la variabilité des microbiotes des oursins d'une région à l'autre, mettant en avant l'influence de l'écosystème sur cette diversité.

Cette recherche fournira des informations sur les microbiotes des humains et servira de modèle animal important. De ce fait, Il serait intéressant de mieux explorer la biodiversité chez l'oursin, en mettant l'accent sur la relation mutualiste entre l'hôte et son microbiome, ainsi qu'entre les espèces bactériennes, leurs rôles et leurs effets sur la physiologie et l'immunité de *Paracentrotus lividus*.

À souligner, l'identification des espèces bactériennes hébergées par *Paracentrotus lividus* avec une approche génotypique, pourra contribuer à améliorer les connaissances sur le microbiote de l'oursin.

Références bibliographiques

A

- Abadie, A. (2023).** L'oursin violet. In : *SEA(E) SCAPE*.
- Agnello, M. (2017).** Oursin - De l'environnement à l'aquaculture et à la biomédecine.
- Albrizio, M., Aiudi, G., Cicirelli, V., Guaricci, A. C., Passantino, G., Di Summa, A., & Zizzo, N. (2019).** Male reproductive physiology of *Paracentrotus lividus*: monthly and seasonal evaluations to study the effects of the environment on gonadal development and sperm cells kinetic. *Aquaculture*, 503, 620-627.
- Allain, J. Y. (1972).** La pêche aux oursins dans le monde. *Pêche Merit*, 1133, 625-630.
- Allain, J. Y. (1975).** Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lamarck)(Echinodermata, Echinoidea) soumises à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Revue des travaux de l'Institut des pêches maritimes*, 39(2), 171-212.
- Apprill, A. (2017).** Marine animal microbiomes: toward understanding host–microbiome interactions in a changing ocean. *Frontiers in Marine Science*, 4, 222.
- Asmani, K., Petton, B., Le Grand, J., Mounier, J., Robert, R., and Nicolas, J.-L. (2016).** Establishment of microbiota in larval culture of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, 464, 434–444.

B

- Barrier, C., Ternengo, S., El Idrissi, O., Piacentini, L., Barrier, N., Lett, C., ... & Durieux, E. D. H. (2024).** Edible Sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval dispersal and connectivity modelling in the northwestern Mediterranean Sea. *Journal of Sea Research*, 197, 102464.
- Barros, I., Froufe, H., Marnellos, G., Egas, C., Delaney, J., Clamp, M., ... & Bettencourt, R. (2018).** Metatranscriptomics profile of the gill microbial community during *Bathymodiolus azoricus* aquarium acclimatization at atmospheric pressure. *Aims Microbiology*, 4(2), 240.
- Bay-Nouailhat, A. (2005).** Description de *Paracentrotus lividus* : Châtaigne de mer.
- Bellec, L., Bonavita, M. A. C., Hourdez, S., Jebbar, M., Tasiemski, A., Durand, L., ... & Zeppilli, D. (2019).** Chemosynthetic ectosymbionts associated with a shallow-water marine nematode. *Scientific Reports*, 9(1), 7019.

- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Vergès, M. C. C., Charles, T., ... & Schloter, M. (2020).** Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome*, 8, 1-22.
- Bertucci, J. I., Veloso-Cerredeño, C., & Bellas, J. (2023).** Global climate change increases the impact of pollutant mixtures in the model species *Paracentrotus lividus*. *Science of The Total Environment*, 893, 164837.
- Björk, J. R., O'Hara, R. B., Ribes, M., Coma, R., & Montoya, J. M. (2017).** The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. *BioRxiv*, 137885.
- Björk, J. R., O'Hara, R. B., Ribes, M., Coma, R., & Montoya, J. M. (2017). The dynamic core microbiome: Structure, dynamics and stability. *BioRxiv*, 137885.
- Boraïy, L. (2018).** *Analysis of sea urchin Paracentrotus lividus microbiota*. (Dissertation, Swiss) 41p.
- Böttger, S. A., & McClintock, J. B. (2009).** The effects of chronic inorganic and organic phosphate exposure on bactericidal activity of the coelomic fluid of the sea urchin *Lytechinus variegatus* (Lamarck)(Echinodermata: Echinoidea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(1), 39-44.
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2007).** Ecology of *Paracentrotus lividus*. In *Developments in aquaculture and fisheries science* (Vol. 37, pp. 243-285). Elsevier.
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2013).** *Paracentrotus lividus*. In *Developments in aquaculture and fisheries science* (Vol. 38, pp. 297-327). Elsevier.
- Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2020).** *Paracentrotus lividus*. In *Developments in aquaculture and fisheries science* (Vol. 43, pp. 447-485). Elsevier.
- Bouiba^a, S., Bendimerad, M. E. A., & Richir, J. (2024).** Morphological and physiological characterization of the regular sea urchin *Paracentrotus lividus* in Algeria, with recommendations for the sustainable fishing of the resource. *Regional Studies in Marine Science*, 103490.
- Bouiba^b, S. Y., Bendimerad, M. E. A., Rouane-Hacene, O., Boualga, A., & Richir, J. (2024).** Metallic trace element dynamics in *Paracentrotus lividus* from Algeria: Environmental large-scale survey and human health risk assessment. *Science of The Total Environment*, 915, 169492.

Brothers, C. J., Van Der Pol, W. J., Morrow, C. D., Hakim, J. A., Koo, H., & McClintock, J. B. (2018). Ocean warming alters predicted microbiome functionality in a common sea urchin. *Proceedings of the Royal Society B*, 285(1881), 20180340.

Brundu, G., Cannavacciuolo, A., Nannini, M., Somma, E., Munari, M., Zupo, V., & Farina, S. (2023). Development of an efficient, noninvasive method for identifying gender year-round in the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 564, 739082.

C

Carrier, T. J., & Reitzel, A. M. (2020). Symbiotic life of echinoderm larvae. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 509.

Casal, G., Fernández-Boán, M., Fernández, N., Freire, J., & Fernández, L. (2020). Spatial structure and abundance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in subtidal fishing grounds of the Galician coast (NW-Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 239, 106753.

Chiaramonte, M., Bonaventura, R., Costa, C., Zito, F., & Russo, R. (2021). [6]-Gingerol dose-dependent toxicity, its role against lipopolysaccharide insult in sea urchin (*Paracentrotus lividus* Lamarck), and antimicrobial activity. *Food bioscience*, 39, 100833.

Chiarello, M. (2017). *Biodiversité du microbiome cutané des organismes marins: variabilité, déterminants et importance dans l'écosystème* (Doctoral dissertation, Université Montpellier). 315p.

Chiarore, A., Musco, L., Bertocci, I., Gallo, A., Cannavacciuolo, A., Mutalipassi, M., ... & Munari, M. (2020). Sea urchin chronicles. The effect of oxygen super-saturation and marine polluted sediments from Bagnoli-Coroglio Bay on different life stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine environmental research*, 159, 104967.

Ciriminna, L., Rakaj, A., Grosso, L., Pensa, D., Fianchini, A., Mazzola, A., & Vizzini, S. (2024). Evaluation of sustainable feeds for “caviar” production in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture Reports*, 35, 102017.

Ciriminna, L., Signa, G., Vaccaro, A. M., Visconti, G., Mazzola, A., & Vizzini, S. (2021). Turning waste into gold: Sustainable feed made of discards from the food industries promotes gonad development and colouration in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture Reports*, 21, 100881.

Couvray, S. (2014). *Étude de la dynamique de populations d'oursins comestibles Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816) en zone pêchée et anthropisée.: Évaluation de l'efficacité et de l'impact d'opérations de lâchers de juvéniles pour le repeuplement* (Doctoral dissertation, Université de Toulon).

D

Danks, H. V., & Smith, A. B. (2017). Insect biodiversity in the Nearctic region. *Insect biodiversity: science and society*, 47-63.

de Albuquerque, F. P., de Oliveira, J. L., Moschini-Carlos, V., & Fraceto, L. F. (2020). An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. *Science of the total environment*, 700, 134868.

De La Uz, S., Carrasco, J. F., & Rodríguez, C. (2018). Temporal variability of spawning in the sea urchin *Paracentrotus lividus* from northern Spain. *Regional studies in marine science*, 23, 2-7.

Denis, F., Cattoir, V., Martin, C., Ploy, M.-C., & Poyart, C. (2016). *Bactériologie médicale: techniques usuelles*, 3rd Edition. France: Elsevier Masson. 600p.

Desriac, F., Jégou, C., Balnois, E., Brillet, B., Le Chevalier, P., & Fleury, Y. (2013). Antimicrobial peptides from marine proteobacteria. *Marine drugs*, 11(10), 3632-3660.

Dominique, G., Michel, N., Harry, S. & Laurence, Z. (2021). *Microbiote intestinal (flore intestinale) : Une piste sérieuse pour comprendre l'origine de nombreuses maladies*. Inserm.

Duchaud, S., Ternengo, S., Durieux, E. D., Bianchini, B., Garrido, M., Aiello, A., ... & Pasqualini, V. (2021). Influence of environmental patterns on gonadosomatic index and early life stages of *Paracentrotus lividus* in Corsica (Mediterranean Sea). *Regional Studies in Marine Science*, 42, 101645.

E

El Idrissi^a, O., Marengo, M., Aiello, A., Gobert, S., Pasqualini, V., & Ternengo, S. (2020). Seasonal change in trace element concentrations of *Paracentrotus lividus*: its use as a bioindicator. *Ecological Indicators*, 112, 106063.

El Idrissi^b, O., Gobert, S., Delmas, A., Demolliens, M., Aiello, A., Pasqualini, V., & Ternengo, S. (2022). Effects of trace elements contaminations on the larval development of *Paracentrotus lividus* using an innovative experimental approach. *Aquatic Toxicology*, 246, 106152.

Elkahoui, S., Djébali, N., Karkouch, I., Ibrahim, A. H., Kalai, L., Bachkouel, S., ... & Limam, F. (2014). Mass spectrometry identification of antifungal lipopeptides from *Bacillus* sp. BCLRB2 against *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied biochemistry and microbiology*, 50, 161-165.

Elmasry, E., Abdelrazek, F. A., & El-Sayed, A. F. M. (2023). Growth pattern and population status of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) on the Mediterranean coast of Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 49(3), 409-416.

Enomoto, M., Nakagawa, S., & Sawabe, T. (2012). Microbial communities associated with holothurians: presence of unique bacteria in the coelomic fluid. *Microbes and Environments*, 27(3), 300-305.

F

Faddetta, T., Ardizzone, F., Faillaci, F., Reina, C., Palazzotto, E., Strati, F., ... & Cavalieri, V. (2020). Composition and geographic variation of the bacterial microbiota associated with the coelomic fluid of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Scientific Reports*, 10(1), 21443.

Fehér, D., Barlow, R. S., Lorenzo, P. S., & Hemscheidt, T. K. (2008). A 2-substituted prodiginine, 2-(p-hydroxybenzyl) prodigiosin, from *Pseudoalteromonas rubra*. *Journal of Natural Products*, 71(11), 1970-1972.

Fernandez, C., & Boudouresque, C. F. (1997). Phenotypic plasticity of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) in a lagoonal environment. *Marine Ecology Progress Series*, 152, 145-154.

Fernandez, C., & Boudouresque, C. F. (2000). Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Marine Ecology Progress Series*, 204, 131-141.

Fernández-Boo, S., Pedrosa-Oliveira, M. H., Afonso, A., Arenas, F., Rocha, F., Valente, L. M. P., & Costas, B. (2018). Annual assessment of the sea urchin (*Paracentrotus*

lividus) humoral innate immune status: Tales from the north Portuguese coast. *Marine environmental research*, 141, 128-137.

Figueiredo, D. A. L., Branco, P. C., Dos Santos, D. A., Emerenciano, A. K., Iunes, R. S., Borges, J. C. S., & da Silva, J. R. M. C. (2016). Ocean acidification affects parameters of immune response and extracellular pH in tropical sea urchins *Lytechinus variegatus* and *Echinometra luccunter*. *Aquatic toxicology*, 180, 84-94.

Formery, L., Wakefield, A., Gesson, M., Toisoul, L., Lhomond, G., Gilletta, L., ... & Croce, J. C. (2022). Developmental atlas of the indirect-developing sea urchin *Paracentrotus lividus*: From fertilization to juvenile stages. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10, 966408.

Fouad, M., Benhra, A., Bouhallaoui, M., El Haimour, B., Bessi, H.(2021). Use of benthic population and embryo-larval development stages of the sea urchin *Paracentrotus lividus* for evaluating the ecological quality of the west Moroccan Mediterranean coast. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 25, 73-82.

G

Gambardella, C., Marcellini, F., Falugi, C., Varrella, S., & Corinaldesi, C. (2021). Early-stage anomalies in the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) as bioindicators of multiple stressors in the marine environment: Overview and future perspectives. *Environmental Pollution*, 287, 117608.

Gambardella, C., Miroglio, R., Trenti, F., Guella, G., Panevska, A., Sbrana, F., ... & Sepčić, K. (2023). Assessing the toxicity of aegerolysin-based bioinsecticidal complexes using the sea urchin *Paracentrotus lividus* as model organism. *Aquatic Toxicology*, 264, 106727.

García, E., Clemente, S., & Hernández, J. C. (2018). Effects of natural current pH variability on the sea urchin *Paracentrotus lividus* larvae development and settlement. *Marine environmental research*, 139, 11-18.

Grosjean, P. (2001). *Growth model of the reared sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck, 1816)* (Doctoral dissertation, Mons).272p.

Hakim, J. A., Koo, H., Dennis, L. N., Kumar, R., Ptacek, T., Morrow, C. D., ... & Watts, S. A. (2015). An abundance of Epsilonproteobacteria revealed in the gut microbiome of the laboratory cultured sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1047.

Hakim, J. A., Koo, H., Kumar, R., Lefkowitz, E. J., Morrow, C. D., Powell, M. L., ... & Bej, A. K. (2016). The gut microbiome of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, from its natural habitat demonstrates selective attributes of microbial taxa and predictive metabolic profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(9), fiw146.

Hakim, J. A., Schram, J. B., Galloway, A. W., Morrow, C. D., Crowley, M. R., Watts, S. A., & Bej, A. K. (2019). The purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* demonstrates a compartmentalization of gut bacterial microbiota, predictive functional attributes, and taxonomic co-occurrence. *Microorganisms*, 7(2), 35.

Hermas, J., Ouchene, H., Elouizgani, H., & Hafidi, N. (2018). L'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck. 1816) au niveau de la baie d'Agadir: Biotopes et Biométrie. *SMETox Journal*, 1(2), 100-107.

Hettiarachchi, S. A., Lee, S. J., Lee, Y., Kwon, Y. K., Zoysa, M. D., Moon, S., ... & Oh, C. (2017). A rapid and efficient screening method for antibacterial compound-producing bacteria. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1441-1448.

Hughes, T. P., Kerry, J. T., Álvarez-Noriega, M., Álvarez-Romero, J. G., Anderson, K. D., Baird, A. H., ... & Wilson, S. K. (2017). *Global warming and recurrent mass bleaching of corals. Nature*, 543(7645), 373-377.

Isidro, M. (2017). Oursin violet *Paracentrotus lividus*. SCRIBD. 3p.

Joint, I., Mühlhling, M., & Querellou, J. (2010). Culturing marine bacteria—an essential prerequisite for biodiscovery. *Microbial biotechnology*, 3(5), 564-575.

— K —

- Kalinovskaya, N. I., Ivanova, E. P., Alexeeva, Y. V., Gorshkova, N. M., Kuznetsova, T. A., Dmitrenok, A. S., & Nicolau, D. V. (2004).** Low-molecular-weight, biologically active compounds from marine *Pseudoalteromonas* species. *Current Microbiology*, 48, 441-446.
- Khaili, A., Touiss, I., El Azhari, H., El Maadoudi, M., Rharrass, A., Chairi, H., ... & Essalmani, H. (2024).** Bacteriological study of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) gonads associated with seawater physico-chemistry and environmental factors in the Mediterranean Sea of Morocco. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 50(1), 78-87.

— L —

- Lago, A., & Paredes, E. (2023).** Modulation of stress factors for cryopreservation of *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) larvae. *Cryobiology*, 110, 8-17.
- Lago, A., Basuyaux, Y., Leira, M., Costas, D., & Paredes, E. (2024).** Influence of physico-chemical parameters on the settlement of competent larvae of cultured sea urchin, *Paracentrotus lividus*. *Aquaculture*, 589, 740982.
- Laguerre, H. (2021).** *Microbiote des Echinodermes: spécificité et plasticité des microbiotes chez *Holothuria forskali* (Echinodermata, Holothuroidea)* (Doctoral dissertation, Brest).280p.
- Lamarck, C. (1816).** *Histoire naturelle des animaux sans vertèbres*. Tome III. PARIS, VERDIÈRE, LIBRAIRE, QUAI DES AUGUSTINS, N.° 27. 586p.
- Laport, M. S., Bauwens, M., Collard, M., & George, I. (2018).** Phylogeny and antagonistic activities of culturable bacteria associated with the gut microbiota of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Current microbiology*, 75, 359-367.
- Le Gall, P. (1987).** La pêche des oursins en Bretagne. In *Colloque international sur* (pp. 311-324).
- Le Gall, P., Bucaille, D., & Grassin, J. B. (2020).** Influence de la température sur la croissance de deux oursins comestibles, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus miliaris*. In *Echinoderm research* (pp. 183-188). CRC Press.

León-Palmero, E., Joglar, V., Álvarez, P. A., Martín-Platero, A., Llamas, I., & Reche, I. (2018). Diversity and antimicrobial potential in sea anemone and holothurian microbiomes. *PloS one*, *13*(5), e0196178.

Lourenço, S., Raposo, A., Cunha, B., Pinheiro, J., Santos, P. M., Gomes, A. S., ... & Pombo, A. (2022). Temporal changes in sex-specific color attributes and carotenoid concentration in the gonads (roe) of the purple sea urchin (*Paracentrotus lividus*) provided dry feeds supplemented with β -carotene. *Aquaculture*, *560*, 738608.

M

Machado, A. M., Fernández-Boo, S., Nande, M., Pinto, R., Costas, B., & Castro, L. F. C. (2022). The male and female gonad transcriptome of the edible sea urchin, *Paracentrotus lividus*: Identification of sex-related and lipid biosynthesis genes. *Aquaculture Reports*, *22*, 100936.

Marlétaz, F., Couloux, A., Poulain, J., Labadie, K., Da Silva, C., Mangenot, S., ... & Lepage, T. (2023). Analysis of the *P. lividus* sea urchin genome highlights contrasting trends of genomic and regulatory evolution in deuterostomes. *Cell Genomics*, *3*(4).

Meziti, A., Kormas, K. A., Pancucci-Papadopoulou, M. A., & Thessalou-Legaki, M. (2007). Bacterial phylotypes associated with the digestive tract of the sea urchin *Paracentrotus lividus* and the ascidian *Microcosmus* sp. *Russian Journal of Marine Biology*, *33*, 84-91.

Milito, A., Murano, C., Castellano, I., Romano, G., & Palumbo, A. (2020). Antioxidant and immune response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to different re-suspension patterns of highly polluted marine sediments. *Marine environmental research*, *160*, 104978.

N

Nakagawa, S., Saito, H., Tame, A., Hirai, M., Yamaguchi, H., Sunata, T., ... & Takaki, Y. (2017). Microbiota in the coelomic fluid of two common coastal starfish species and characterization of an abundant *Helicobacter*-related taxon. *Scientific Reports*, *7*(1), 8764.

- Nelson, L., Blair, B., Murdock, C., Meade, M., Watts, S., & Lawrence, A. L. (2010).** Molecular Analysis of gut microflora in captive-raised sea urchins (*Lytechinus variegatus*). *Journal of the World Aquaculture Society*, 41(5), 807-815.
- Nicolau, L., Vasconcelos, P., Machado, I., Pereira, F., Moura, P., Carvalho, A. N., & Gaspar, M. B. (2022).** Morphometric relationships, relative growth and roe yield of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) from the Portuguese coast. *Regional Studies in Marine Science*, 52, 102343.
- Nishanth Kumar, S., Dileep, C., Mohandas, C., Nambisan, B., & Ca, J. (2014).** Cyclo (d-Tyr-d-Phe): a new antibacterial, anticancer, and antioxidant cyclic dipeptide from *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Journal of peptide science*, 20(3), 173-185.
- Noyer, C., Petit De Voize, P., Jeglot, S. (2021).** in : *DORIS: Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816).
-
- P**
-
- Pagán-Jiménez, M., Ruiz-Calderón, J. F., Dominguez-Bello, M. G., & García-Arrarás, J. E. (2019).** Characterization of the intestinal microbiota of the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *PLoS One*, 14(1), e0208011.
- Paillard, C., Gueguen, Y., Wegner, K. M., Bass, D., Pallavicini, A., Vezzulli, L., & Arzul, I. (2022).** Recent advances in bivalve-microbiota interactions for disease prevention in aquaculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 225-232.
- Palladino, G., Rampelli, S., Scicchitano, D., Musella, M., Quero, G. M., Prada, F., ... & Biagi, E. (2021).** Impact of marine aquaculture on the microbiome associated with nearby holobionts: the case of *Patella caerulea* living in proximity of Sea Bream aquaculture cages. *Microorganisms*, 9(2), 455.
- Papa, R., Selan, L., Parrilli, E., Tilotta, M., Sannino, F., Feller, G., ... & Artini, M. (2015).** Anti-biofilm activities from marine cold adapted bacteria against *Staphylococci* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 164823.
- Park, J. Y., Jo, J. W., An, Y. J., Lee, J. J., & Kim, B. S. (2023).** Alterations in sea urchin (*Mesocentrotus nudus*) microbiota and their potential contributions to host according to barren severity. *npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 83.

Parra-Luna, M., Martín-Pozo, L., Hidalgo, F., & Zafra-Gómez, A. (2020). Common sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and sea cucumber of the genus *Holothuria* as bioindicators of pollution in the study of chemical contaminants in aquatic media. A revision. *Ecological Indicators*, *113*, 106185.

Pinsino, A., & Matranga, V. (2015). Sea urchin immune cells as sentinels of environmental stress. *Developmental & Comparative Immunology*, *49*(1), 198-205.

Pointurier, H. (2003). La gestion matières dans l'industrie laitière. Paris: Édition Tec & Doc.

Pointurier, H. 2003). *La gestion matières dans l'industrie laitière.* Éditions Tec & Doc.

Pozharitskaya, O. N., Shikov, A. N., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Makarenko, I. E., Faustova, N. M., ... & Makarov, V. G. (2015). Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. *Journal of functional foods*, *17*, 227-234.

Prescott, L., Harley, J., Klein, D., Bacq-Calberg, C., & Dusart, J. (2003). Microbiologie, 2ème édition française. Bruxelles, Belgique: Éditions De Boeck Université, 1137p.

Q

Quéro, J. C. (1984). *Les poissons de mer des pêches françaises.* J. Grancher.

Quetglas-Llabrés, M. M., Tejada, S., Capó, X., Langley, E., Sureda, A., & Box, A. (2020). Antioxidant response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* to pollution and the invasive algae *Lophocladia lallemandii*. *Chemosphere*, *261*, 127773.

R

Régis, M. B., Pérès, J. M., & Gras, G. (1985). Données préliminaires sur l'exploitation de la ressource: *Paracentrotus lividus* (Lmck) dans le Quartier Maritime de Marseille. *Vie marine (Six-Fours-les-Plages)*, *7*, 41-60.

Rocha, F., Rocha, A. C., Baião, L. F., Gadelha, J., Camacho, C., Carvalho, M. L., ... & Valente, L. M. (2019). Seasonal effect in nutritional quality and safety of the wild sea urchin *Paracentrotus lividus* harvested in the European Atlantic shores. *Food chemistry*, *282*, 84-94.

Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2018). The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, *6*, 1-14.

- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R., & Zilber-Rosenberg, I. (2007).** The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 355-362.
- Rouane-Hacene, M. O. (2013).** Biosurveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental algérien, par le suivi des indices biologiques, de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Cd) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. *Theses Doctorat en Biologie. Faculte des Sciences, Departament de Biologie. Universite D'Oran.*
- Roughgarden, J. (2018).** Holobiont evolution: mathematical model with vertical vs. horizontal microbiome transmission. *BioRxiv*, 465310.
- Ruocco, N., Costantini, S., Palumbo, F., & Costantini, M. (2017).** Marine sponges and bacteria as challenging sources of enzyme inhibitors for pharmacological applications. *Marine drugs*, 15(6), 173.
-
- S
- Sagar, S., Esau, L., Hikmawan, T., Antunes, A., Holtermann, K., Stingl, U., ... & Kaur, M. (2013).** Cytotoxic and apoptotic evaluations of marine bacteria isolated from brine-seawater interface of the Red Sea. *BMC complementary and Alternative medicine*, 13, 1-8.
- Santos, P. M., Albano, P., Raposo, A., Ferreira, S. M., Costa, J. L., & Pombo, A. (2020).** The effect of temperature on somatic and gonadal development of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 528, 735487.
- Santos, P. M., Silva, J. A., Costa, J. L., & Pombo, A. (2022).** Effect of salinity on somatic growth and gonadal enhancement of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Aquaculture*, 560, 738593.
- Schwob, G., Cabrol, L., Poulin, E., & Orlando, J. (2020).** Characterization of the gut microbiota of the Antarctic heart urchin (Spatangoida) *Abatus agassizii*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 514995.
- Sellem, F., & M'rabet, R. (2002).** Première signalisation de l'oursin irrégulier <*Echinocardium mediterraneum*>(Forbes, 1844) sur les côtes tunisiennes. *Bull. INSTM Salammbo*, 29(8). p. 125-127.

Shikov, A. N., Pozharitskaya, O. N., Krishtopina, A. S., & Makarov, V. G. (2018). Naphthoquinone pigments from sea urchins: Chemistry and pharmacology. *Phytochemistry reviews*, 17(3), 509-534.

Sugni, M., Barbaglio, A., Bonasoro, F., Gioria, M., Fasano, P., & Pasini, M. E. (2013). The role of models in science: a multicomprehensive experience with the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Procedia-Social and Behavioral Sciences*, 93, 1404-1408.

Sylvain, F. É., & Derome, N. (2017). Vertically and horizontally transmitted microbial symbionts shape the gut microbiota ontogenesis of a skin-mucus feeding discus fish progeny. *Scientific reports*, 7(1), 5263.

\mathcal{T}

Tacconi, S., Augello, S., Persano, F., Sbarigia, C., Carata, E., Leporatti, S., ... & Dini, L. (2022). Amino-functionalized mesoporous silica nanoparticles (NH₂-MSiNPs) impair the embryonic development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 95, 103956.

Theis, K. R., Dheilly, N. M., Klassen, J. L., Brucker, R. M., Baines, J. F., Bosch, T. C., ... & Bordenstein, S. R. (2016). Getting the hologenome concept right: an evolutionary framework for hosts and their microbiomes. *Msystems*, 1(2), e00028-16.

Thompson, J. R., Paganos, P., Benvenuto, G., Arnone, M. I., & Oliveri, P. (2021). Post-metamorphic skeletal growth in the sea urchin *Paracentrotus lividus* and implications for body plan evolution. *EvoDevo*, 12, 1-14.

Tortonese, E., & Vadon, C. (1987). Oursins et Holothuries. *Fiches FAO D'identification des Espèces Pour les Besoins de la Pêche—Mediterranee et Mer Noire*, 734-760.

Touati, A. (2023). Préparation et utilisation des milieux de culture en microbiologie : Guide pratique. SARAHMED Editions. 398p.

\mathcal{V}

Verlaque, M., & Nédelec, H. (1983). Biologie de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) sur substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France): alimentation des adultes Biology of *Paracentrotus lividus* (Lamarck) on rocky bottoms in Corsica (Mediterranean, France): Diet of adults. *Vie et Milieu/Life & Environment*, 33, 191-201.

Viel, T., Cocca, M., Esposito, R., Amato, A., Russo, T., Di Cosmo, A., ... & Costantini, M. (2024). Effect of biodegradable polymers upon grazing activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk) revealed by morphological, histological and molecular analyses. *Science of The Total Environment*, 929, 172586.

W

Wang, Y., Nakajima, A., Hosokawa, K., Soliev, A. B., Osaka, I., Arakawa, R., & Enomoto, K. (2012). Cytotoxic prodigiosin family pigments from *Pseudoalteromonas* sp. 1020R isolated from the Pacific coast of Japan. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 76(6), 1229-1232.

Wirtz, P., Debelius, H. (2003). Mediterranean And Atlantic Invertebrate Guide From Spain To Turkey, From Norway To Equator. ConchBooks, Hackenheim, Allemagne, 305p.

Y

Yokota, Y., Matranga, V., & Smolenicka, Z. (2002). The sea urchin from basic biology to aquaculture. Netherlands: Balkema; 231p.

Z

Zaneveld, J. R., Nemergut, D. R., & Knight, R. (2008). Are all horizontal gene transfers created equal? Prospects for mechanism-based studies of HGT patterns. *Microbiology*, 154(1), 1-15.

Références électroniques

- **Lien 01 :** <https://guidedesespeces.org/fr/oursins>.
- **Lien 02 :** <https://www.coordonnees-gps.fr/carte/pays/DZ>.
- **Lien 03 :** <https://fr.climate-data.org/afrique/algerie/bejaia/bejaia-3597/t/mars-3/>.
- **Lien 04 :** <https://maps.app.goo.gl/B5nPogUfETNKyPqb7>.
- **Lien 05 :** <https://maps.app.goo.gl/PkWPCk43vyw24Vo36>.
- **Lien 06 :** <https://microbiologie-clinique.com/Coloration-Gram.html>.

Annexes

Annexe I

Composition des milieux de culture utilisés (pour 1L d'eau distillée) (Joint *et al.*, 2010 ; Denis *et al.*, 2016 ; Touati, 2023).

Bouillon cœur-cervelle (BHIB)

▪ Coeur & cervelle, extraits sec de l'infusion	5,0 g/l
▪ Peptone de viande	12,0 g/l
▪ Glucose	2,0 g/l
▪ Chlorure de sodium	5,0 g/l
▪ Phosphate disodique	2,5 g/l
▪ pH 7,4±0.2 à 25°C	

Gélose PCA (Plate Count Agar)

▪ Agar	15,0 g/l
▪ Tryptone	5,0 g/l
▪ Extrait de levure	2,5 g/l
▪ Glucose	1,0 g/l
▪ pH 7,0±0.2 à 25°C	

Gélose nutritive

▪ Extrait de bœuf	1,5 g/l
▪ Extrait de levure	1,5 g/l
▪ Peptone	5,0 g/l
▪ Chlorure de sodium	5,0 g/l
▪ Agar	15,0 g/l
▪ pH 7,4±0.2 à 25°C	

Gélose Hektoen

▪ Lactose	12,0 g/l
▪ Peptone de viande	12,0 g/l
▪ Saccharose	12,0 g/l
▪ Sels biliaires	9,0 g/l
▪ Chlorure de sodium	5,0 g/l

▪ Thiosulfate de sodium	5,0 g/l
▪ Extrait de levure	3,0 g/l
▪ Salicine	2,0 g/l
▪ Citrate ammonium ferrique	1,5 g/l
▪ Fuschine acide	0,1 g/l
▪ Bleu de bromothymol	0,065 g/l
▪ Agar	15,0 g/l
▪ pH 7,6±0.2 à 25°C	

Gélose EMB (Eosine Bleu de Méthylène)

▪ Agar	13,5 g/l
▪ Tryptone	10,0 g/l
▪ Lactose	5,0 g/l
▪ Saccharose	5,0 g/l
▪ Phosphate dipotassique	2,0 g/l
▪ Eosine Y	0,4g/l
▪ Bleu de methylene	0,065 g/l
▪ pH 7,2±0.2 à 25°C	

Gélose Baird Parker

▪ Agar	17,0 g/l
▪ Glycine	12,0 g/l
▪ Pyruvate de sodium	10,0 g/l
▪ Tryptone	10,0 g/l
▪ Extrait de bœuf	5,0 g/l
▪ Chlorure de lithium	5,0 g/l
▪ Extrait de levure	1,0 g/l
▪ Emulsion de jaune d'œuf	50,0 g/l
▪ Solution de tellurite de potassium (1%)	10,0 g/l
▪ pH 7,0±0.2 à 25°C	

Gélose Mossel

▪ Tryptone	10,0 g/l
▪ Extrait de viande	1,0 g/l
▪ D-mannitol	10,0 g/l
▪ Chlorure de sodium	10,0 g/l
▪ Rouge de phenol	0.025 g/l
▪ Polymyxine B	1x10⁵ UI
▪ Emulsion de jaune d'oeuf sterile	100 ml
▪ Agar	13,5 g/l
▪ pH 7,2±0.2 à 25°C	

Gélose MRS (deMan, Rogosa, Sharpe)

▪ Protéose peptone	10,0 g/l
▪ Extrait de bœuf	10,0 g/l
▪ Extrait de levure	5,0 g/l
▪ Glucose	20,0 g/l
▪ Tween 80	1,0 g/l
▪ Citrate d'ammonium	2,0 g/l
▪ Acétate de sodium	5,0 g/l
▪ Sulfate de magnesium	0,1 g/l
▪ Sulfate de manganese	0,05 g/l
▪ Phosphate dipotassique	2,0 g/l
▪ Agar	12,0 g/l
▪ pH 6,5±0.2 à 25°C	

Gélose à l'eau de mer

▪ Eau de mer filtré	250 ml
▪ Agar	15,0 g/l
▪ pH 7.6±0.2 à 25°C	

Annexe II

Tableau: Résultats de dénombrement bactérien réalisé sur milieu PCA.

Échantillons de la Brise			Échantillons des Aiguades		
Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻³	Dilution	10 ⁻¹	10 ⁻³
Code			Code		
Tubes digestifs (TD)					
TD B1	37	00	TD AI 1	103	04
TD B2	12	04	TD AI 2	120	06
TD B3	07	00	TD AI 3	145	00
TD B4	16	00	TD AI 4	48	00
TD B5	08	01	TD AI 5	183	03
TD B6	IND	40	TD AI 6	86	00
Nombre total (UFC)	<u>80</u>	<u>45</u>	Nombre total (UFC)	<u>685</u>	<u>13</u>
Gonades (G)					
GB1	04	00	GAI 1	13	00
GB2	00	00	GAI 2	108	00
GB3	10	00	GAI 3	42	00
GB4	00	00	GAI 4	416	32
GB5	13	00	GAI 5	20	00
GB6	39	02	GAI 6	31	00
Nombre total (UFC)	<u>66</u>	<u>02</u>	Nombre total (UFC)	<u>630</u>	<u>32</u>

Annexe III

Tableau: Développement bactérien noté sur les différents milieux ensemencés.

Echantillon	Code	Baird Parker	Mossel	MRS	Hektoen	EMB	Eau de mer
Aiguades							
TDAI1	TDAI1 (1)	+		+		+	+
	TDAI1 (2)			+		+	
TDAI4	TDAI4 (1)	+		+	+	+	+
	TDAI4 (2)					+	+
TDAI6	TDAI6 (1)	+	+	+	+	+	
	TDAI6 (2)	+				+	
GAI 1	GAI 1 (1)	+	+	+	+	+	
	GAI 1 (2)					+	
GAI4	GAI4 (1)	+		+	+	+	
	GAI4 (2)	+				+	
GAI6	GAI6 (1)		+	+	+	+	
	GAI6 (2)					+	
	GAI6 (3)					+	
Brise de mer							
TDB1	TDB1 (1)	+	+	+	+	+	
	TDB1 (2)		+	+	+		
TDB4	TDB4 (1)	+	+	+	+	+	
	TDB4 (2)		+			+	
TDB6	TDB6 (1)	+	+	+		+	+
	TDB6 (2)		+	+		+	
	TDB6 (3)		+			+	
GB1	GB1(1)						
	GB1 (2)						
GB4	GB4 (1)	+	+		+	+	
	GB4 (2)						
GB6	GB6 (1)		+	+	+	+	
	GB6 (2)		+	+	+	+	
	GB6 (3)					+	
	GB6 (4)					+	
Pourcentage (%)		<u>13.75</u>	<u>16.25</u>	<u>17.5</u>	<u>13.75</u>	<u>30</u>	<u>8.75</u>

Annexe IV

Tableau: La macromorphologie des isolats obtenus sur les différents milieux de culture utilisés.

Code	Taille	Forme	Bords	Élévation	Halo	Centre	Couleur	Opacité	Consistance
BAIRD PARKER									
TDAI1	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
TDAI4	Punctiforme	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Brun/Noir	Opaque	Crémeuse brillante
TDAI6 (1)	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Opaque	Gris/brun	Grise/Brun	Opaque	Crémeuse brillante
TDAI6 (2)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
GAI1	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Clair	Noir	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
GAI4 (1)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
GAI4 (2)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Brun/Noir	Opaque	Crémeuse brillante
TDB1	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
TDB4	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
TDB6	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
GB4	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Noir	Opaque	Crémeuse brillante
MOSSEL									
TDAI6	Moyenne/Grande	Irrégulière	Ondulé	Convexe	Absence	Absence	Blanchâtre	Translucide	Crémeuse
GAI1	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Jaune	Absence	Jaune	Opaque	Crémeuse brillante
GAI6	Moyenne	Ronde	Irrégulier	Bossue	Clair	Blanc/Rose	Rose	Opaque	Crémeuse brillante
TDB1 (1)	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Bossue	Blanc	Beige/Crème	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
TDB1 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Translucide	Crémeuse brillante
TDB4 (1)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Élevée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Crémeuse brillante

TDB4 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Translucide	Crémeuse brillante
TDB6 (1)	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Bossue	Blanc	Beige/Crème	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
TDB6 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bossue	Opaque	Beige/Crème	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
TDB6 (3)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bossue	Opaque	Beige/Crème	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
GB4	Petite	Ronde	Régulier	Plane	Absence	Absence	Blanche/Rose	Translucide	Crémeuse
GB6 (1)	Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
GB6 (2)	Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Rose	Opaque	Muqueuse brillante
MRS									
TDAI1 (1)	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Crémeuse brillante
TDAI1 (2)	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Crème/Beige	Opaque	Crémeuse
TDAI4	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
TDAI6	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
GAI1	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
GAI4	Punctiforme	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
GAI6	Petite/Moyenne	Irrégulière	Irrégulier	Bossue	Opaque	Blanchâtre	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante
TDB1 (1)	Petite/Moyenne	Irrégulière	Ondulé	Plane	Opaque	Blanc/Sombre	Blanche/Crème	Translucide	Muqueuse
TDB1 (2)	Petite	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche	Opaque	Muqueuse brillante
TDB4	Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
TDB6 (1)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Crème/Beige	Opaque	Crémeuse
TDB6 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Blanche/Crème	Opaque	Muqueuse brillante

TDAI4(2)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante
TDAI6(1)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
TDAI6(2)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante
GAI1 (1)	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Plane	Absence	Sombre	Violet foncé	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
GAI1 (2)	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Plane	Absence	Sombre	Violet foncé	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
GAI4 (1)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante
GAI4 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
GAI6 (1)	Petite/Moyenne	Irrégulière	Irrégulier	Plane	Absence	Rose	Rose/Violet pale	Opaque	Muqueuse brillante
GAI6 (2)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante
GAI6 (3)	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Plane	Absence	Sombre	Violet foncé	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
TDB1	Moyenne/Grande	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante
TDB4 (1)	Petite	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Vert à Noir	Verte pale	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
TDB4 (2)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse brillante

TDB6 (1)	Grande	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Absence	Rose/Violet foncé	Opaque	Muqueuse brillante
TDB6 (2)	Petite	Irrégulière	Irrégulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Violet pale/Gris	Opaque	Crémeuse
TDB6 (3)	Petite/Grande	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Violet pale/Gris	Opaque	Crémeuse
GB4	Petite	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Rose	Opaque	Crémeuse brillante
GB6 (1)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Vert à Noir	Vert à Noir	Verte pale	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
GB6 (2)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Vert à Noir	Vert à Noir	Verte pale	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
GB6 (3)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Vert à Noir	Vert à Noir	Verte pale	Opaque	Crémeuse brillante avec reflet métallique
GB6 (4)	Petite/Moyenne	Ronde	Régulier	Convexe	Absence	Absence	Absence	Rose	Opaque	Muqueuse légèrement brillante
EAU DE MER										
TDAI1	Punctiforme	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Blanchâtre	Translucide	Crémeuse
TDAI4(1)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Blanchâtre	Translucide	Crémeuse
TDAI4(2)	Punctiforme	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Blanchâtre	Translucide	Crémeuse
TDB6	Punctiforme	Ronde	Régulier	Bombée	Absence	Absence	Absence	Blanchâtre	Translucide	Crémeuse

Annexe V

Tableau: Caractéristiques phénotypiques des bactéries isolées sur les différents milieux.

Code	Mobilité	Coloration de Gram					Catalase	Oxydase	Coagulase	Hémolyse
		Gram	Forme	Agencement						
				Isolé	Diplo	Amas				
Baird Parker										
TDAI1	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDAI4	-	+	Cocci	+	+	Tétrade	+	-	-	
TDAI6(1)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDAI6(2)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
GAI1	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	+	
GAI4 (1)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
GAI4 (2)	-	+	Cocci	+	+	Tétrade	+	-	-	
TDB1	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDB4	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDB6	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
GB4	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
Mossel										
TDAI6	+	+	Bacille	+	Chaine	+	+	-		γ
GAI1	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	+	
GAI6	+	+	Bacille	+	Chaine	+	+	+		β
TDB1 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
TDB1 (2)	+	+	Bacille	+	Chaine	+	+	-		α
TDB4 (1)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDB4 (2)	+	+	Bacille	+	Chaine	+	+	-		α
TDB6 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
TDB6 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
TDB6 (3)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
GB4	+	+	Bacille	+	Chaine	+	+	+		β
GB6 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α

GB6 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
MRS										
TDAI1(1)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDAI1(2)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDAI4	-	-	Bacille	+		+	+	-		α
TDAI6	-	-	Bacille	+		+	+	-		α
GAI1	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	+	
GAI4	-	+	Cocci	+	+	Tétrade	+	-	-	
GAI6	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
TDB1 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		α
TDB1 (2)	-	+	Cocci	+	+	Grappe	+	-	-	
TDB4	-	-	Bacille	+		+	+	-		α
TDB6 (1)	+	-	Coccobacille	+	+	+	+	-		γ
TDB6 (2)	-	-	Bacille	+		+	+	-		α
GB6 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		γ
GB6 (2)	+	-	Bacille	+	Chaîne	+	+	-		α
Hektoen										
TDAI4	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDAI6	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI1	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI4	+	-	Bacille	+	Chaîne	+	+	+		
GAI6	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDB1 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDB1 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDB4	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GB4	+	-	Bacille	+	Chaîne	+	+	+		
GB6 (1)	+	-	Bacille	+	Chaîne	+	+	+		
GB6 (2)	+	-	Bacille	+	Chaîne	+	+	-		
EMB										
TDAI1(1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDAI1(2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		

TDAI4(1)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDAI4(2)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDAI6(1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDAI6(2)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
GAI1 (1)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI1 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI4 (1)	-	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI4 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI6 (1)	+	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		
GAI6 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GAI6 (3)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDB1	+	-	Bacille	+		+	+	-		
TDB4 (1)	+	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		
TDB4 (2)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDB6 (1)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDB6 (2)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDB6 (3)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
GB4	+	-	Bacille	+	+	+	+	+		
GB6 (1)	+	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		
GB6 (2)	+	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		
GB6 (3)	+	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		
GB6 (4)	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
Eau de mer										
TDAI1	+	-	Bacille	+	+	+	+	-		
TDAI4(1)	+	-	Bacille	+		+	+	-		
TDAI4(2)	-	-	Bacille	+		+	+	-		
TDB6	-	-	Bacille	+	Chaine	+	+	-		

Annexe VI

Tableau: Les espèces bactériennes identifiées à l'aide des galeries biochimiques.

Site	Organe	Code	Galerie appliquée	Espèce identifiée
Baird Parker				
Aiguades	Tube digestif	TDAI1	API Staph	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI4	API Staph	<i>Micrococcus spp.</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6(1)	API Staph	<i>Staphylococcus lentus</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6(2)	API Staph	<i>Staphylococcus capitis</i>
Aiguades	Gonades	GAI1	API Staph	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aiguades	Gonades	GAI4 (1)	API Staph	<i>Staphylococcus xylosus</i>
Aiguades	Gonades	GAI4 (2)	API Staph	<i>Micrococcus spp.</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1	API Staph	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4	API Staph	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6	API Staph	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Brise de mer	Gonades	GB4	API Staph	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Mossel				
Aiguades	Tube digestif	TDAI6	API 50 CHB	<i>Bacillus lentus</i>
Aiguades	Gonades	GAI1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aiguades	Gonades	GAI6	-	<i>Bacillus cereus</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (1)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (2)	API 50 CHB	<i>Morganilla morganii spp morganii</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4 (1)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4 (2)	API 50 CHB	<i>Morganilla morganii spp morganii</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (1)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (2)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (3)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Gonades	GB4	-	<i>Bacillus cereus</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (1)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>

Brise de mer	Gonades	GB6 (2)	API 50 CHB	<i>Providencia rettgeri</i>
MRS				
Aiguades	Tube digestif	TDAI1(1)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI1(2)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI4	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6	API 50 CHB	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Gonades	GAI1	-	<i>Staphylococcus aureus</i>
Aiguades	Gonades	GAI4	-	<i>Micrococcus spp.</i>
Aiguades	Gonades	GAI6	API 50 CHB	<i>Enterobacter cloacae</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (1)	API 50 CHB	<i>Escherichia coli 1</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (2)	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4	API 50 CHB	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (1)	API 50 CHB	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (2)	API 50 CHB	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (1)	API 50 CHB	<i>Citrobacter youngae</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (2)	API 50 CHB	<i>Citrobacter freundii</i>
Hektoen				
Aiguades	Tube digestif	TDAI4	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6	API 20E	<i>Enterobacter cloacae</i>
Aiguades	Gonades	GAI1	API 20E	<i>Cronobacter spp.</i>
Aiguades	Gonades	GAI4	API 20NE	<i>Aeromonas hydrophila gr2</i>
Aiguades	Gonades	GAI6	API 20E	<i>Enterobacter cloacae</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (1)	API 20E	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1 (2)	API 20E	<i>Escherichia coli 1</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4	API 20E	<i>Enterobacter cloacae</i>
Brise de mer	Gonades	GB4	API 20NE	<i>Aeromonas hydrophila 1</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (1)	API 20NE	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (2)	API 20E	<i>Citrobacter freundii</i>

EMB				
Aiguades	Tube digestif	TDAI1(1)	API 20E	<i>Kluyvera spp.</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI1(2)	API 20E	<i>Kluyvera spp.</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI4(1)	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI4(2)	API 20E	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 2</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6(1)	API 20E	<i>Citrobacter youngae</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI6(2)	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Gonades	GAI1 (1)	API 20E	<i>Kluyvera spp.</i>
Aiguades	Gonades	GAI1 (2)	API 20E	<i>Kluyvera spp.</i>
Aiguades	Gonades	GAI4 (1)	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Aiguades	Gonades	GAI4 (2)	API 20E	<i>Citrobacter youngae</i>
Aiguades	Gonades	GAI6 (1)	API 20NE	<i>Pseudomonas luteola</i>
Aiguades	Gonades	GAI6 (2)	API 20E	<i>Enterobacter cloacae</i>
Aiguades	Gonades	GAI6 (3)	API 20E	<i>Kluyvera spp.</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB1	API 20E	<i>Pantoea spp4</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4 (1)	API 20E	<i>Citrobacter freundii</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB4 (2)	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (1)	API 20E	<i>Klebsiella oxytoca</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (2)	API 20E	<i>Providencia rettgeri</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6 (3)	API 20E	<i>Salmonella spp.</i>
Brise de mer	Gonades	GB4	API 20NE	<i>Aeromonas hydrophila 1</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (1)	API 20E	<i>Citrobacter freundii</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (2)	API 20E	<i>Citrobacter freundii</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (3)	API 20E	<i>Citrobacter freundii</i>
Brise de mer	Gonades	GB6 (4)	API 20E	<i>Citrobacter youngae</i>
Eau de mer				
Aiguades	Tube digestif	TDAI1	API 20E	<i>Serratia odorifera1</i>
Aiguades	Tube digestif	TDAI4(1)	API 20E	<i>Pantoea spp2</i>

Aiguades	Tube digestif	TDAI4(2)	API 20E	<i>Klebsiella pneumoniae spp pneumoniae 2</i>
Brise de mer	Tube digestif	TDB6	API 20E	<i>Raoultella ornithinolytica</i>

Résumé

Compte tenu du rôle important des oursins dans le fonctionnement des écosystèmes sublittoraux, l'étude du microbiome de *Paracentrotus lividus* a attiré l'attention des chercheurs du monde entier. Afin d'identifier la diversité intrigante des microbiotes de 12 oursins collectés sur deux sites géographiques distincts (les Aiguades et la Brise de mer), une approche culture-dépendante a été menée. Le dénombrement sur milieu PCA a révélé 1461UFC sur l'ensemble des échantillons récoltés, avec une répartition de 10% à la Brise de mer et 90% aux Aiguades. Parmi les 80 isolats bactériens obtenus, une grande diversité a été observée avec des variations dans leurs préférences de croissance en fonction des milieux de culture utilisés. Sur la base des caractéristiques morphologiques des isolats provenant du tube digestif et gonades, 77 souches sélectionnées ont été identifiées phénotypiquement et classées en 4 *phyla*. Le *phylum* dominant était les *Pseudomonadota* (72,7%) avec une forte abondance de souches appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (49,4%), et dans une moindre mesure, les *Firmicutes* (19,5%), les *Actinomycetota* (3,9%) et les *Bacillota* (3,9%). L'analyse de la biodiversité chez l'oursin répond à la question de la spécificité du microbiote à l'échelle inter- et intra-individuelle, mettant en avant l'influence de l'écosystème sur cette diversité. Ce constat a permis de révéler qu'un core microbiote formé de membres des *phyla* *Proteobacteria* et *Firmicutes* est établi dans tous les échantillons analysés, quel que soit l'organe ou le site d'échantillonnage, contrairement aux taxons minoritaires typiquement liés à l'emplacement géographique et/ou à l'espèce. Dans l'ensemble, ces résultats sont prometteurs et fournissent des informations précieuses sur la diversité du microbiote chez l'oursin *Paracentrotus lividus*, ouvrant la voie à de nombreuses recherches futures dans ce domaine.

Mots clés : *Paracentrotus lividus*, microbiote, biodiversité, oursins, écosystème

Abstract

Given the important role of sea urchins in the functioning of sub-coastal ecosystems, the study of the microbiome of *Paracentrotus lividus* has attracted the attention of researchers worldwide. In order to identify the intriguing microbiota diversity of 12 sea urchins collected at two distinct geographical sites (Aiguades and Brise de mer), a culture-dependent approach was conducted. The count on PCA medium revealed 1461UFC on all samples collected, with a distribution of 10% in the Sea Breeze and 90% in the Aiguades. Among the 80 bacterial isolates obtained, a great diversity was observed with variations in their growth preferences according to the culture media used. Based on the morphological characteristics of isolates from the digestive tract and gonads, 77 selected strains were identified phenotypically and classified into 4 *phyla*. The dominant phylum was *Pseudomonadota* (72.7%) with a high abundance of strains belonging to the family *Enterobacteriaceae* (49.4%), and to a lesser extent, *Firmicutes* (19.5%), *Actinomycetota* (3.9%) and *Bacillota* (3.9%). The analysis of biodiversity in sea urchins answers the question of the specificity of the microbiota at the inter- and intra-individual scale, highlighting the influence of the ecosystem on this diversity. This finding revealed that a core microbiota formed by members of the *phyla* *Proteobacteria* and *Firmicutes* is established in all the samples analyzed, regardless of the organ or the sampling site, unlike minority taxa typically related to geographic location and/or species. Overall, these results are promising and provide valuable information on the microbiota diversity in the sea urchin *Paracentrotus lividus*, paving the way for much future research in this area.

Keywords : *Paracentrotus lividus*, microbiota, biodiversity, sea urchins, ecosystem

ملخص

نظرًا لأهمية الدور الذي تلعبه قنفاذ البحر في عمل النظم الإيكولوجية شبه الساحلية، جذبت دراسة ميكروبيوم *Paracentrotus lividus* انتباه الباحثين في مختلف أنحاء العالم. بغية تحديد التنوع البكتيري المثير للاهتمام لـ 12 قنفاذ بحري تم جمعهم من موقعين جغرافيين مختلفين (Aiguades و Brise de mer)، تم اتباع نهج يعتمد على الزراعة البكتيرية. كشف التعداد البكتيري على وسط PCA عن 1461UFC في جميع العينات التي تم جمعها، بتوزيع 10% في نسيم البحر و 90% في Aiguades. من بين 80 عزلة بكتيرية تم الحصول عليها، لوحظ تنوع كبير مع اختلافات في تفضيلات النمو وفقًا للوسط الزراعي المستخدم. بناءً على الخصائص المورفولوجية لعزلات الجهاز الهضمي والغدد التناسلية، تم تحديد 77 سلالة مختارة بشكل ظاهري وتصنيفها إلى أربعة شعب. كانت الشعبة السائدة هي *Pseudomonadota* (72.7%) مع وفرة عالية من السلالات التي تنتمي إلى عائلة (*Enterobacteriaceae* 49.4%)، ودرجة أقل، *Firmicutes* (19.5%)، *Actinomycetota* (3.9%) و *Bacillota* (3.9%). يجيب تحليل التنوع البيولوجي في قنفاذ البحر على سؤال خصوصية الميكروبيوتا على المستوى الفردي والداخلي، مما يسلط الضوء على تأثير النظام البيئي على هذا التنوع. كشفت هذه النتيجة أن ميكروبيوتا أساسية مكونة من أعضاء شعبة *Proteobacteria* و *Firmicutes* تم إدراجها في جميع العينات التي تم تحليلها، بغض النظر عن العضو أو موقع أخذ العينات، على عكس أصناف الأقليات المرتبطة عادةً بالموقع الجغرافي و/أو الأنواع. بشكل عام، هذه النتائج واعدة وتوفر معلومات قيمة عن تنوع الميكروبيوتا في قنفاذ البحر *Paracentrotus lividus* ممهدة الطريق لكثير من الأبحاث المستقبلية في هذا المجال.

الكلمات المفتاحية: *Paracentrotus lividus*، الميكروبيوتا، قنفاذ البحر، النظم الإيكولوجية