

UNIVERSITÉ DE LILLE – SCIENCES ET TECHNOLOGIES
École Doctorale Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée par
Mahammed ZIDOUR

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

Décryptage du microbiote et des risques chimiques et microbiologiques associés à la chaîne alimentaire des larves de la daurade royale *Sparus aurata*

Préparée au laboratoire :

Institut Charles Viollette – ICV – EA 7394

Equipe QSA : Qualité et Sécurité des Aliments

Soutenance publique le 14 septembre 2018, devant le jury composé de :

Mr Christophe FLAHAUT	Maître de conférences HDR (Université d'Artois)	Directeur de thèse
Mr Sami SOUISSI	Professeur (Université de Lille)	Co-directeur
Mr Benoit CUDENNEC	Maître de Conférences (Université de Lille)	Co-encadrant
Mme Isabella BUTTINO	Dr. Chercheure (ISPRA, Italie)	Rapporteuse
Mme Joëlle FORGET-LERAY	Professeure (Université de Normandie)	Rapporteuse
Mr Djamel DRIDER	Professeur (Université de Lille)	Examineur
Mme Françoise DENIS	Maître de conférences (Université Le Mans)	Examinatrice
Mme Chantal COMPERE	Dr. Chercheure (Ifremer)	Examinatrice
Mr Thierry GRARD	Professeur (Université Littoral Côte d'Opale)	Invité

Dédicace

A Ma chère femme zakia

À mes trésors : Malack, Ahmed et Mariam

Et à mes chers parents

Remerciements

Soyons reconnaissants aux
personnes qui nous donnent du
bonheur ; elles sont les charmants
jardiniers par qui nos âmes sont
fleuries. *Marcel Proust.*

Cette thèse est le fruit de quatre ans de recherches effectuées au sein de l'équipe Qualité et Sécurité des Aliments de l'Institut de recherche en agro-alimentaire et biotechnologie Charles Viollette équipe sécurité alimentaire de l'université de Lille 1. Ce travail s'est réalisé en collaboration avec le Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences- UMR 8187 LOG et le Laboratoire de spectrochimie Infrarouge et Raman- UMR 8516.

Je tiens à remercier le gouvernement Algérien et en particulier ma tutelle qui m'a octroyée cette bourse. Ma gratitude et mes remerciements les plus profonds sont adressés à Monsieur Hadji ZARHOUNI, Directeur Central de l'Intendance. Je remercie en lui l'attention et la confiance dont il a fait preuve à mon égard en me soutenant et en m'encourageant pour bien mener cette thèse. Je vous remercie encore pour vos conseils et vos remarques constructives et j'espère que ma thèse sera à la hauteur de vos attentes.

Je tiens à remercier Pascal DHULSTER, directeur de l'Institut de recherche en agro-alimentaire et biotechnologie, Charles Viollette de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je sais gré au Professeur Djamel DRIDER de l'université de Lille 1, pour l'honneur qu'il me fait en prenant la charge de présider mon jury. Je lui suis reconnaissant de m'avoir inscrit à l'université de Lille, je le remercie pour les nombreux encouragements et le soutien qu'il m'a prodigués, et je tiens à lui assurer ma profonde reconnaissance pour l'intérêt qu'il porte à ce travail.

J'adresse tous mes remerciements à Madame Isabelle BUTTINO, Docteur Chercheure à l'Institut de la Protection de l'Environnement et de la Recherche (ISPRA) en Italie, ainsi qu'à Madame Joëlle FORGET- LERAY, Professeure à l'Université de la Normandie, de l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être reportrices de cette thèse.

Je suis très honorée que Madame Françoise DENNIS, Maitre de conférences à l'Université Le MANS ainsi qu'à madame Chantal CAMPERE de l'Unité de Recherche et de Développement technologiques Ifremer, aient accepté de donner de leur temps pour examiner ce travail.

Par le présent, j'adresse tous mes remerciements à mon directeur de thèse, Monsieur Christophe FLAHAUT, Maitre de conférences HDR à l'université d'Artois. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son travail efficace, ses corrections pertinentes, et ses brillantes intuitions ; il a su être disponible, a toujours été à l'écoute et m'a encouragé dans les moments les plus durs. Il m'a aussi transmis son sens de la rigueur intellectuelle et du dynamisme, sans oublier son importante dimension humaine.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur Benoit CUDENNEC, Maitre de Conférences à l'Université de Lille et Monsieur Thierry GRARD, Maitre de Conférences HDR à l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO), d'avoir participé à l'encadrement de cette thèse et de m'avoir soutenu moralement.

Il m'est impossible d'oublier Monsieur Sami SOUISSI pour son aide précieuse et son appui constant, sans lui cette thèse n'aurait pas pu être mise sur pied. C'est pour cela que je tiens à lui exprimer ma gratitude pour les conseils et la coopération qu'il m'a assurés.

Que Monsieur Baghdad OUDDANE, Professeur à l'Université de Lille, Laboratoire LASIR UMR CNRS 8516, trouve ici le témoignage de ma reconnaissance pour sa disponibilité et pour le climat favorable dans lequel il m'a permis de réaliser toute la partie chimique de ce travail.

Mes remerciements sont aussi adressés à Madame Aurélie TASIEMSKI et Madame Christel NEUT d'avoir participé au comité scientifique de thèse. Je vous remercie Madame NEUT pour votre accueil au laboratoire de bactériologie de la faculté de Pharmacie à Lille.

J'exprime ma gratitude à Madame Valérie LECLERE Professeure à l'Université de Lille et Matthieu DUBAN, Ph. D, Ingénieur de recherche à l'université de Lille pour leur précieuse collaboration dans la réalisation de la partie bioinformatique de cette thèse.

Mes remerciements sont adressés également à Monsieur Bernard TAMINIAU, Ph. D, au Département des sciences des Denrées alimentaires à l'Université de Liège pour son aide à réaliser l'analyse métagénomique ainsi que ses interprétations pertinentes.

Je voudrai de bon cœur remercier Monsieur Yanath BELGUESMIA, post-doc et Mickaël CHEVALIER doctorant à l'Institut Charles viollette. Ces deux personnes m'ont fait partager leur amitié et maîtrise des techniques et m'ont énormément aidé aussi bien sur le plan scientifique qu'amicale.

Mes remerciements vont aussi à mes collègues et amis, Messieurs Mohamed DAOUDI, Brahim HAMITI, Rochdi BENOUDJIT, qui m'ont soutenu et qui ont tout fait pour m'aider.

Je tiens aussi à remercier tous les ingénieurs, les techniciens de laboratoire et tous mes amis ; Farouk NAEMAN, Toufik SAFER, Nouredine MENANI, Nuria VIECO, Yazen MOHALEB, Kudireti ABDRASSOUL, Celine, Ahmed, Alaa, Ludivine, Corine, Katy, Marjorie, Chakib, Delfine, Cécile et Frédéric.

Un grand merci à mes parents, qui ont toujours été à mes côtés et qui ont cru en moi. Merci à tous les membres de la famille plus particulièrement mes frères ; Ahmed, Fayçal (Med) et Brahim, mes sœurs ; Zohra, Aicha, Kheira et Nacéra, mes beaux-frères, mes belles-sœurs, mes neveux et mes nièces.

Mes sincères remerciements sont adressés également à tous les membres de ma deuxième famille qui n'a pas cessée de me soutenir et de m'encourager afin de réaliser cette thèse. Merci à ma belle-mère, Muma, Rachida, Hebala, Drifa, Fateh, Yazid, Madjid et Ziroud. Merci à Amar TAOUTAOU et Mme Gamra DOUMANDJI.

Je ne pourrai mettre terme sans remercier ma très chère femme Zakia. Depuis que je t'ai connu, tu ne m'as jamais déçu et tu as toujours été à mes côtés dans les merveilleux moments comme dans les moments les plus rudes. Merci de m'avoir aidé, épaulé, soutenu et encouragé à réaliser cette thèse. Quoique je puisse dire, les mots ne seront jamais assez forts pour égaliser la profonde reconnaissance et le grand respect que je te dois. Que Dieu te préserve, t'accorde santé et bonheur.

Bien entendu, cette liste n'est pas exhaustive, je voudrai donc remercier toutes les personnes qui ont contribuées de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Au cours de ce travail, d'évaluation des risques chimiques et microbiologiques de la chaîne alimentaire des larves de daurade royale en milieu aquacole, nous avons déterminé les concentrations létales (LC₅₀) du Cadmium (Cd), du Cuivre (Cu) et du Nickel (Ni) chez les copépodes calanoïdes *Eurytemora affinis*. Nous avons ensuite quantifié, par voie d'entrée dissoute de ces métaux seuls et en mélange, la bioaccumulation dans ces organismes. Le copépode calanoïde *E. affinis* accumulent le Cd, le Cu et le Ni et par conséquent pourraient être utilisé comme indicateur biologique dans des études de biosurveillance pour l'évaluation des risques environnementaux. L'étude de la diversité microbienne de la chaîne trophique (l'eau de mer, les micro-algues et les copépodes) des larves de daurade a conduit à l'isolement de 434 isolats bactériens dont 246 ont été positivement identifiés par MALDI-TOF-MS. Parmi les espèces identifiées, *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. putida*, *Staphylococcus epidermidis* et *S. hominis* sont des pathogènes des poissons. Cependant, cinq souches non pathogènes de *B. pumilus* (nommées 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS) montrent une activité antagoniste contre certaines souches pathogènes précédemment citées. La souche *B. pumilus* 35R COPS produit deux classes de composés antimicrobiens de type peptides non-ribosomiaux : des surfactines mais aussi les amicoumacines A et B et les phosphoamicoumacines A et B identifiées et caractérisées par le couplage des techniques MALDI-TOF-MS et HPLC-MS/MS. La souche *B. pumilus* 38 COPS, quant-à-elle, produit également des membres de la famille des surfactines mais surtout une bactériocine appartenant à la famille de la circularine A/uberolysine. L'analyse, par des outils bio-informatiques *in silico*, des génomes de ces souches révèle la présence de clusters de gènes codant pour les surfactines et les amicoumacines et un gène ribosomique codant une bactériocine appartenant à la famille de la circularine A/uberolysine.

Mots clés : Amicoumacine, Circularine, Bioaccumulation, Cadmium, Cuivre, Nickel, Copépode, *Eurytemora affinis*, *Acartia tonsa*, Daurade royale, MALDI-TOF-MS, *Bacillus*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Vibrio anguillarum*.

This work aims at evaluating the chemical and microbiological risks associated with the larval food chain from seabream. Therefore, we have determined the lethal concentrations (LC₅₀) of Cadmium (Cd), Copper (Cu) and Nickel (Ni) in *Eurytemora affinis* calanoid copepods. Then, we quantified, through the dissolved entry way of these metals either alone or in combination. The *E. affinis* copepods appeared to accumulate Cd, Cu and Ni and therefore could be used in the bio-monitoring studies for assessing the environmental risks. The microbial diversity study undertaken on the trophic chain (seawater, microalgae and copepods) of seabream larvae permitted isolation of 434 bacterial isolates and 246 isolates were positively identified by MALDI-TOF-MS technology. The bacterial species identified included notably, *Vibrio anguillarum*, *V. alginolyticus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *P. putida*, *Staphylococcus epidermidis* and *S. hominis*, which are considered as fish pathogens. On the other hand, five non-pathogenic strains included *B. pumilus* as strains 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS and 40A COPS which displayed antagonistic activities, against towards some pathogenic species. To be noted that antagonistic strain *B. pumilus* strain 35R COPS is able to produce two non-ribosomal antimicrobial peptides (NRPS), which are surfactins and amicoumacins A and B as phosphoamicoumacins A and B based on MALDI-TOF-MS and HPLC-MS/MS data. Moreover, *B. pumilus* 38 COPS was characterized as antagonistic strain producing nevertheless, a surfacine (NRPS family) and concomitantly a bacteriocin belonging to the circularin A/uberolysin family. The *in silico* analyses of their genome revealed the presence of gene clusters coding for the surfactin- and amicoumacin-families and a ribosomal gene encoding a bacteriocin belonging to the circularin A/uberolysin bacteriocin family.

Key words: Amicoumacin, Circularine, Bioaccumulation, Cadmium, Copper, Nickel, Copépode, *Eurytemora affinis*, *Acartia tonsa*, Daurade royale, MALDI-TOF-MS, *Bacillus*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus*, *Vibrio*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*.

Publications dans revues internationales à comité de lecture

- **M. Zidour**, M. Chevalier, Y. Belguesmia, B. Cudennec, T. Grard, D. Drider, S. Souissi and C. Flahaut. Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and other pathogenic strains. *Frontiers in microbiology*, 2017, vol. 8, p. 1919.
- **M. Zidour**, Y. Belguesmia, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, C. Flahaut and D. Drider. Genome analysis and antagonism features of *Bacillus pumilus* ICVB403 isolated from *Acartia tonsa* copepod eggs. (soumis)
- **M. Zidour**, Z. Boubechiche, C. Balais, P.yen-ju, B. Cudennec, T. Grard, D. Drider, B. Ouddane, C. Flahaut and S. Souissi. Population response of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* to bioaccumulation of trace metals. (en soumission)

Communications orales

- **M. Zidour**, M. Chevalier, M. Duban, Y. Belguesmia, Z. Boubechiche, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, V. Le Clère, D. Drider and C. Flahaut. Isolation and Characterization of Amicoumacins Produced by *Bacillus pumilus* 35R COPS Isolated from *Acartia tonsa* Copepod Antagonistic Agents Against Pathogenic Strains. (**Prochainement**, 47ème Congrès Mondial de Microbiologie à Londres) 10-11/09/2018).
- **M. Zidour**, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, C. Flahaut and D. DRIDER : microbiote des poissons ; Impact de l'alimentaire sur le microbiote des larves de daurade royale. Les microbiotes et la santé humaine, animale et environnement : prévention et traitement du futur. Biocitech Romainville-Grand Paris. 19 & 20 juin 2018.
- **M. Zidour**, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, D. Drider, and C. Flahaut. Assessment of the biological and chemical risks to the larval stage of sea bream "*Sparus aurata*" and probiotic research for aquaculture. Journées des doctorants de l'institute Charles viollettes ICV. 30 et 31 /05/2018. Polythèque Lille.
- **M. Zidour**, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, D. Drider, and C. FLAHAUT Assessment of the biological and chemical risks to the larval stage of sea bream "*Sparus aurata*" and

probiotic research for aquaculture. Journées des doctorants de l'institute Charles Viollette ICV. 07 /04/2018. Polythèque Lille.

- H. Ait Seddik, F. Bendali. **M. Zidour**. Y. Belguesmia. B. Cudennec. D. Drider. Propriétés antiadhésives et anti-invasive des lactobacilles isolés de selles humaines. 21^{ème} Club des bactéries lactiques. Lille 14-15 Juin 2017.
- C. Flahaut, M. Chevalier, **M. Zidour**, F. Coucheney, D. Drider. Spectrométrie de masse et biodiversité. 20^{ème} Club des bactéries lactiques. Lille 17-19 Juin 2015.

Communications affichées dans colloques nationaux et internationaux

- **M. Zidour**, M. Chevalier, Y. Belguesmia, Z. Boubechiche, B. Cudennec, T. Grard, S. Souissi, D. Drider and C. Flahaut. MALDI-TOF-mass spectrometry (MS) for the identification of mesophilic flora of the trophic chain of sea bream *Sparus aurata* larvae. 17^{ème} symposium international de la société internationale de d'écologie microbienne (ISME17) à Leipzig / Allemagne, 12-17/08/2018.
- **M. Zidour**, Z. Boubechiche, M. Chevalier, Y. Belguesmia, B. Cudennec, T. Grard1, D. Drider, S. Souissi, C. Flahaut. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from *Acartia tonsa* copepod eggs that inhibits marine pathogens. International French-Taiwanese Workshop; Challenges in aquatic ecosystems: Multidisciplinary approaches. Keelung, Taiwan 24-25 Octobre 2017.
- **M. Zidour**, M. Chevalier, Y. Belguesmia, B. Cudennec, T. Grard, D. Drider, S. Souissi, C. Flahaut. Rapid Identification of *Vibrio* Species Isolated from *Acartia tonsa* Copepod Eggs Using MALDI-TOF- Mass Spectrometry. FEMS 2017. 7th congress of European microbiologists. Valence, Espagne. 9-13 juillet 2017.
- **M. Zidour**, Z. Boubechiche, M. Chevalier, Y. Belguesmia, B. Cudennec, T. Grard, D. Drider, S. Souissi, C. Flahaut. ANTIMIC 2017 ; Symposium Franco-Canadien sur les antimicrobiens naturels, applications alimentaire, médicales et vétérinaires. Québec, Canada 21-23 juin 2017.
- H. Ait Seddik, F. Bendali. **M. Zidour**. Y. Belguesmia. B. Cudennec. D. Drider. Propriétés antiadhésives et anti-invasive des lactobacilles isolés de selles humaines. 21^{ème} Club des bactéries lactiques. Lille 14-15 Juin 2017.

- M. Chevalier, **M. Zidour**, D. Caly, P. Dhulster, D. Drider, C Flahaut. Impact de la production de métabolites secondaires sur l'identification par profilage MALDI-MS des micro-organismes. SMAP_ Ajax 2015.

Abréviations générales

A: adénylation

ACN: acétonitrile

ACP: protéine porteuse d'acyle

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADNr: ADN ribosomal

AMP: Antimicrobial Peptide (Peptide Anti-Microbien)

ARN: acide ribonucléique

AT: acyltransférase;

BPI: base peak intensity *chromatogram*

BTS: Bacterial test standard

C: module de condensation;

CCK: reactif Cholécystokinine

Cd: cadmium

CL50: concentration létale 50

CMI: concentration minimale inhibitrice

COPS: copépodes

Cu : cuivre

Da : Dalton

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's medium*

E: épimérase;

EDTA : Éthylène Diamine Tétra-Acétique

EMB : Eau de mer brut

EMNAC : eau de mer de cuve

EMNA : eau de mer nausica

EMFB : eau de mer filtrée biologiquement

EMTR : eau de mer du tanc de reserve

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

HCCA : Acide a-cyano-4-hydroxycinnamique

HPLC : high pressure liquid chromatography

ICP-AES : spectrométrie d'émission atomique à plasma couplé par induction

Ind ml⁻¹: Individu par millilitre:

KR : cétoréductase

KS : cétoynthase

LASIR : Laboratoire de spectrométrie Infrarouge et Raman

LC50 : Concentrations létales

LOG : Laboratoire d'Océanologie et de Géoscience,

lx. : Lux (unité de mesure de l'éclairement lumineux).

m/z: masse/ charge

MALDI-TOF-MS: Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight- Mass spectrometry

Min : minute

µl: micro litre

mL : millilitre

Mt : Millions de tonnes

MT: métallothionéines

NaCl: Chlorure de sodium

Ni: Nickel

NRP: Non Ribosomal Peptide (Peptide non ribosomique)

NRPS: non rebosomal peptide synthase

OMS/WHO: Organisation Mondiale de la Santé / Worldwide Health Organization

ORF: *open reading frame*

OTU: Operational Taxonomic Unit (Unité Taxonomique Opérationnelle)

Pb : plomb

PBS : Tampon phosphate salin

PCP : protéine porteuse de peptidyl.

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel Hydrogène

PKS: poly ketide synthase

PSU : Unité de salinité pratique, de l'anglais *practical salinity unite*

QPS : Qualified Presumed Safe (Qualifié Présumé Sûr)

REP : Repetitive Element Palindromic (Élément palindromique répété)

rpm: rotations per minute

TFA: tri fluoro acid

TIC: total ion chromatogram

UFC: Unité Formant Colonie

UV : ultra Visible

Abréviations taxonomiques

A. tonsa: *Acartia tonsa*

E. affinis: *Eurytemora affinis*

B : *Brachionus*

B: *Bacillus*

E: *Escherichia*

S: *Staphylococcus*

V: *Vibrio*

P: *Pseudomonas*

SARM: *Staphylococcus aureus* Résistant au Methicillin

sp.: one specie of the genus

Tableau 1. Production et utilisation de la pêche et l'aquaculture dans le monde (FAO, 2018).....	12
Tableau 2. Principales bactéries causant des maladies chez la daurade royale <i>Sparus aurata</i> et les mesure de contrôle (FAO,2005- 2018).....	28
Tableau 4. Les probiotiques utilisés en aquaculture et l'effet sur leurs hôtes (Pérez-Sánchez et <i>al.</i> , 2014)	44
Tableau 5. Études concernant l'impact du Cd, du Ni et du Cu chez les organismes aquatiques. Liste non-exhaustive (Urien., 2015).....	60
Tableau 6. Origine, codification et lieu de prélèvement des eaux de mer	63
Tableau 7. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer utilisée pour les cultures des copépodes d' <i>E. affinis</i>	66
Tableau 8 . Liste des bactéries pathogènes utilisées dans cette étude comme espèces cibles pour les tests d'activité antimicrobienne	74
Tableau 9. Concentrations létales aiguës (CL50 en µg.L-1) du cadmium, du cuivre et du nickel chez le copépode adulte <i>E.affinis</i> après 48 h, 72 h et 96 h d'exposition.	89
Tableau 10. Valeurs de toxicité aigüe des métaux traces 96h-CL50(µg.L-1) pour l'espèce tempérée <i>E. affinis</i> relevées dans la littérature	90
Tableau 11. Indices d'accumulation de Cu, du Ni et du Cd dans <i>E. affinis</i>	91
Tableau 12. Caractérisation morphologique et biochimique des isolats des trois matrices ; eau de mer, micro-algues et les œufs de copépodes <i>Acartia tonsa</i>	107
Tableau 13 .Vingt-deux genres identifiés de 248 isolats de la chaine trophique de <i>Sparus aurata</i> identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF	108
Tableau 14 . Bilan d'identification ou de non identification des isolats d'eaux de mer des différents points de prélèvements.	113
Tableau 15. Scores d'identification moléculaire des séquences du gène l'ADNr 16S des souches de <i>Staphylococcus</i> isolées de l'eau de mer.	122
Tableau 16 . Identification de 248 isolats de la chaine trophique de <i>Saprus aurata</i> par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	124
Tableau 17. Sensibilité des souches de <i>vibrio</i> et de <i>Staphylococcus</i> isolées de la chaine trophique de la daurade contre différents antibiotiques.....	132
Tableau 18. Activités antibactériennes, établies par contact cellulaire, des souches de <i>Bacilles</i> cultivées en bouillon nutritif.....	135
Tableau 19. Activités antibactériennes, établies selon la méthode de diffusion, des SURNAGEANT DE CULTUREs des souches de <i>Bacilles</i> cultivées en bouillon nutritif.....	136
Tableau 20 molécules retenues sur colonne de C18 Core-shell est réalisée selon un gradient linéaire d'ACN d'environ 1,3% / min (25-95% ACN en 55 min) du surnageant de culture de la souche <i>B. pumilus</i> 35R COPS et <i>B. subtilis</i> 23 COPS. L'élution est réalisé de manière croissante des molécules les plus hydrophiles vers les plus hydrophobes.	142

Tableau 21. Liste des amicoumacines caractérisées par spectroscopie UV et spectrométrie de masse de la région 11-20 min du chromatogramme du surnageant de culture de la souche <i>B. pumilus</i> 35R COPS.	142
Tableau 22. Zones d'inhibition (en mm) des activités antibactériennes des fractions collectées, vis-à-vis de certains pathogènes de <i>Staphylococcus</i> et <i>Vibrio</i> ,.....	148
Tableau 23 . Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des fractions F1 et F2 contre certains pathogènes de <i>Staphylococcus</i> et <i>Vibrio</i>	149
Tableau 24. Concentrations minimales de l'érythromycine et les combinaisons d'érythromycine avec le surnageant de culture sans cellule de <i>B. pumilus</i> 38COPS (milieu de Landy).	157
Tableau 25. Antagonisme du surnageant de culture de culture cellulaire de <i>B. pumilus</i> 38 COPS contre des souches de Staphylocoques.	158

Liste des Figures

Figure 1 . Productions halieutique et aquacole mondiales (FAO, 2018)	11
Figure 2. Production mondiale de la daurade royale <i>Sparus aurata</i> en tonnes (FAO FishStat)	15
Figure 3. Photographie de la daurade royale <i>Sparus aurata</i>	15
Figure 4. Représentation schématique d'un cycle de production représentatif de la daurade royale dans les systèmes extensifs (FAO, 2005-2018)	17
Figure 5. Représentation schématique d'un cycle de production représentatif de la daurade royale dans les systèmes intensifs (FAO, 2005-2018)	19
Figure 6. Photographie de <i>Brachionus plicatilis</i> (Wikipédia)	21
Figure 7. Photographie du crustacé branchiopode <i>Artemia salina</i> L (Wikipédia)	21
Figure 8. Photographie du copépode <i>Acartia tonsa</i> (A : mâle, B : femelle).	23
Figure 9. Photographie du Copépode <i>Eurytemora affinis</i> (A : mâle, B : femelle).	23
Figure 10 . Cycle de développement du copépode calanoïde <i>Eurytemora affinis</i> ; Stades larvaires de N1 à N6, les stades juvéniles de C1à C5 et les stades adultes C6 (Dessins compilés d'après Katona, 1971et modifié par Sami Souissi).	24
Figure 11. Photographie d'une nécrose congestive au flanc par atteint de <i>Vibrio alginolyticus</i>	29
Figure 12. Photographie d'une daurade atteinte par <i>Vibrio alginolyticus</i>	30
Figure 13. Photographie d'un poisson atteint de lymphocytose	36
Figure 14 . Modèle conceptuel de l'interaction Métal-Organisme (Modifié d'après Campbell, 1995).	57
Figure 15. Courbes de régression binomiale « concentration-mortalité » durant 96h d'exposition des copépodes mâles et femelles d' <i>Eurytemora affinis</i> exposés aux Cd (a), Cu (b) et Ni (c).....	88
Figure 16. Accumulation (A) au niveau du copépodes <i>E. affinis</i> exposés et concentration résiduelle (B) du cadmium testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. Les symboles bleus représentent le niveau de bioaccumulation chez les copépodes témoins.	92
Figure 17 . Accumulation (A) au niveau du copépode <i>E. affinis</i> exposés et concentration résiduelle (B) du nickel testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. (Matière sèche; ms). Les symboles bleus représentent le niveau de bioaccumulation chez les copépodes témoins	93
Figure 18. Accumulation (A) au niveau du copépode <i>E. affinis</i> exposés et concentration résiduelle (B) du cuivre testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. (Matière sèche; ms). Les symboles bleus représentent le niveau bioaccumulation chez es copépodes témoins.	94
Figure 19 .Effet des métaux traces sur les stades de développement d' <i>E. affinis</i> après 72h d'exposition (50% du temps total d'exposition). A : nombre d'individus par litre, B : pourcentage de diminution du nombre d'individus. Par l'analyse anova recomender, Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type (n = 3), Les barres d'histogramme annotées avec des lettres différentes différent de façon significative (p <0,05).	97

Figure 20 . Effet des métaux traces sur la viabilité de mâles et femelles d' <i>E. affinis</i> après 72h d'exposition (50% du temps total d'exposition). A: nombre d'individus, B: pourcentage de diminution du nombre individus. Les valeurs sont présentées en tant que moyennes $\pm$ SD (n = 3) Les barres d'histogramme annotées avec des lettres différentes diffèrent de façon significative (p <0,05) test anova.....	99
Figure 21 . Évolution de la flore aérobie totale chez les copépodes <i>E. affinis</i> exposés à 1/3 de CL ₅₀ de Ni, Cu, Cd seul et en mélange.....	102
Figure 22. Densités moyennes de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) des trois matrices ; eau de mer, micro-algues et les œufs du copépode <i>Acartia tonsa</i> . EMB : eau de mer brute, EMNA : eau de mer Nausicaa, EMNAC : eau de mer Nausicaa cuve, EMTR : eau de mer cuve de réserve, EMFB : eau de mer filtre biologique.	106
Figure 23. Profils MALDI-TOF-MS bruts panneau gauche (A, B, C, D, I, J, K et L) et les identifications correspondantes de bactéries obtenues à partir de trois colonies distinctes pour chaque souche panneau droit (E, F, G, H, M, N, O et P). Le log (scores) d'identification est de 2,19 (E : <i>Pseudomonas stutzeri</i>), de 2,20 (F : <i>B. subtilis</i>), de 2,12 (G : <i>V. anguillarum</i>), de 2,07 (H : <i>V. alginolyticus</i>), de 2,51 (<i>Proteus vulgaris</i>), de 2,24 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>), de 2,31 (<i>Staphylococcus hominis</i>) et de 2,18 (<i>Micrococcus luteus</i>).....	112
Figure 24 . Distribution par genre et espèce des espèces bactériennes isolées de l'eau de mer de tous les points de prélèvement confondus et identifiées par profilage	114
Figure 25 . Distribution des espèces bactériennes isolées des micro-algues des deux espèces (<i>Pavlova sp</i> et <i>Rodomonas sp</i>) confondues et identifiées par profilage MALDI-TOF-MS.....	115
Figure 26 . Distribution des espèces bactériennes identifiées par profilage MALDI-TOF-MS, isolées à partir des œufs de copépode <i>A. tonsa</i>	116
Figure 27. Dendrogramme des profils de spectres de masse MALDI-TOF-MS des souches <i>Vibrio</i> isolées à partir d'œufs de copépodes d' <i>Acartia tonsa</i> (COPS) et l'eau de mer (EMB). Créés par la méthode standard de création de dendrogramme MSP de BioTyper, version 1.4 avec les paramètres par défaut suivants : mesure de la distance : corrélation ; lien : -300, apparenté-0. Le regroupement a été effectué avec les souches de références de la base de données Bruker.	118
Figure 28. Dendrogramme des profils de spectres de masse MALDI-TOF-MS des souches de <i>B. pumilus</i> isolées à partir des œufs d' <i>A. Tonsa</i> , créé par la méthode standard de création de dendrogramme MSP de Biotyper, version 1.4 avec les paramètres par défaut suivant: mesure de la distance: corrélation; lien: -300, apparenté-0.	119
Figure 29 . Arbre phylogénique et tableau des scores d'alignement des séquences du gène ADNr 16S de souches de <i>Vibrio</i> isolées à partir des œufs d' <i>A. tonsa</i> et l'eau de mer en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel MEGA 7.	120
Figure 30 . Arbre phylogénique et tableau des scores d'alignement des séquences du gène ADNr 16S de souches de <i>Bacillus pumilus</i> isolées à partir des œufs d' <i>A. tonsa</i> en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel MEGA7.	121

Figure 31. Photographie des activités antibactériennes (A) des cultures évaluées par contact cellulaire et (B) des surnageants (cell free supernatants, CFSs) évalués par diffusion sur gélose, des souches de <i>Bacillus pumilus</i> (18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS) et <i>Bacillus subtilis</i> (23 COPS, 24 COPS, 30 COPS, 35B COPS, 58 COPS) contre certaines souches pathogènes (<i>Koccuria</i> CIP 53.4, <i>V. anguillarum</i> , <i>V. alginolyticus</i> , <i>L. inocua</i> ATCC et <i>S. aureus</i> ATCC33862.	133
Figure 32. Photographie témoignant de l'absence d'activité hémolytique des souches de <i>B. pumilus</i> (1 à 5)	137
Figure 33. Spectre de masse MALDI TOF obtenu dans la gamme de masse 1000-1130 m/z, des surnageants de culture issus de cultures bactériennes de <i>Bacillus pumilus</i> sur milieu Landy.	139
Figure 34. Chromatogramme de type base peak intensity (BPI) des surnageants de Culture des souches de <i>B. subtilis</i> 23 COPS (A) et <i>B. pumilus</i> 35R (B). Les chromatogrammes BPI sont normalisés à 5x 10 ⁶ ions pour une comparaison plus aisée des profils chromatographiques. L'élution des molécules retenues sur colonne de C18 Core-shell est réalisée selon un gradient linéaire d'ACN d'environ 1,3% / min (25-95% ACN en 55 min). L'élution est réalisé de manière croissante des molécules les plus hydrophiles vers les plus hydrophobes.	141
Figure 35. Modèles de fragmentation de masse obtenus par CID des principales formes abondantes d'amicoumacines: (A) amicoumacine A, (B) amicoumacine B, (C) phosphoamicoumacine A et (D) phosphoamicoumacine B de <i>B. pumilus</i> 35R COPS CSF. Les spectres ont été produits en utilisant un spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si (Waters) fonctionnant en mode dépendant des données.	144
Figure 36. Modèles de fragmentation de masse obtenus par CID des principales formes abondantes d'amicoumacines: (E) triphosphoamicoumacine A et (F) triphosphoamicoumacine B de <i>B. pumilus</i> 35R COPS CSF. Les spectres ont été produits en utilisant un spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si (Waters) fonctionnant en mode dépendant des données.	145
Figure 37. Purification et collecte des fractions par HPLC des métabolites secondaires produites par <i>B. pumilus</i> 35R COPS. A : chromatogramme de séparation du SURNAGEANT DE CULTURE, B : Extraction UV des pics de chaque fraction d'amicoumacine (spectre UV spécifique à l'amicoumacine).	146
Figure 38. Spectre de masse MALDI-TOF-MS des cinq fractions collectées par HPLC semi-préparative.	147
Figure 39 .Photographie témoignant des activités antibactériennes des cinq fractions collectées seules et en mélange (F1, F2, F3, F4, F5, en mélange M) contre (A) <i>V. alginolyticus</i> 17EMB, (B) <i>S. aureus</i> 2592, (C) <i>S. aureus</i> MRSA 43300 ATCC et(D) <i>S. aureus</i> SA1.	149
Figure 40. Photographie présentant les zones d'inhibition associées aux CMI (µg.mL ⁻¹) des fractions F1 et F2 contre (A) <i>V. alginolyticus</i> 17EMB, (B) <i>S. aureus</i> 2592, (C) <i>S. aureus</i> MRSA 43300 ATCC et(D) <i>S. aureus</i> SA1.	150
Figure 41. A) Organisation du cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacine chez <i>B. subtilis</i> 1779; (B) la voie de biosynthèse proposée des amicoumacins chez <i>B. subtilis</i> 1779; (C) Étapes biosynthétiques proposées conduisant à l'hydroxymalonyl-ACP, qui est une unité d'extension PKS	

proposée du module 3 (Li et al., 2015). Abréviations de domaine : A, adénylation; ACP, protéine porteuse d'acyle (de l'anglais acyl-carrier protein); AT, acyltransférase; C, module de condensation; E, épimérase; KR, la cétoréductase; KS, cétyosynthase; PCP, protéine porteuse de peptidyl.....	152
Figure 42. Cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacine (ou des molécules apparentées) chez <i>Bacillus subtilis inaquosporum</i> KCTC13429.....	154
Figure 43. Cluster de gènes codant la synthétase d'amicoumacine (ou molécules apparentées) chez <i>B. pumilus</i> 35R COPS.....	154
Figure 44. Cluster de gènes codant une synthétase hybride NRPS-PKS chez <i>B. pumilus</i> 35R.	155
Figure 45. Organisation du cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacin chez la <i>B. pumilus</i> 35R COPS et des gènes environnants	156
Figure 46. Alignement des séquences de la protéine putative (selon l'analyse du génome entier AntiSMASH ICVB403 (Query)) avec le gène enregistré dans la base de données NCBI GenBank (Sbjct) d'une bactériocine circulaire provenant de l'isolat de <i>B. pumilus</i> 51_5il (ID de séquence : WP_099726571.1).....	159
Figure 47 . Viabilité des cellules HT-29-MTX après 4h de contact avec le surnageant de culture exempt de cellules dans du milieu Landy dilué à quatre et huit fois dans du DMEM et du milieu DMEM témoin contenant 1/4 de milieu Landy non fermenté. L'analyse ANOVA à une voie a montré qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les groupes ($p = 0,463$).	160

SOMMAIRE

<i>Dédicace</i>	I
<i>Remerciements</i>	III
<i>Résumé</i>	VII
<i>Abstract</i>	VIII
<i>Valorisation scientifique</i>	IX
<i>Liste des Abréviations</i>	XIII
<i>Liste des tableaux</i>	XVII
<i>Liste des Figures</i>	XIX
INTRODUCTION	1
Contexte de la thèse	3
Objectifs de la thèse	5
Organisation de la thèse	5
ÉTAT DE L'ART	7
Chapitre I. Caractéristiques Principales de la Daurade Royale <i>Sparus aurata</i>	9
1. Production aquacole mondiale	11
2. La pisciculture	13
3. La daurade royale <i>Sparus aurata</i>	14
3.1. La daurade royale en quelques chiffres	14
3.2. Description	15
3.3. Habitat et biologie	16
3.4. Cycle de production	16
3.5. Élevage larvaire de la daurade royale	19
3.5.1. Rotifères	20
3.5.2. Artemias	21
3.5.3. Copépodes	22
Chapitre II. Les Principaux Contaminants Biologiques Causant des Problèmes dans l'Élevage de la Daurade et les Mesures de Surveillance	25
1 Les contaminants biologiques	27
1.1 Les bactéries pathogènes	27
1.1.1. Les Vibrionacées	27
1.1.2. Les Pseudomonas	32
1.1.3. Autres espèces bactériennes	34
1.2 Les espèces virales	35

1.3 Les espèces parasitaires	36
2 Mesures de surveillance	37
2.1. Sélection des sites	38
2.2. Traitement de l'eau	39
2.3. Aquaculture	39
2.4. Vaccination	40
2.5. Traitements médicamenteux	40
2.6. Probiotiques comme stratégies alternatives aux antibiotiques	41
Chapitre III. Métaux Traces Dans Les Organismes Aquatiques	49
1. Éléments Traces Métalliques (ETMs)	51
1.1. Cuivre	51
1.1.1. Sources naturelles et propriétés	51
1.1.2. Sources anthropiques et niveau de contamination	52
1.2. Nickel	53
1.2.1. Sources naturelles et propriétés	53
1.2.2. Sources anthropiques et niveau de contamination	53
1.3. Le cadmium	54
1.3.1. Sources naturelles et propriétés	54
1.3.2. Sources anthropiques et niveau de cadmium	54
2. Bioaccumulation des métaux	54
2.1. Définitions	55
2.2. Voie dissoute et le modèle de l'ion libre	56
3. Effet des Métaux traces sur les organismes aquatiques	57
3.1. Effet du cuivre	57
3.2. Effet du nickel	58
3.3. Effet du cadmium	58
MATERIEL & METHODES	61
1. Description des matrices étudiées	63
1.1. Eau de mer	63
1.2. Microalgue	63
1.3. Copépodes	63
1.3.1. <i>Eurytemora affinis</i>	64
1.3.2. <i>Acartia tonsa</i>	64
1.4. Œufs d' <i>Acartia tonsa</i>	64
2. Bioaccumulation des métaux traces chez les copépodes	65
2.1. Préparation des solutions métalliques	65
2.2. Détermination des concentrations létales du Cd, Ni et Cu	65
2.3. Accumulation des métaux traces dans les copépodes <i>E. affinis</i>	65

2.3.1. Exposition d' <i>E. affinis</i> aux métaux	65
2.3.2. Cinétique d'accumulation	66
2.3.3. Indices d'accumulation	67
2.4. Effet des métaux traces sur la population d' <i>E. affinis</i>	67
2.5. Effet des métaux traces sur la flore aérobie totale	67
2.6. Dosage des métaux traces	68
2.7. Analyses statistiques	68
3. Étude de la diversité microbienne	69
3.1. Dénombrement de la flore cultivable aérobie totale	69
3.2. Isolement et identification phénotypique des souches	69
3.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS	70
3.3.1. Préparation de la cible	70
3.3.2. Acquisition des profils de spectrométrie de masse	70
3.3.3. Identification des bactéries à l'aide de Biotyper	70
3.4. Identification des souches par biologie moléculaire	71
3.4.1. Extraction d'ADN génomique	71
3.4.2. Électrophorèse en gel agarose	71
3.4.3. Rep-PCR	72
3.4.4. Amplification de l'ADNr 16S par réaction en chaîne à la polymérase (PCR, de l'anglais <i>polymerase chain reaction</i>)	72
3.4.5. Purification, séquençage et analyse phylogénétique des produits de PCR	73
4. Criblage et caractérisation des souches antagonistes	73
4.1. Sensibilité des souches cibles aux antibiotiques	73
4.2. Activité antibactérienne des souches de <i>Bacillus pumilus</i> et <i>Bacillus subtilis</i>	74
4.2.1. La méthode par contact cellulaire	74
4.2.2. La méthode de diffusion en gélose	75
4.3. Détermination de l'activité hémolytique	75
5. Purification et caractérisation des métabolites secondaires	76
5.1. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche <i>B.pumilus</i> 35R COPS	76
5.1.1. Préparation du surnageant	76
5.1.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC, de l'anglais <i>high performance liquid chromatography</i>)	76
5.1.3. Détection de la production de lipopeptides par spectrométrie de masse par MALDI-TOF-MS	77
5.1.4. Caractérisation des molécules par HPLC-MS	77
5.1.5. Activité antibactérienne des fractions collectées du fractionnement HPLC séparatif	78
5.1.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des fractions collectées du fractionnement HPLC séparatif.	78
5.1.7. Test de cytotoxicité du surnageant de culture actif et des fractions d'amicoumacine	79

5.1.8. Séquençage du génome de <i>B. pumilus</i> 35R COPS et analyse in silico	79
5.2. Caractérisation des métabolites secondaires produits par <i>B. pumilus</i> 38 COPS	80
5.2.1. Conditions de culture de <i>B. pumilus</i> 38 COPS	80
5.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne	80
5.2.3. Test de damier	80
5.2.4. Cytotoxicité de surnageant de culture actifs de <i>Bacillus pumilus</i> 38 COPS	81
5.2.5. Séquençage du génome de <i>Bacillus pumilus</i> 38 COPS et analyse in silico	81
RESULTATS & DISCUSSION	83
Chapitre I. Bioaccumulation des Métaux Traces chez le Copépode	85
<i>E. affinis</i>	85
1. Les concentrations létales (CL ₅₀)	87
2. La cinétique de la bioaccumulation du Cd, du Cu et du Ni	91
2.1. Bioaccumulation du Cd et concentration résiduelle dans le milieu	91
2.2. Bioaccumulation du Ni et concentration résiduelle dans le milieu	92
2.3. Bioaccumulation du Cu et concentration résiduelle dans le milieu	94
3. Réponses aux métaux traces	96
3.1. Réponses des individus des stades de développement aux métaux traces	96
3.2. Réponses sexe-spécifiques aux métaux traces	98
3.3. Réponses de la flore totale aux métaux traces	101
Chapitre II. Etude de la diversité microbienne de la chaîne trophique des larves de la daurade	103
<i>Sparus aurata</i>	103
1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)	105
2. Caractérisation phénotypique des isolats	107
3. Identification bactérienne par profilage MALDI-TOF-MS	107
3.1. Microflore de l'eau de mer	113
3.2. Microflore des micro-algues	114
3.3. Microflore des œufs d' <i>Acartia tonsa</i>	115
4. Identification par séquençage de l'ADNr 16S	119
4.1. Identification moléculaire de souches de <i>vibrio</i>	120
4.2. Identification moléculaire de souches de <i>Bacillus pumilus</i>	120
4.3. Identification moléculaire des <i>Staphylococcus</i>	121
Chapitre III. Criblage et Caractérisation de Souches Productrices de Molécules Antagonistes	129
1. Sensibilité des souches cibles aux antibiotiques	131
2. Activité antibactérienne des souches de <i>Bacillus</i>	133
3. Détermination de l'activité hémolytique	137
4. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche <i>B. pumilus</i> 35R COPS	138
4.1. Détection de la production de lipopeptides et des molécules actives par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS	138

4.2. Caractérisation des métabolites secondaires par HPLC-MS/MS	140
4.3. Purification et collecte des fractions d'intérêt par HPLC séparatif	145
4.4. Activité antibactérienne et CMI des fractions collectées d'amicoumacines	148
4.5. Identification <i>in-silico</i> des clusters de gènes codant pour les membres de la famille de l'amicoumacine	150
4.5.1. Description de l'analyse bio-informatique du génome entier de <i>B. pumilus</i> 35 R COPS.	150
4.5.2. Identification et caractérisation du cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacine.	151
5. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche <i>B. pumilus</i> 38 COPS	157
5.3. Identification <i>in-silico</i> du cluster putatif de gènes codant pour un ou plusieurs composés inhibiteurs	158
5.4. La fraction active de <i>B. pumilus</i> 38 COPS	159
Conclusion Générale & Perspectives	160
Références bibliographiques	160
Annexes	

clx

INTRODUCTION

Contexte de la thèse

A l'heure actuelle, le poisson constitue une source alimentaire importante pour ses qualités nutritionnelles précieuses. Selon les recommandations de l'American Heart Association (www.heart.org), il est nécessaire de consommer du poisson au moins deux fois par semaine pour satisfaire l'apport quotidien en acides gras à longues chaînes de type oméga-3 qui contribuent à la prévention des maladies cardiovasculaires (Kris-Etherton et al., 2002 ; Håstein et al., 2006). Le poisson est une source riche en **i**) acides gras insaturés, **ii**) protéines de grande qualité contenant tous les acides aminés indispensables, **iii**) minéraux essentiels notamment le calcium, l'iode, le fer et le sélénium et **iv**) en vitamines (D, A et B).

Ces dernières décennies, la consommation mondiale de poisson a progressé partout dans le monde, aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Selon les estimations de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO), celle-ci a franchi la barre des 20 kg par habitant. Cependant, cette forte progression n'aurait pas eu lieu sans l'augmentation de la production aquacole avec un tonnage record de 80,0 millions de tonnes pour l'année 2016 (FAO, 2018).

Ainsi, près de 598 espèces sont élevées en milieu aquatique contrôlé, pour assurer la sécurité alimentaire et la qualité nutritionnelle de ces dernières. Les espèces élevées sont principalement des mollusques (conchyliculture), des crustacés (dont la crevetticulture), des végétaux aquatiques (dont l'algoculture) et des poissons (pisciculture) (FAO, 2018). Parmi les espèces cultivées dans le monde entier, la daurade royale *Sparus aurata* est l'espèce favorite de l'aquaculture méditerranéenne en raison de sa chair savoureuse (Basurco et al., 2011).

Bien que l'élevage aquacole ait connu des progrès en termes de maîtrise des techniques d'élevage, des mortalités parfois massives sont toujours très fortement présentes. Ces dernières sont dues à de nombreux contaminants rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines (Schwarzenbach et al., 2006). Ces contaminants, d'origine chimique ou biologique, ont des effets néfastes non seulement sur les espèces aquatiques, et même sur le consommateur, avec à l'évidence un marketing et publicité en défaveur des entreprises aquacoles et de pays producteurs.

Toutefois les contaminants chimiques, et plus particulièrement les éléments de métaux traces (EMTs) sont responsables en partie de plusieurs problèmes écotoxicologiques (Brignon et al., 2005). Les EMTs sont particulièrement préoccupants car ce sont des éléments non biodégradables qui se concentrent dans les milieux aquatiques et qui peuvent engendrer des effets toxiques même à de faibles concentrations comme dans le cas des éléments non essentiels tel le Cadmium (Wang et Rainbow, 2007). De la même manière, les éléments traces métalliques dits essentiels, important dans les processus biologiques, tel le Cuivre, peuvent également conduire à des effets toxiques comme ceux dits non essentiels lorsque leur concentration dépasse un certain seuil d'acceptabilité (Miquel, 2001 ; Turkmen et al., 2005 ; Lafabrie, 2007). Ainsi, les EMTs diffusent dans les milieux aquatiques et peuvent conduire à des modifications de la biodiversité des espèces par la disparition de certaines d'entre-elles et, ainsi, entraîner de graves conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes (Cain et al., 2004 ; Roussel et al., 2008).

Les contaminants microbiologiques d'origine bactérienne tels *Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* spp *damsela*., *Photobacterium damsela* spp *piscicida*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Tenacibaculum maritimum*, *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp sont responsables de maladies telles la vibriose, la furunculose, la pasteurellose et la streptococcie et constituent un second obstacle majeur au développement de l'aquaculture en général et de l'élevage de la daurade royale en particulier (Pavlidis et Mylonas, 2011). Ces maladies constituent d'ailleurs l'une des principales causes des pertes économiques (Carbone et Faggio, 2016).

Afin de lutter contre ces maladies, il est parfois nécessaire de recourir à des traitements médicamenteux pour lesquels il n'existe pas encore de vaccins (Austin, 1988; Håstein, 1995). Parmi ces médicaments, les antibiotiques ont été régulièrement administrés mais leur utilisation a des effets négatifs sur l'environnement, la santé humaine et la santé animale d'où la conception d'une gestion globalisée (One health). Cela inclut l'émergence de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques, l'accumulation de résidus dans les tissus comestibles et la dépression des systèmes immunitaires. Pour ces raisons, l'utilisation d'antibiotiques est récemment soumise dans l'Union européenne, aux États-Unis et dans d'autres pays à des réglementations strictes (Carbone et Faggio, 2016).

Du fait de cette résistance bactérienne et aussi de la réglementation en question, des projets et initiatives visant le développement de stratégies alternatives pour le contrôle de ces infections ont été mis au point. Ces stratégies incluent l'utilisation des bactéries probiotiques comme moyen de lutte contre ces infections par traitements protecteur et/ou curatif. Les probiotiques utilisés en aquaculture appartiennent à des espèces bactériennes appartenant essentiellement aux classes des protéobactéries (en particulier les gammaprotéobactéries) et des Firmicutes, parmi lesquels figurent les bactéries du genre *Bacillus* (Hong *et al.*, 2005), à l'instar de *Bacillus subtilis* (Moriarty, 1998 ; Balcázar et Rojas-Luna, 2007 ; Aly *et al.*, 2008) et *B. pumilus* (Duc *et al.*, 2004).

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse se décline en deux axes majeurs. Le premier axe vise à évaluer l'impact de l'accumulation de certains métaux traces tel que le cadmium, le cuivre et le nickel sur le copépode calanoïde *E. affinis* (Poppe 1880) et la sensibilité de ses différents stades de développement ainsi qu'en fonction du sexe au cours d'une exposition de six jours à ces métaux traces. Le deuxième axe porte sur la description de la diversité microbienne de la chaîne trophique des stades larvaires de la daurade *Sparus aurata* associée à une recherche de souches productrices de molécules antagonistes pouvant être utilisées comme potentiellement probiotiques en aquaculture.

Organisation de la thèse

La thèse s'articule en plusieurs chapitres divisés en trois parties.

La première partie porte sur l'état de l'art des connaissances actuelles. En effet, cette partie est structurée en trois chapitres :

Le chapitre 1, qui est intitulé « Caractéristiques principales de la daurade royale *Sparus aurata* » présente un aperçu sur la production aquacole mondiale et l'élevage de la daurade royale *Sparus aurata*, poisson méditerranéen par excellence. En effet, nous décrivons son habitat, son cycle de production, et plus précisément le stade larvaire et la chaîne trophique.

Le chapitre 2 traite des principaux contaminants biologiques d'origines bactériennes, virales et parasitaires responsables de problèmes majeurs dans l'élevage de la daurade royale ainsi que les mesures prises pour leur surveillance.

Le chapitre 3 décrit les métaux traces dans les organismes aquatiques ainsi que leur impact sur les organismes aquatiques.

Ensuite, la **partie matériels et méthodes**, décrit les démarches expérimentales mises en œuvre. Dans cette partie nous décrivons d'une façon détaillée les différentes matrices de la chaîne trophique des larves de la daurade *Sparus aurata*, suivie d'une présentation de l'exposition pendant six jours d'une population de copépodes *E. affinis* aux métaux traces (Cd, Cu et Ni). Cette partie est complétée par un suivi d'impact sur la structure de la population exposée. Dans la partie « matériels et méthodes » un protocole d'étude de la diversité microbienne de la chaîne trophique de la daurade royale est également détaillé ainsi que toutes les techniques analytiques et moléculaires associées. Nous présentons aussi les protocoles de détection et de purification des molécules responsables de l'activité antagoniste de quelques souches prometteuses dans l'aquaculture en qualité de probiotiques.

La 3^{ème} **partie**, est structurée en trois chapitres qui présentent chacun les résultats obtenus et leurs interprétations en tenant compte des données de la littérature.

Une **conclusion générale** et les perspectives relatives aux principaux résultats obtenus durant la réalisation de cette thèse clôtureront le manuscrit.

ÉTAT DE L'ART

Chapitre I. Caractéristiques
Principales de la Daurade Royale
Sparus aurata

1. Production aquacole mondiale

L'aquaculture ; terme en usage au début du XX^e siècle, qualifie la culture des organismes aquatiques comme les plantes aquatiques, les poissons, les crustacés et les mollusques en milieu aquatique sous conditions contrôlées ou semi-contrôlées par l'homme (Burel *et al.*, 2007). De manière remarquable, depuis la fin des années 80, la production halieutique est relativement stable. Contrairement à la production aquacole qui a connu la croissance la plus rapide et qui a fini par dépasser celui de la pêche qui était de 90,9 Mt (Figure 1) (FAO, 2018).

En effet, l'aquaculture est responsable de la croissance impressionnante de l'offre de poisson pour la consommation humaine. Alors que l'aquaculture fournissait seulement 7% du poisson destiné à la consommation humaine en 1974, cette part est passée à 26% en 1994 et à 39% en 2004. En 2016, La production aquacole mondiale de poissons et de plantes s'est élevée au total à 110,2 millions de tonnes (Mt) avec 80,0 Mt de poisson contre 30,1 Mt pour les plantes aquatiques cultivées. Le poisson d'élevage constitue donc les trois quarts en volume de la production aquacole totale. Parmi ceci, on dénombre 54,1 Mt de poissons, 17,1 Mt de mollusques, 7,9 Mt de crustacés et d'autres animaux aquatiques, tels que les tortues, les holothuries, les oursins, les grenouilles et les méduses comestibles (938500 tonnes).

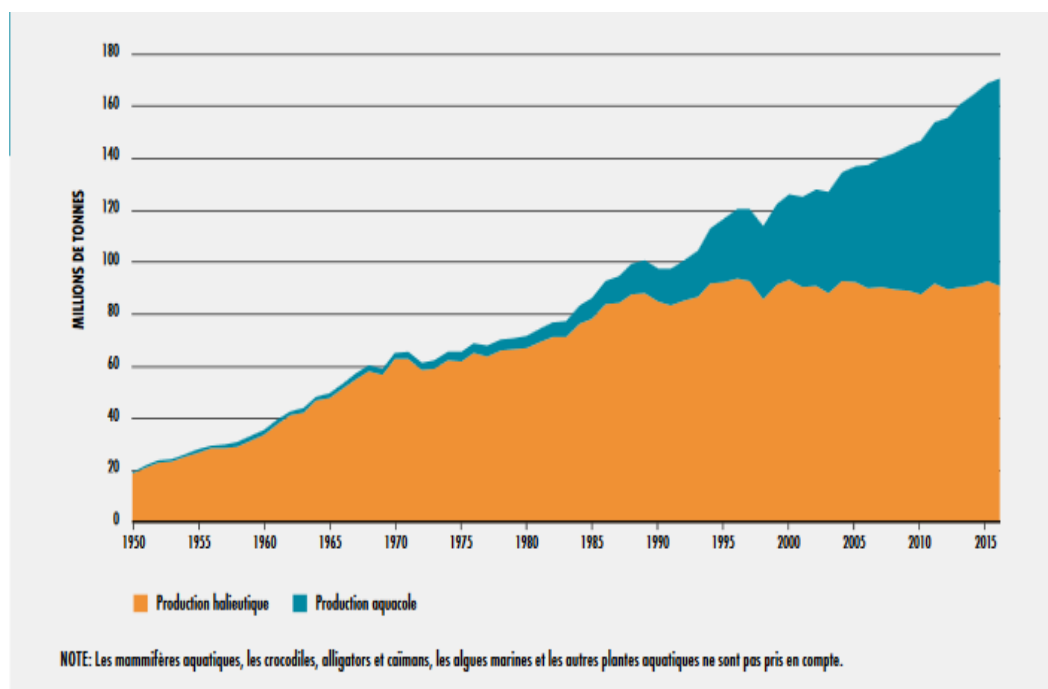


Figure 1 . Productions halieutique et aquacole mondiales (FAO, 2018)

La Chine a produit à elle seule 45,5 millions de tonnes en 2014, soit plus de 60% de la production mondiale de poisson issue de l'aquaculture. Les autres principaux producteurs étaient l'Inde, le Viet Nam, le Bangladesh et l'Égypte (FAO, 2018).

L'Europe fait figure de lilliputien avec 4,3 % de la production aquacole mondiale. La filière française, bien qu'assez minuscule comparée à l'agriculture mondiale, occupe néanmoins la seconde place européenne après l'Espagne : en 2014, la production aquacole était de 204 300 tonnes (FAO, 2016). En effet à l'échelle mondiale, la consommation apparente de poisson par habitant a progressé. Elle est passé d'une moyenne de 9,9 kg dans les années 60 à 14,4 kg dans les années 90 et à 20,2 kg en 2015 (Tableau 1). D'après les estimations préliminaires, elle a continué d'augmenter pour atteindre environ 20,3 kg en 2016 et environ 20,5 kg en 2017.

Tableau 1. Production et utilisation de la pêche et l'aquaculture dans le monde (FAO, 2018)

Catégorie	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Production						
Pêche						
Continentale	10,7	11,2	11,2	11,3	11,4	11,6
Marine	81,5	78,4	79,4	79,9	81,2	79,3
Total – pêche	92,2	89,5	90,6	91,2	92,7	90,9
Aquaculture						
Continentale	38,6	42,0	44,8	46,9	48,6	51,4
Marine	23,2	24,4	25,4	26,8	27,5	28,7
Total – aquaculture	61,8	66,4	70,2	73,7	76,1	80,0
Total – pêche et aquaculture au niveau mondial	154,0	156,0	160,7	164,9	168,7	170,9
Utilisation^b						
Consommation humaine	130,0	136,4	140,1	144,8	148,4	151,2
Usages non alimentaires	24,0	19,6	20,6	20,0	20,3	19,7
Population (milliards de personnes) ^c	7,0	7,1	7,2	7,3	7,3	7,4
Consommation apparente par habitant (en kg)	18,5	19,2	19,5	19,9	20,2	20,3

^a Les mammifères aquatiques, les crocodiles, alligators et caïmans, les algues marines et les autres plantes aquatiques ne sont pas pris en compte.

^b Les données relatives à l'utilisation pour 2014-2016 sont des estimations provisoires.

^c Source des chiffres relatifs à la population: ONU, 2015a.

2. La pisciculture

Parmi les branches de l'aquaculture, la pisciculture est définie comme « *une exploitation ayant pour objet l'élevage de poissons destinés à la consommation, au repeuplement, à l'ornement, à des fins expérimentales ou scientifiques ainsi qu'à la valorisation touristique* » (Article L431-6 du code de l'environnement, 2015). Cette aquaculture est pratiquée principalement en eau douce (pisciculture continentale). En 2016, elle représente 64.2% de la production mondiale de poisson issus de l'aquaculture. Quant à la pisciculture marine représente 35,8% de la production (FAO, 2018).

Dans la pisciculture en circuit fermé, l'élevage des poissons se fait dans un système de confinement qui forme une barrière entre les exploitations et l'environnement naturel. Tandis que la pisciculture en circuit ouvert, l'élevage d'espèces de poissons d'eau salée ou d'eau douce se fait dans des enclos ou des cages qui sont ouverts à l'environnement naturel. De plus, en fonction de l'espèce et des données géographiques, il existe différents modes d'élevage :

- **Le mode extensif** qualifie un système de production caractérisé par une faible efficacité de production (maximum de 0,5 tonne/ha/an) et un faible degré de contrôle de l'environnement et de la nutrition. Les élevages sont conduits à base de ressources naturelles et sans fertilisants ni apports de nourriture (Barnabé, 1991).
- **Le mode semi intensif** est un système de culture caractérisé par une production 2 à 20 tonnes/ha/an et qui est largement dépendant de la nourriture naturelle et est augmenté par fertilisation ou complété par une alimentation supplémentaire (Barnabé, 1991). Cette forme d'aquaculture est pratiquée en étang, parfois en enclos et en systèmes simples d'élevage en cages.
- **Le mode intensif** est un principe de culture caractérisé par un apport total des aliments et une forte production qui peut atteindre jusqu'au 200 tonnes/ha/an. Ce mode d'élevage nécessite un haut degré de contrôle et par conséquent amène des coûts élevés.
- **Le mode hyper-intensif** est un système de culture caractérisé par un contrôle rigoureux de la nourriture qui est à base d'aliments complets industriels formulés et sans fertilisation d'eau. Il est souvent pratiqué en étang, en cages ou en bassins.

Ces dernières années, l'aquaculture a contribué de manière croissante au commerce international de produits halieutiques, en fournissant des espèces telles que les saumons, les bars, les daurades, les crevettes, les bouquets, les bivalves et d'autres mollusques mais aussi des espèces à faible valeur comme les tilapias, les poissons-chats (y compris *Pangasius*) et les carpes (FAO, 2018).

Grace à sa chair savoureuse, son adaptation facile à la captivité et sa croissance rapide la daurade *Sparus aurata* est devenue au fil du temps une des espèces principales de l'aquaculture méditerranéenne (Kentouri et al., 1981).

3. La daurade royale *Sparus aurata*

Nom scientifique : *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)

Nom FAO: An: gilthead sea bream, Fr: Dorade royale, Es: Dorada

Nom de FishBase: Gilthead sea bream

3.1. La daurade royale en quelques chiffres

La daurade royale *Sparus aurata* est la seule espèce actuellement élevée à grande échelle. L'élevage de la daurade dans la région Méditerranéenne est en train de passer d'une industrie de petits volumes à une industrie de grands volumes. Sa production en élevage est passée de 110.755 en 2005 à 158.389 tonnes en 2014 (Figure 2).

La Grèce, en tête de cette production avec (71.000tonnes) en 2014 est de loin le producteur le plus important. La Turquie (41.730 tonnes), l'Espagne (16.230tonnes) et l'Italie (8.200tonnes) sont aussi des producteurs importants en Méditerranée. Il y a aussi, une production considérable en Croatie, Chypre, Egypte, France, Malte, Maroc, Portugal, et en Tunisie. La daurade royale est également produite en Mer Rouge, dans le Golfe Persique et la Mer Arabe. Les principaux producteurs de ces régions maritimes sont l'Israël, le Kuwait et le sultanat d'Oman. Ces pays restent de petits producteurs (FAO, 2016).

La France, malgré que sa production annuelle est de 1.105tonnes, elle est le quatrième producteur de juvéniles de daurades qui sont, en majorité, exportés vers les principaux pays producteurs (Grèce, Turquie, Italie, Espagne et d'autres).

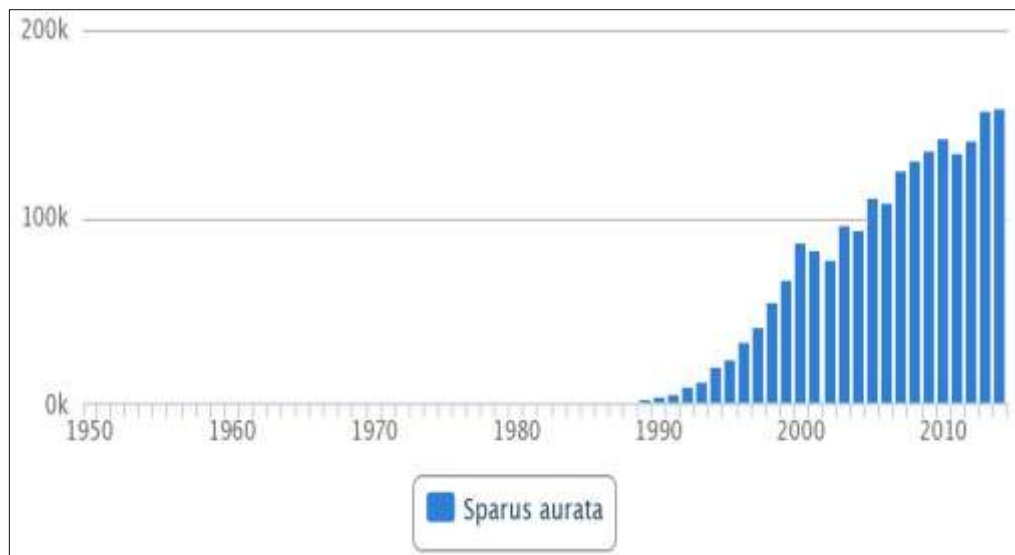


Figure 2. Production mondiale de la daurade royale *Sparus aurata* en tonnes (FAO FishStat)

3.2. Description

Sparus aurata (L. 1758), plus communément appelé daurade royale appartient à la famille des sparidés et au genre *Sparus*. C'est un poisson à corps ovale, assez élevé et comprimé latéralement avec une tête bombée, aux flancs gris argenté dont la taille courante varie de 20 à 50cm (70cm maximum pour un poids de 5 kg). Sur le plan phénotypique, elle se caractérise par un bandeau frontal doré et bordé de noir entre les deux yeux ainsi qu'une grande tache sombre et allongée sur le haut de l'opercule, au début de la ligne latérale. Elle est également facilement identifiable grâce à sa couronne jaune entre les deux yeux qui lui confère le nom de daurade royale (Basurco et al., 2011).

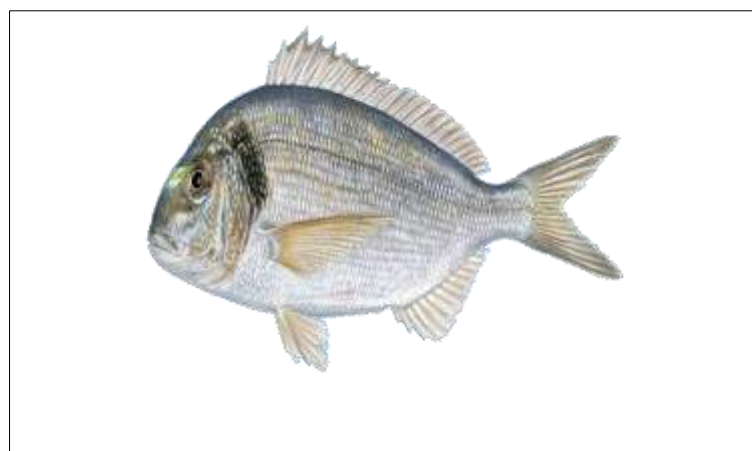


Figure 3. Photographie de la daurade royale *Sparus aurata*

3.3. Habitat et biologie

La daurade royale est présente dans toute la Méditerranée. Cependant, elle est moins fréquente en Méditerranée orientale et sud-orientale et est très rare en mer Noire (Bânârescu, 1964 ; Fisher et al., 1987). Par contre elle est largement répandue dans le bassin de l'Atlantique Est, de la Grande-Bretagne au Cap-Vert et aux Canaries (Bauchot et Hureau, 1986 ; Craig et al., 2008).

C'est une espèce benthopélagique (au comportement démersal) qui vit dans les herbiers à posidonie, dans les fonds sableux et rocheux ainsi que dans les zones de surface et les horizons de 30 m. Néanmoins, on peut trouver des adultes jusqu'à 150 m de profondeur. (Bauchot et Hureau, 1986 ; Basurco et al., 2011).

La daurade royale est une espèce euryhaline et eurytherme, ce qui signifie qu'elle se trouve aussi bien dans des lagunes hyper salées que dans des estuaires ou des zones dessalées (Lasserre, 1976). C'est un poisson carnivore se nourrissant de mollusques, en particulier de moules qu'il peut écraser facilement, de crustacés et de poissons et accessoirement herbivore.

Ce poisson né en mer ouverte durant les mois d'octobre à décembre. Les juvéniles migrent ensuite au début du printemps vers des eaux côtières abritées où ils peuvent trouver des ressources trophiques abondantes et des températures plus douces. Très sensibles aux faibles températures (la limite létale inférieure est 4°C), ils retournent en mer ouverte à la fin de l'automne où les adultes se reproduisent (FAO, 2018).

La daurade est une espèce hermaphrodite protandrique, ce qui signifie que la majorité des individus sont des mâles dans les deux premières années (20-30 cm) et à la fin de leur première maturité deviennent des femelles (33-40 cm) pendant la deuxième saison de frai (Zohar et al., 1978 ; Pavlidis et al., 2006 ; Mylonas et al., 2011). Les femelles sont des reproducteurs en batch qui peuvent pondre de 20000 à 80000 œufs chaque jour pendant une période qui peut aller jusqu'à 4 mois (FAO, 2005-2018).

3.4. Cycle de production

À l'origine, l'élevage de la daurade est basé exclusivement sur la collecte de juvéniles sauvages de mer. Les daurades royales étaient traditionnellement, cultivées extensivement dans les lagunes côtières tels 'vallicoltura' et 'hosha' dans les systèmes respectivement

Italiens et Egyptiens (Figure 4). Ces systèmes sont conçus comme des trappes naturelles de poissons, profitant de la migration trophique naturelle des juvéniles de la mer vers les lagunes côtières. Les juvéniles de cette espèce sont capturés au printemps et stockés dans les lagunes (Cataudella et al., 1995). A la fin de l'année, la daurade royale est stockée dans des étangs d'hivernage, pour être relâchée au printemps. Dans ces environnements, le poisson passe deux ou trois saisons avant d'atteindre une taille commercialisable (Basurco et al., 2011).

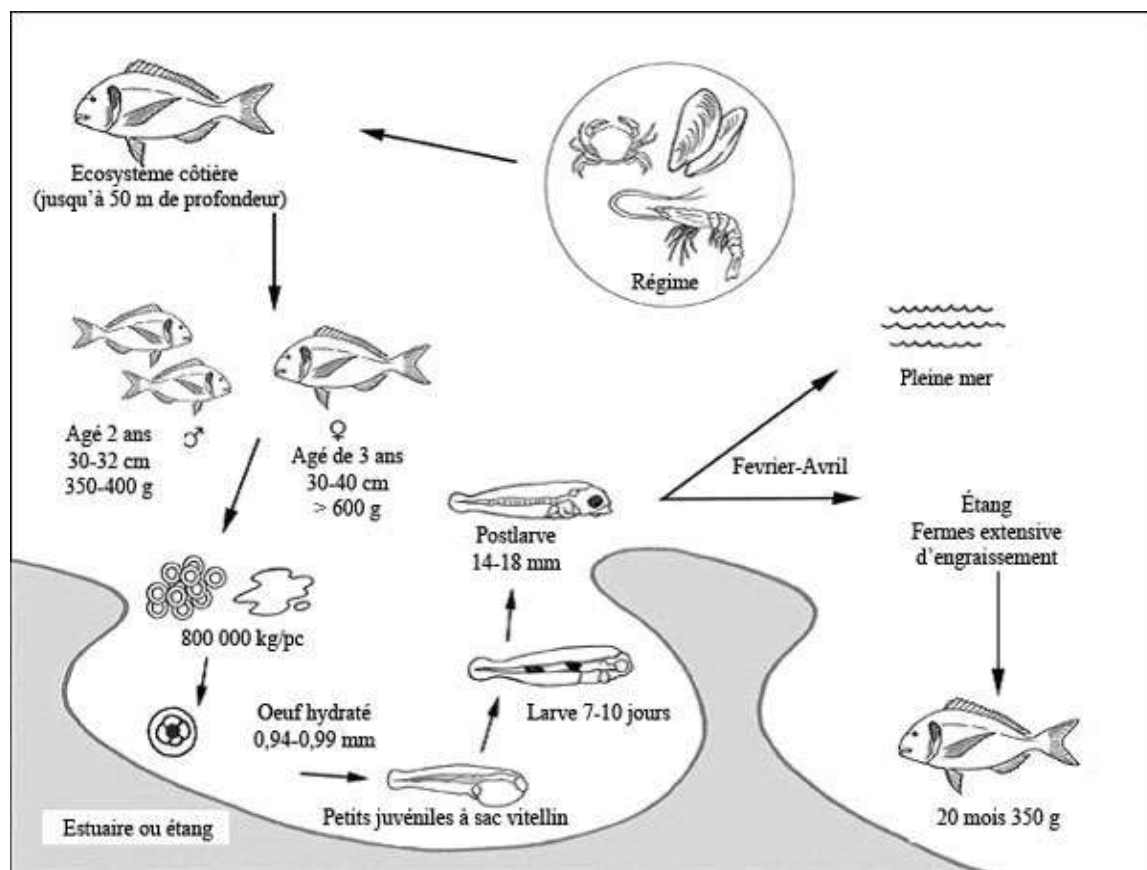


Figure 4. Représentation schématique d'un cycle de production représentatif de la daurade royale dans les systèmes extensifs (FAO, 2005-2018)

Après les années 1960, la disponibilité des juvéniles sauvages a diminué drastiquement en raison de la surpêche et de la pollution. Dès lors il fut nécessaire de mettre en place un approvisionnement aquacole. L'approvisionnement aquacole fiable et constant de juvéniles n'a été possible qu'à partir des années 1980 (Basurco et al., 2011). De nos jours, la majorité

de la production de daurades provient de juvéniles élevés dans des écloséries sophistiquées sur le plan technologique et qui nécessitent du personnel qualifié.

Cependant, l'approvisionnement en juvéniles nécessite tout d'abord la sélection des géniteurs. Ces derniers sont choisis de divers groupes d'âge, de mâles âgés de 1 an à des femelles âgées de 10 ans avec un rapport mâles-femelles de 3 pour 1 (Calderer et Cardona 1993). Une fois inséminés, les œufs de daurade royale (environ 0.9-1.1 mm) sont récoltés et maintenus en écloséries terrestres. Ces œufs sont ensuite incubés pendant deux jours à 16-17°C.

Après l'éclosion et pendant trois ou quatre jours, les larves absorbent leur sac vitellin et commencent à se nourrir d'abord d'algues microscopiques et de zooplancton. Ces larves seront ensuite nourries avec de l'artémie puis enfin avec des aliments secs formulés riches en protéines.

A leur arrivée d'écloserie, les alevins sevrés de 1 à 5 g sont très fragiles et pour ne pas être lâchés directement dans les structures finales de grossissement, ils sont transférés dans des nurseries. Dans ces unités spéciales, les alevins font l'objet d'une surveillance très attentive comme entre autres les conditions physicochimiques de leur environnement tels la température, la lumière et la salinité. Ils restent en nurserie jusqu'à atteindre le stade de juvéniles de 20 – 25 g de poids moyen (FAO, 2005-2018).

A leur sortie de nurserie et avant d'être transférés vers des installations à long terme, les juvéniles se maintiennent généralement dans des bassins de taille moyenne (60 – 100 m³). En élevage intensif (Figure 5), les daurades sont engraisées au moyen de micro-granulés commerciaux ayant une teneur en protéines de 45 à 50 % et des teneurs en lipides d'environ 20%. Après une durée de 5 mois à 10 mois environ ce sont des juvéniles pré-grossis d'un poids moyen unitaire voisin de 70 g qui peuvent être transférés dans les bassins de grossissement final. Pendant cette phase, il n'est pas possible de contrôler la température dans les cages d'élevage et la fréquence des manipulations est réduite à 4 à 8 semaines en raison de la réduction de la vitesse de croissance et de la plus grande homogénéité des lots. Ceci explique la longue période d'élevage nécessaire pour atteindre la taille commerciale de 350 à 400 g (Basurco et al., 2011 ; FAO, 2005-2018).

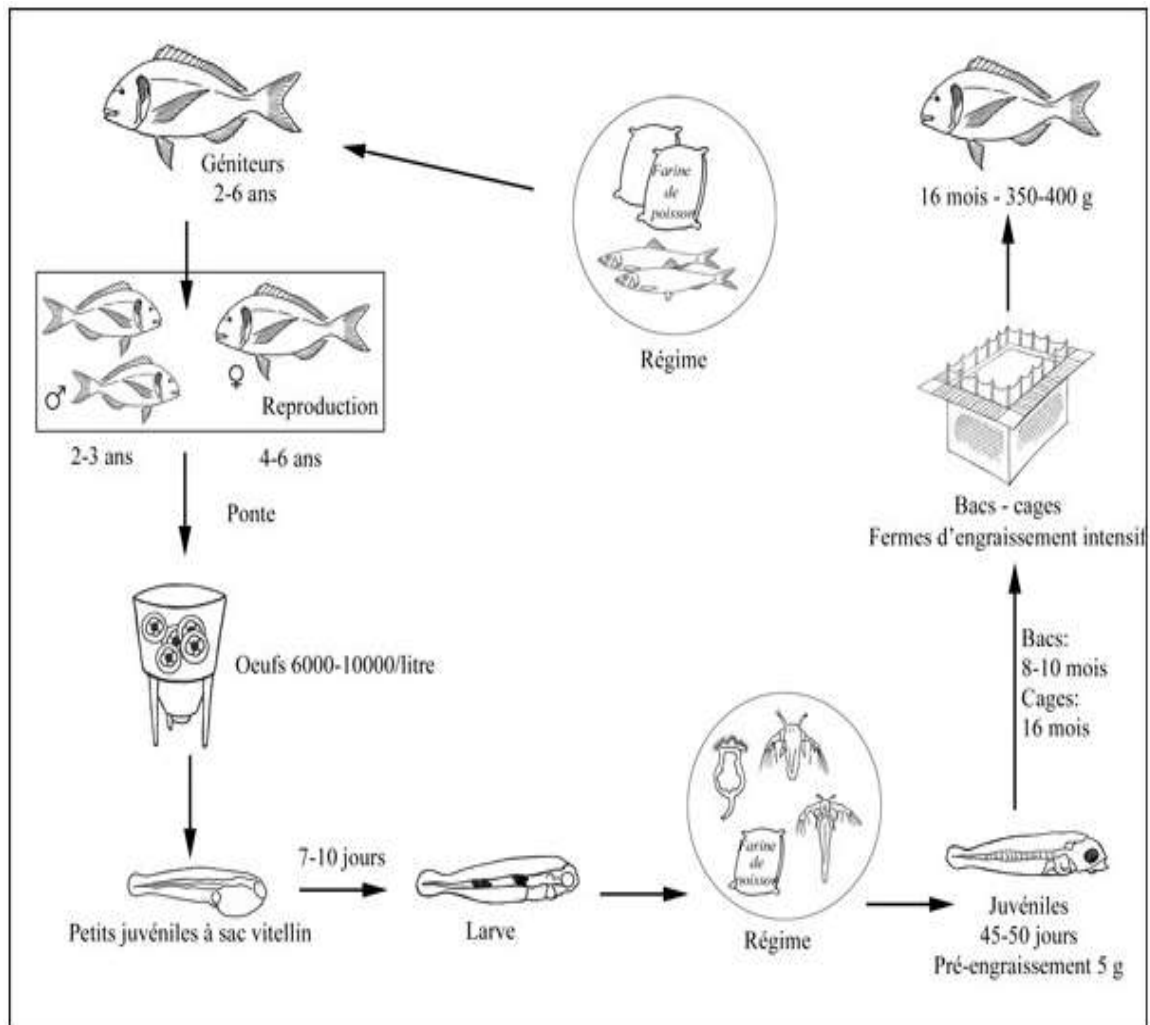


Figure 5. Représentation schématique d'un cycle de production représentatif de la daurade royale dans les systèmes intensifs (FAO, 2005-2018)

Bien que l'élevage aquacole semble actuellement bien maîtrisé, malheureusement l'étape larvaire reste limitée par le taux de mortalité (Kentouri et al., 1981). Cette étape limitante est actuellement sujette à plus d'attention.

3.5. Élevage larvaire de la daurade royale

L'élevage larvaire de la daurade *Sparus aurata* dure environ 50 jours à 17,5°C ou environ 43 jours à 20°C. À l'éclosion, les larves mesurent environ 2,5-3,0 mm de long. Cette petite taille rend la phase larvaire chez la daurade plus complexe que chez le bar (*Dicentrarchus labrax*) et le turbot (*Scophthalmus maximus*).

Les larves fraîchement écloses sont pourvues d'un sac vitellin contenant les éléments nutritifs nécessaires à leur développement jusqu'à ce qu'elles soient capables de prélever leur alimentation dans le milieu exogène. Au cours de cette 1^{ère} phase, les facteurs abiotiques (qualité de l'eau, aération, etc.) de l'environnement d'élevage sont les seules conditions nécessaires à la survie. La concentration d'oxygène dissous doit être supérieure à 85% de saturation, le pH doit être d'environ 8, les concentrations d'ammoniac, d'ammonium et de nitrite doivent être négligeables. L'eau doit être exempte de bactéries pathogènes et sa température comprise entre 16 et 18°C. Les larves épuisent leur sac vitellin après 3–4 jours. Après ce stade, les yeux sont pigmentés et la bouche est développée, permettant aux larves de se nourrir de larves d'autres organismes. La chaîne trophique des larves de la daurade la plus fréquemment utilisée est composée principalement d'algues unicellulaires, des rotifères et des artémies (Conceição et al., 2010 ; Cheng et al., 2011 ; Kumar et al., 2012 ; Mahjoub et al., 2012).

3.5.1. Rotifères

Les rotifères sont un groupe relativement petit d'invertébrés composé d'environ 2 000 espèces. Leur corps a une symétrie bilatérale (Wallace et Snell, 1991 ; Segers, 2007) et ils représentent une grande partie de la diversité du zooplancton dans les milieux d'eau douce et d'eau saumâtre. Ils colonisent pratiquement n'importe quelle étendue d'eau : d'un ruisseau sur les rochers, aux étangs, ruisseaux, marais et lacs salés (Pejler, 1995). Ces rotifères avant d'être distribués aux larves sont eux-mêmes nourris d'algues unicellulaires.

Les rotifères sont un excellent premier aliment pour les larves de poisson en raison de leur petite taille, de leur vitesse de nage lente, de leur aptitude à rester en suspension dans la colonne d'eau et de leur capacité à être cultivés à haute densité en raison d'un taux de reproduction élevé. L'un des rotifères les plus utilisés est *Brachionus plicatilis* (Müller, 1986) (Figure 6) qui mesure entre 70 et 100µm. Ce rotifère a fait l'objet d'études approfondies en raison de son utilisation en aquaculture (Lubzens, 1987). *B. plicatilis* a été classé comme une espèce stratégique (Walker, 1981) en raison de sa petite taille et sa croissance rapide (Stelzer et al., 2011). Il a été signalé que l'utilisation de rotifères de petite taille tels *B. rotundiformis* améliorerait de façon significative les performances d'alimentation initiale du turbot et en particulier des larves de la daurade aux premiers stades de développement (Polo et al., 1992). Dans les éclosiers, les micro-algues (*Chlorella* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Nannochloropsis oculata*, *N. gaditana*, *Dunaliella*

tertiolecta) sont utilisées aussi bien pour la production des rotifères que pour améliorer la qualité d'eau dans les bacs larvaires, en créant ce qu'on appelle l'eau verte « green water » qui est utilisée durant les phases initiales de l'élevage.



Figure 6. Photographie de *Brachionus plicatilis* (Wikipédia)

3.5.2. Artemias

Ce sont des petits crustacés vivants dans les lacs salés, les lagunes et les marais salants. L'espèce la plus connue est le crustacé branchiopode *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) qui mesure 0,5 à 8 mm (Figure 7). Au cours du processus d'élevage larvaire, le nauplius de cette espèce succède sur le plan alimentaire au rotifère *B. plicatilis*.



Figure 7. Photographie du crustacé branchiopode *Artemia salina* L (Wikipédia)

Après 10–11 jours, les rotifères sont distribués avec les nauplii d'*A. salina* jusqu'à ce que les larves achèvent leur métamorphose (32–35 jours après éclosion). Les rotifères et l'artémia sont quotidiennement enrichis avec des préparations lipidiques commerciales ainsi que des antibiotiques ou des probiotiques avant d'être distribués aux larves. Ceci signifie que ces éléments de la chaîne alimentaire ont un profil alimentaire incomplet bien qu'ils soient faciles à produire en forte densité (Sargent *et al.*, 1997).

L'un des moyens d'améliorer le profil alimentaire des aliments destinés aux larves en améliorant les teneurs en certains acides gras essentiels, en vitamines, ... (éléments essentiels pour une bonne croissance, un bon développement et une meilleure survie), repose sur l'utilisation des copépodes qui apparaît comme une alternative intéressante dans la chaîne alimentaire larvaire.

3.5.3. Copépodes

Le terme copépode est le nom commun issu de la sous-classe des *Copepoda*. Globalement, ce terme désigne des petits crustacés, très diversifiés et correspond à environ 11 500 espèces (Humes, 1994). Ils sont généralement de taille microscopique, vivant dans l'eau de mer et dans presque tous les habitats d'eau douce (lacs, marais, rivières, eaux souterraines). En mer, ils forment la base du zooplancton et la base de la nourriture des poissons.

Dans les écosystèmes marins, les copépodes jouent un rôle important en termes de liens énergétiques entre les niveaux trophiques ; les copépodes étant la proie naturelle des larves de nombreuses espèces de poissons marins. En particulier, leurs stades larvaires - nauplii, sont considérés comme le régime alimentaire approprié et équilibré pour les larves de poissons marins (Støttrup, 2000).

Parmi la sous-classe des copépodes, les copépodes calanoïdes sont consommés naturellement dans la nature par de nombreux poissons en stades larvaires (Pepin et Penney, 1997) et certaines espèces de copépodes calanoïdes comme *Acartia tonsa* (Figure 8), *Eurytemora affinis* (Figure 9) et *Gladioferens imparipes* ont déjà été utilisées pour la culture de poisson. La plupart de ces espèces sont, particulièrement, de bons candidats pour la pisciculture (Støttrup et McEvoy, 2003).

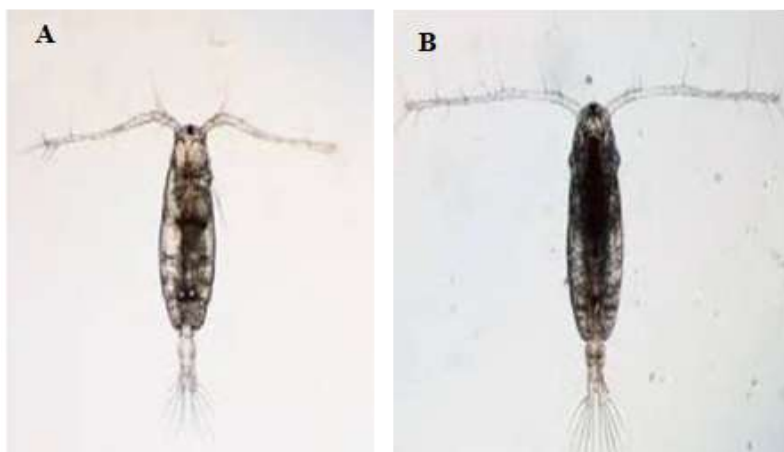


Figure 8. Photographie du copépode *Acartia tonsa* (A : mâle, B : femelle).



Figure 9. Photographie du copépode *Eurytemora affinis* (A : mâle, B : femelle).

Ces copépodes offrent d'une part, une taille adéquate ($<100\ \mu\text{m}$) tout au long des étapes de leur développement (Figure 10) pour les petits poissons larvaires ayant une petite bouche (Payne et Rippingale 2000 ; McKinnon et al., 2003). D'autre part ils constituent une excellente source d'acides gras hautement insaturés de par la composition en acides gras et de leur fraction lipidique polaire. Cette caractéristique rend les lipides des copépodes plus biologiquement disponibles pour les larves de poissons (Evjemo et Olsen, 1997). Les copépodes sont aussi une importante source de vitamine A (Rønnestad et al., 1998), de vitamine C, de vitamine E (Schipp, 2006) et de minéraux (Watanabe et al., 1983). De plus, la digestion de ces copépodes est aisée pour les larves de poissons par rapport aux rotifères et *Artemia* (Schipp, 2006).

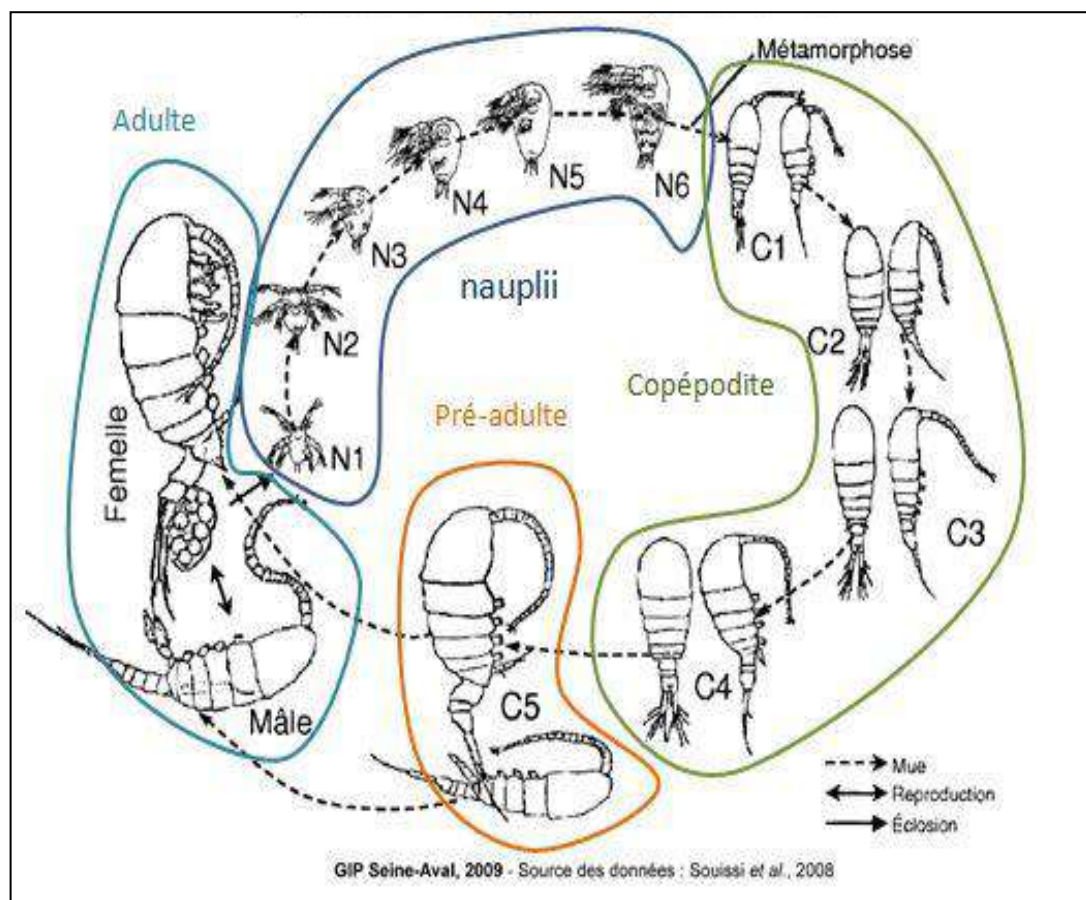


Figure 10 . Cycle de développement du copépode calanoïde *Eurytemora affinis* ; Stades larvaires de N1 à N6, les stades juvéniles de C1 à C5 et les stades adultes C6 (Dessins compilés d'après Katona, 1971 et modifié par Sami Souissi).

À l'heure actuelle, les techniques d'élevage aquacole de la daurade royale sont bien maîtrisées mais malheureusement des mortalités parfois massives se surviennent au sein de ces élevages. Ces mortalités sont dues à des contaminants d'origines microbiologique et ou chimiques, rejetés par les industries, l'agriculture et les communautés urbaines.

**Chapitre II. Les Principaux
Contaminants Biologiques Causant des
Problèmes dans l'Elevage de la
Daurade et les Mesures de Surveillance**

1 Les contaminants biologiques

Le microbiote des poissons reflète avant tout les caractéristiques de l'environnement aquatique dans lequel ils évoluent avant d'être pêchés (ICMSF, 2005). Ainsi, la combinaison des populations microbiennes résidentes endogènes et des populations microbiennes exogènes, provenant de l'environnement, constitue la microflore de poissons (Bagge et al., 2003).

Le muscle des poissons vivants est stérile, cependant la peau, le mucus, les ouïes et l'intestin contiennent un microbiote dont la composition varie qualitativement et quantitativement selon les espèces de poissons. Celle-ci est aussi fortement influencée par la température, la salinité de l'eau, le niveau d'oxygène dissous, le degré de pollution et l'alimentation des poissons (Leroi, 2010).

Chez le poisson, on retrouve de nombreuses bactéries, parfois pathogènes, telles *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Carnobacterium*, *Brochotrix*, *Staphylococcus*, *Bacillus* et *Listeria monocytogenes* (Paari et al., 2012). Le développement de microorganismes pathogènes constitue un risque majeur pour les consommateurs d'où l'importance de la connaissance des causes des maladies touchant la daurade royale (*Saprus aurata*) (Tableau 2) dans les élevages aquacoles.

1.1 Les bactéries pathogènes

1.1.1. Les Vibrionacées

Les bactéries appartenant au genre *Vibrio*. Ce sont des bactéries problématiques en aquaculture. Très répandue dans les environnements marins, côtiers et estuariens, ces bactéries représentent un risque sanitaire non négligeable (Sudha et al., 2002). La vibriose est le nom donné à une maladie causée par un grand groupe de bactéries appartenant aux Vibrionaceae. Plusieurs espèces, telles *Vibrio (Listonella) anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi (carchariae)*, *V. ordalii* et *V. salmonicida*, sont associées à des mortalités de poissons. Il est important de noter que les mêmes vibrions qui provoquent la vibriose sont présents dans l'environnement aquatique et font souvent partie de la flore intestinale normale du poisson.

Tableau 2. Principales bactéries causant des maladies chez la daurade royale *Sparus aurata* et les mesure de contrôle (FAO,2005- 2018).

Espèce	Maladie	Syndromes	Mesures
Maladies bactériennes			
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Damsela</i>	Vibriose	Peau noire; léthargie; abdomen distendu; hémorragies	Eviter l'utilisation d'aliment avec une teneur lipidique élevée; antibiotiques
<i>Vibrio alginolyticus</i>		Hémorragies; peau noire; lésions de la peau	Bonne hygiène; antibiotique
<i>Vibrio anguillarum</i>		Léthargie; anorexie; tête en position basse	Bonne hygiène et désinfection de l'eau; antibiotiques
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i>	Photobactériose (Pasteurellose, Pseudotuberculose)	Anorexie; nécrose focalisée des branchies	Vaccination des géniteurs et juvéniles; utilisation des immunostimulants et vitamines pour traitements; bonne hygiène et désinfection de l'eau; antibiotiques
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> (multifactoriel)	Syndrome de maladie d'hiver	Syndrome ventre en haut 'Belly up', avec ou sans hémorragie	Désinfection efficace et période de nettoyage pour les unités d'engraissement à terre; adapter le régime alimentaire préparer le poisson pour la période d'hiver; traitement antibiotique inefficace <i>in vivo</i>
Maladies virales			
Iridoviridae	Lymphocystis	Pseudotumeur blanchâtre	Réduire le taux d'alimentation; réduire la biomasse; éviter un stress additionnel sur les poissons infectés; faible pathogénie - pas de traitement
Aquareovirus	Aquareovirus	Aucun	Pathogénie faible, pas de traitement
Virus-like particle	Syndrome de Distension d'Intestin (SDI)	Abdomen distendu, tournoiement désorienté; immobilité avec la tête en bas	Traitement efficace aux UV de l'eau entrante durant les premiers stades larvaires
Maladies parasitaires			
<i>Enteromyxum Myxidium leei</i> (Endoparasite)	Myxosporidiose	Léthargie; abdomen distendu; hyperpigmentation	Eviter de stresser les poissons, pas de traitement

La vibriose est caractérisée par une septicémie hémorragique systémique. La léthargie, l'assombrissement de la peau, l'épaississement cornéen, les branchies anémiques, l'érythème de l'évent et de la base des rayons des nageoires sont les signes extérieurs typiques. Sur le plan interne, les vaisseaux sanguins viscéraux congestionnés, l'hémorragie intestinale, la destruction de la tunique muqueuse et l'accumulation de liquide sérosanguin dans les intestins et de l'exsudat mucoïde dans la cavité abdominale sont les symptômes les plus courants (Colorni et al., 1981 ; Austin et al., 1993). Les vibrions produisent une grande variété de protéases, d'hémolysines et d'autres enzymes extracellulaires responsables de ces lésions tissulaires extensives (Hjeltnes et Roberts, 1993).

La bactérie *V. alginolyticus* est fréquemment isolée aux niveaux des lésions cutanées, causant entre autres une inflammation et des ulcères (Bordas et al., 1996 ; Rigos et al., 1998) (Figure 11). Woo et al. et Ye et al. (Woo et al., 1995 ; Ye et al., 1997) ont estimé que *V. alginolyticus* serait responsable de fortes mortalités chez la daurade argentée (*Sparus sarba*) à Hong Kong. Cette bactérie a également été associée à des maladies chez la daurade royale en Espagne (Balebona et al., 1998) (Figure 12). De plus, *V. alginolyticus* a également été impliquée dans des mortalités d'alevins de daurade (Kusuda et al., 1986). *V. alginolyticus* a été signalée comme agent pathogène responsable de mortalité chez la daurade d'élevage (*Sparus aurata*) en Israël (Colorni et al., 1981). En Asie, cette espèce a été isolée chez la daurade royale, la daurade argentée (*Sparus sarba*) (Deane et al., 2001 ; Li et al., 2003) et la larve de la daurade noire (Kusuda et al., 1986).

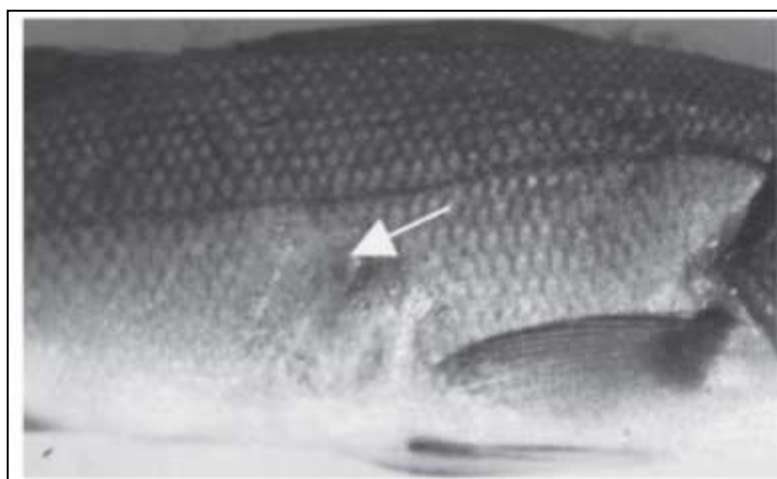


Figure 11. Photographie d'une nécrose congestive au flanc par atteint de *Vibrio alginolyticus* (Ben Kahla-Nakbi et al., 2006)

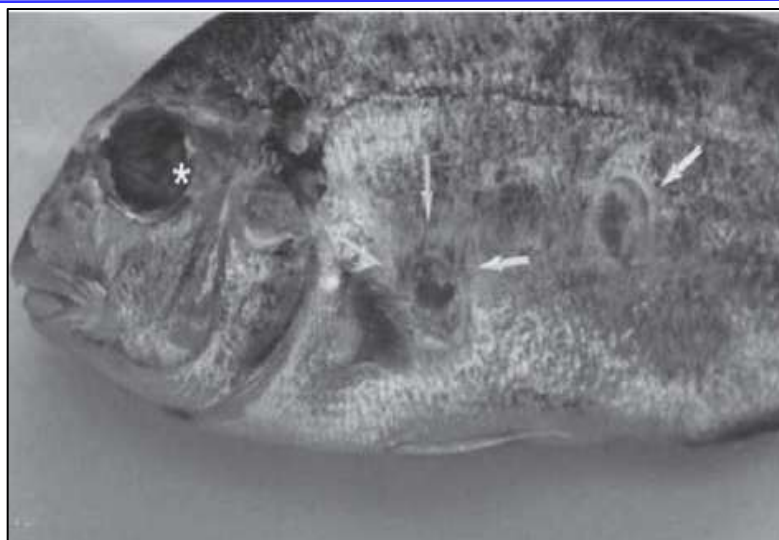


Figure 12. Photographie d'une daurade atteinte par *Vibrio alginolyticus* (Ben Kahla-Nakbi et al., 2006)

V. anguillarum, agent étiologique de la vibriose classique a quasiment une distribution mondiale, cause une septicémie hémorragique typique chez une grande variété d'espèces de poissons d'eau chaude et d'eau froide d'intérêt aquacole, y compris la daurade (*Sparus aurata*), le saumon du Pacifique et de l'Atlantique (*Oncorhynchus spp* et *S. salar*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), le turbot (*S. maximus*), le bar (*Dicentrarchus labrax*), le bar rayé (*Morone saxatilis*), la morue (*Gadus morhua*), l'anguille japonaise et européenne (*Anguilla japonica* et *Anguilla anguilla*) et l'ayu (*P. altivelis*) (Toranzo et Barja, 1990 ; 1999). Bien qu'il existe un total de 23 sérotypes O (O1-O23, sérotype européen) parmi les isolats de *V. anguillarum* (Pedersen et al., 1999), seuls les sérotypes O1, O2 de *V. anguillarum* et, dans une moindre mesure, le sérotype O3 ont été associés à des flambées de vibriose chez les poissons d'élevage et sauvages. Le sérotype O1 semble être le sérotype le plus fréquent en Italie et en Grèce (Pedersen et al., 1993).

En plus de *V. anguillarum* et de *V. alginoliticus*, d'autres espèces de *Vibrio* ont été fréquemment isolées à partir de sparidés malades provenant de plusieurs fermes autour du bassin méditerranéen tels *V. parahaemolyticus*, certains biotypes de *V. vulnificus* et *V. harveyi* (Lee et al., 2002 ; Colorni et Padrós, 2011).

L'espèce *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*, anciennement connu sous le nom de *V. damsela* ou *Listonella damsela* est une bactérie marine de la famille des *Vibrionaceae* et du

genre *Vibrio* qui provoque des infections chez divers animaux marins et l'Homme. Elle est également responsable de la maladie de vibriose. Cette bactérie a été isolée chez la daurade royale, la daurade rouge et la daurade blanche en Espagne (Vera et al., 1991 ; Labella et al., 2006 ; García-Rosado et al., 2007). Cette bactérie provoque une septicémie chez les poissons comme les daurades (*Sparus aurata*), les turbots (*Scophthalmus maximus*), les anguilles (*Anguilla anguilla*), les requins bruns (*Carcharhinus plumbeus*) et les limandes (*Seriola quinqueradiata*) (Love et al., 1981 ; Sakata et al., 1989). Dans tous les cas, les principaux symptômes externes de l'infection par cette bactérie sont des lésions cutanées ulcéreuses et des hémorragies étendues, en particulier dans la bouche, les yeux et les musculatures des yeux (Fouz et al., 1992 b) et peut également causer des ulcères cutanés chez les humains (Love et al., 1981).

La bactérie halophile *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (anciennement *Pasteurella piscicida*) est un membre de la famille des *Vibrionaceae* et c'est l'agent étiologique de la pasteurellose. Au cours de l'été 1963, une épizootie a été signalée chez des perches blanches (*Morone americanus*) et de bar rayé (*Morone saxatilis*) dans la partie supérieure de la baie de Chesapeake, aux États-Unis, où 30 micro-organismes ont été retrouvés et possédaient certaines des caractéristiques principales de *Pasteurella* (Snieszko et al., 1964). Sur la base de ces caractéristiques morphologiques et biochimiques, le pathogène responsable a été initialement placé dans le genre *Pasteurella* d'où vient le terme « pasteurellose ». Cependant, la littérature est devenue confuse, dans la mesure où la maladie est également appelée « pseudotuberculose » au Japon en raison de sa pathologie distinctive (Snieszko et al., 1964). Sur la base de son gène ARNr 16S, la bactérie responsable a été identifiée comme appartenant au genre *Photobacterium* et a été nommée *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* (Gauthier et al., 1995 ; Trüper et De'Clari, 1997). En raison de ce changement dans la position taxonomique de l'agent causal, certains auteurs ont renommé cette septicémie comme photobactériose.

La Photobactériose est une septicémie bactérienne appelée aussi pseudotuberculose car, dans les cas chroniques, les poissons malades présentent, dans plusieurs organes internes (le rein et la rate), des dépôts granulomateux de type tubercules blanchâtres constitués de colonies bactériennes blanches grisâtres (Kusuda et Yamaoka, 1986). Le matériel purulent peut s'accumuler dans la cavité abdominale (Lewis et al., 1970). Les changements saisonniers de la température de l'eau et l'âge des poissons sont souvent critiques dans l'épidémiologie de la

maladie. Les températures supérieures à 21°C augmentent la probabilité et la gravité des flambées et les jeunes poissons sont généralement les plus sensibles. À des températures plus basses, la mortalité peut diminuer mais les poissons restent porteurs de l'agent causal (Magariños et al., 2001 ; Toranzo et al., 2005).

Photobacterium damsela ssp. *piscicida* a une large gamme d'hôtes sensibles, à la fois sauvages et cultivés. Dans la région méditerranéenne, elle a causé des pertes importantes, en particulier parmi les daurades et le bar européen (Kvitt et al., 2002 ; Toranzo et al., 2005). La transmission peut être verticale, à travers les fluides ovariens et séminaux de géniteurs apparemment sains (Romalde et al., 1999), ainsi qu'horizontale, via une transmission bactérienne par l'eau pouvant infecter son hôte par les branchies, le tractus gastro-intestinal et éventuellement la peau (Magariños et al., 1995 ; Fouz et al., 2000). *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* a également été isolée chez la daurade (Yasunaga et al., 1983), la daurade noire (Muroga et al., 1977 ; Ohnishi et al., 1982) dans les eaux japonaises et chez la daurade royale (Magariños et al., 2001 ; Balebona et al., 1998 b ; Kvitt et al., 2002). Plus récemment, la maladie semble s'étendre aux stocks de poissons d'élevage et sauvages de la région méditerranéenne, notamment en Croatie, en France, en Italie et en Espagne (Magariños et al., 1992 ; Mladineo et al., 2006).

1.1.2. Les *Pseudomonas*

Parmi les pseudomonaceae, *Pseudomonas anguilliseptica* est considéré comme l'agent pathogène le plus important pour les poissons d'élevage (Austin, 1988). La septicémie hémorragique par *P. anguilliseptica* chez les poissons de mer a été signalée initialement chez la daurade (Nakajima et al., 1983) et a été associée en plusieurs occasions au syndrome hivernal dans les régions méditerranéennes. Bien que son étiologie présente encore des aspects peu clairs (Bovo et al., 1995 ; Doimi, 1996), l'isolement récurrent de *P. anguilliseptica* indique que cette bactérie joue souvent un rôle important dans la pathogenèse de la maladie (Berthe et al., 1995 ; Dom'enech et al., 1997, 1999).

Toutefois, le terme « syndrome d'hiver » ou « maladie hivernale » décrit à la fin des années 1980 et au début des années 1990, désigne une affection touchant exclusivement la daurade royale élevée à basse température (Bovo et al., 1995). Il est considéré comme un problème multifactoriel provoqué par les perturbations physiologiques, métaboliques et immunologiques associées à la mauvaise tolérance de cette espèce aux conditions d'élevage à

dés températures inférieures à 15°C (Padros et al., 1996 ; Tort et al., 2004). Les altérations physiologiques et les perturbations immunologiques se produisant chez la daurade élevée en eau froide ont été étudiées par (Gallardo et al., 2003 ; Sala-Rabanal et al., 2003 ; Ibarz et al., 2007). Leurs résultats indiquent qu'à basse température les poissons ne peuvent métaboliser correctement les graisses et que la mobilisation massive des lipides du tissu adipeux vers les tissus périviscéreux et sous-cutanés provoque de graves perturbations du métabolisme hépatique.

Cette maladie qui est généralement observée chez les poissons élevés dans des cages ou des étangs dans les régions Méditerranéennes pendant les mois d'hiver, où la température de l'eau peut rester entre 8 et 15°C plusieurs mois, affecte principalement les poissons jusqu'à 100 g. Deux stades principaux du syndrome hivernal ont été reconnus et nommé « premier hiver » et « second hiver ». Le « premier hiver » se déroule généralement en décembre-mars, avec des taux de mortalité faibles mais constants. L'étape « deuxième hiver » apparaît au début du printemps, lorsque les températures atteignent 15-16°C. A ce moment, des mortalités plus brusques sont enregistrées, parfois jusqu'à 20-30% du stock. Dans ce type d'affection, lorsque la température descend en dessous de 15 °C, l'alimentation du poisson devrait être interrompue et toute opération de manutention devrait être reportée (Colorni et Padrós, 2011). Les principaux signes cliniques des poissons affectés par cette septicémie sont la distension abdominale, la kératite et les pétéchies hémorragiques de la peau et des organes internes tels le foie. Les signes externes sont généralement visibles, distension abdominale modérée (Berthe et al., 1995). Chez les sparidés, des infections à *P. anguilliseptica* ont été décrites chez la daurade royale (Berthe et al., 1995) et chez la daurade noire (Lopez-Romalde et al., 2003).

P. anguilliseptica semble être un pathogène biochimiquement homogène quelle que soit la source d'isolement (Berthe et al., 1995 ; Doménech et al., 1997 ; Lopez-Romalde et al., 2003a). Cependant, l'étude des caractéristiques sérologiques indique l'existence de deux sérotypes O majeurs liés au poisson hôte, une caractéristique des isolats d'anguilles et une autre caractéristique des isolats de daurade royale, de turbot et de daurade noire (Lopez-Romalde et al., 2003).

1.1.3. Autres espèces bactériennes

En plus des espèces décrites ci-dessus, d'autres espèces causant des infections ont été signalées également dans les élevages de daurade royale. *Tenacibaculum maritimum* (anciennement *Cytophaga marina*, *Flexibacter marinus* et *F. maritimus*) est un agent pathogène opportuniste responsable de la « flexibactériose », également appelée « maladie bactérienne glissante », « syndrome de la bouche érodée » et « nécrose du patch noir » chez les poissons marins (Wakabayashi et al., 1986 ; Bernardet et Grimont, 1989 ; Sukui et al., 2001). La flexibactériose marine est largement répandue chez les poissons d'élevage et sauvages d'Europe, du Japon, d'Amérique du Nord et d'Australie (McVicar et White, 1979, 1982 ; Wakabayashi et al., 1986 ; Pazos et al., 1993 ; Chen et al., 1995 ; Devesa et al., 1989 ; Handler et al., 1997 ; Ostland et al., 1999 ; Santos et al., 1999 ; Avendanho-Herrera et al., 2005). Parmi les poissons d'élevage, la maladie a été signalée chez la daurade royale (Avendaño-Herrera et al., 2005), la daurade rose et la daurade (Wakabayashi et al., 1986), la daurade blanche, la daurade commune et le dentex commun (Vatsos 2007b ; Bergh, 2008). Les infections à *Tenacibaculum* chez les sparidés sont généralement sévères.

Bien que les adultes et les juvéniles puissent être affectés par la flexibactériose marine, les poissons plus jeunes souffrent d'une forme plus grave de la maladie. Une augmentation de la prévalence et de la gravité de la maladie a été signalée à des températures au-dessus de 15°C. En plus de la température de l'eau, la maladie est influencée par une multiplicité de facteurs environnementaux (stress) et est liée à l'hôte (état de surface de la peau) (Magariños et al., 1995). En général, les poissons affectés ont une bouche érodée et hémorragique, des lésions cutanées ulcéreuses, des nageoires effilochées et de la pourriture sur la queue. Une maladie systémique peut également être établie impliquant différents organes internes. Les lésions des surfaces épithéliales typiques de cette maladie constituent également une porte d'entrée pour d'autres pathogènes bactériens ou parasitaires. Les signes cliniques, ainsi que l'observation microscopique de prélèvements à partir de branchies ou de lésions, peuvent être utilisés comme une première étape pour le diagnostic présomptif de flexibactériose marine. Ce diagnostic préliminaire doit être appuyé par l'isolement de l'agent pathogène dans le milieu approprié ou par l'utilisation de méthodes spécifiques basées sur l'ADN moléculaire appliquées directement aux tissus des poissons.

La staphylococcose est une autre infection répandue chez les poissons marins. Elle remonte aux années 1970 au Japon, où des cocci β -hémolytiques Gram positif, catalase positif,

coagulase négative, identifiés comme *Staphylococcus epidermidis*, étaient responsables de mortalités élevées chez la sériole d'élevage (*Seriola quinqueradiata*) et la daurade rouge (Kusuda et Sugiyama, 1981 ; Sugiyama et Kusuda, 1981a). *S. epidermidis* a été identifié comme un agent pathogène chez la daurade rouge (*Chrysophrys major*) et la carpe herbivore (*Ctenopharyngodon idella*) (Wang et al., 1996), le tilapia (*Oreochromis spp.*) à Taiwan (Huang et al., 1999) et la daurade (*Sparus aurata*) mais aussi le bar (*Dicentrarchus labrax*) dans différentes fermes piscicoles en Grèce (Varvarigos, 2001). Dans l'environnement aquatique, *S. epidermidis* est une bactérie opportuniste susceptible de devenir pathogène pour les poissons dans des conditions stressantes (Varvarigos, 2001).

Les symptômes externes de l'infection induite par cet agent pathogène sont une congestion et des hémorragies sur les nageoires pectorales et caudales, une coloration foncée de la peau, une léthargie et une sécrétion excessive de mucus sur la peau et les branchies. La bouche et la mâchoire inférieure présentent des lésions hémorragiques et les branchies sont anémiques. Les symptômes internes comprennent la présence de liquide ascitique dans la cavité abdominale et un foie élargi et pâle montrant des vaisseaux sanguins congestionnés avec des zones sombres enflammées. La vésicule biliaire est remplie de bile vert foncé ou de bile légèrement jaunâtre, la rate est également élargie. La congestion et les hémorragies ont été observées dans certaines régions du cerveau, l'estomac étant vide chez certains poissons. Bien que tous ces symptômes soient similaires à ceux observés par (Varvarigos, 2001 ; Kubilay et Uloköy, 2004) chez le bar et la daurade, des infections à *S. epidermidis* induisent des symptômes différents chez le tilapia (Huang et al., 1999) tels que les nodules blancs et jaunâtres au niveau des reins et de la rate.

1.2 Les espèces virales

Le virus de *Lymphocystis* est un virus à ADN appartenant à la famille des Iridoviridae. Il est l'agent causal de la lymphocystose (LCD), très répandue dans l'élevage de la daurade royale (FAO, 2011). Cette maladie a été signalée dans le monde entier et est décrite dans un grand nombre de téléostéens frais, saumâtres et marins, tant dans la culture que dans la nature. Les poissons atteints développent des amas macroscopiques de verrues de fibroblastes dermiques extrêmement hypertrophiques (Figure 13). Ces agrégats cellulaires sont grisâtres ou plus foncés. Le virus est typiquement dermatrope ; cependant, l'invasion des organes viscéraux, tels que la rate et le cœur, peut également survenir dans les infections graves (Schäperclaus, 1992 ; Colorni et Diamant, 1995).



Figure 13. Photographie d'un poisson atteint de lymphocytose (forumactif.org)

Cette maladie virale a été signalé en Israël pour la première fois chez des daurades cultivées en mer rouge ([Paperna et al., 1982](#)). La maladie a été fréquemment signalée chez la daurade royale dans les nurseries d'aquaculture autour du bassin méditerranéen, notamment en Italie ([Masoero et al., 1986](#)), en Espagne ([Basurco et al., 1990](#) ; [García-Rosado et al., 1999](#)), en Grèce et en Turquie ([Moate et al., 1992](#)), et en France ([Le Deuff et Renault, 1993](#)), ainsi qu'au Portugal ([Menezes et al., 1987](#)).

La maladie de Lymphocystis survient principalement à des températures comprises entre 22 et 27 ° C chez la daurade royale, avec des lésions cutanées qui se cicatrisent à 30-40 jours après les premiers signes cliniques. À des températures inférieures à 22 ° C, l'évolution de la maladie est plus longue (60-70 jours) et le taux de récupération plus faible. Bien que la maladie peut survenir chez des spécimens plus âgés, avec des mortalités généralement moins importantes, les poissons plus jeunes sont plus sensibles ([Bovo et Florio, 2008](#)).

1.3 Les espèces parasites

Plusieurs parasites telles que les Myxozoaires ([Alvarez-Pellitero et al., 1995](#) ; [Sitjà-Bobadilla et Alvarez-Pellitero, 2001](#) ; [Fioravanti et al. 2006a](#) ; [2006b](#) ; [Athanassopoulou, 2007](#)), les Monogenes ([Paperna et al., 1977](#) ; [Padros et Crespo 1995](#) ; [Vagianou et al., 2004](#)), Microsporidies ([Mathieu-Daude et al., 1992](#) ; [Abela, 1996](#)) et les Digènes ([Padros et al., 2001a](#) ; [Holzer et al., 2007](#)), ont été signalées dans l'élevage de la daurade royale (*Sparus aurata*), associées à la mortalité de cette espèce aquacole.

La plus répandue est la maladie de Myxosporidiose dont l'agent causal est *Enteromyxum leei* (anciennement *Myxidium leei*). Avec d'autres parasites entéromyxosporidiens, *Myxidium leei* est l'un des problèmes majeurs de l'aquaculture marine. Son infection est chronique. Les caractéristiques de cette maladie sont la léthargie, abdomen distendu, hyperpigmentation et une nécrose qui produit une odeur nauséabonde, une fois étendue aux revêtements intestinaux.

Les poissons affectés deviennent anorexiques et émaciés, et finissent par mourir avec une forme typique de « couteau » et un abdomen gonflé. Cette infection est particulièrement agressive chez les daurades (Montero et al., 2007 ; Alvarez-Pellitero et al., 2008). Cependant, L' *E.Leei* est signalé pour la première fois dans la daurade royale de Chypre (Diamant, 1992), le parasite a été trouvé associé à la morbidité et à la mortalité en Israël (Diamant et al., 1994), en Grèce (Le Breton et Marques, 1995 ; Athanassopoulou et al., 1999), en France (Sakiti et al., 1996), en Italie (Fioravanti et al., 2004), en Espagne (Alvarez-Pellitero et Sitja-Bobadilla, 1993), ainsi que chez d'autres espèces de sparidés (p. ex., daurade royale, daurade rouge, daurade blanche et daurade commune (*Diplodus vulgaris*) (Kent et al., 2001 ; Padros et al., 2001 ; Athanassopoulou, 2007).

2 Mesures de surveillance

La surveillance des risques et des maladies dues aux différents agents pathogènes susceptibles d'affecter l'activité aquacoles de par le monde est une priorité pour l'ensemble des entités politiques. La surveillance consiste à un examen constant d'une population donnée en vue de détecter l'apparition des maladies. Elle est nécessaire pour prouver qu'une région ou un pays est exempt d'une maladie ou d'un agent pathogène donné

Le programme national de surveillance et de prophylaxie doit être prévu dans un cadre réglementaire. Parmi les exemples de la législation qui s'applique à la protection sanitaire des animaux aquatiques ; La directive 91/67/CEE de l'Union européenne, la législation nationale britannique pour la prophylaxie des maladies de poissons et la législation norvégienne sur les maladies des animaux aquatiques.

Il est important que toute législation confère aux autorités compétentes le droit légal de prendre des mesures spéciales en cas de suspicion d'une maladie importante sur le plan socio-économique dans le secteur de l'aquaculture. Ces mesures dépendent du type de maladie à maîtriser.

Dans les pays développés des institutions nationales, comme la FDA aux USA, et/ou interétatiques comme en Europe prennent en charge les missions de surveillance et d'alertes concernant les épizooties touchant le domaine aquacole notamment. Ces institutions consultatives, ont parfois autorité pour émettre des alertes sanitaires concernant des épisodes infectieux exceptionnels. D'une part pour limiter les impacts sanitaires et environnementaux mais aussi les contre coups socio-économiques pouvant découler de ce type d'évènement. En cas de défaillance au niveau étatique de certains pays dans ces missions de surveillance, soit par manque de moyens ou de négligence, les institutions internationales telles que la FAO peuvent se substituer dans ce rôle de surveillance et de donneur d'alerte en fournissant aide et assistance aux états concernés.

En Europe le laboratoire de référence de l'Union européenne (EURL) pour les maladies des poissons, financé par la Commission européenne et situé à l'Institut vétérinaire national au Danemark, a pour fonctions l'harmonisation des procédures de diagnostic pour les maladies à déclaration obligatoire des poissons en Europe. Les missions de l'EURL sont décrites dans la directive 2006/88 / CE du Conseil. L'un des principaux objectifs de l'EURL est d'assurer la qualité du diagnostic des maladies des poissons dans les États membres et d'harmoniser les procédures et les méthodologies appliquées pour contrer les épizooties touchant particulièrement les activités liées à la pêche et à l'aquaculture.

L'accent mis sur la gestion de la maladie devrait être la prévention, qui sera probablement plus rentable que la guérison. Cela peut conduire à moins dépendre de l'utilisation de produits chimiques (antimicrobiens, désinfectants et pesticides), qui traitent en grande partie les symptômes du problème et non la cause (Planas et Cunha, 1999). Plusieurs mesures sont essentielles à appliquer aux établissements d'aquaculture. Ces mesures sont décrites ci-après.

2.1. Sélection des sites

La localisation ainsi que son organisation sont deux points primordiaux d'un site aquacole permettant de réduire au minimum le risque d'introduction d'agents pathogènes. En d'autres termes, les élevages devraient de préférence être situés à terre ; ceux qui se trouvent en eau de mer doivent être isolés et se trouver à une distance suffisante des autres élevages ou salles d'abattage pour éviter la propagation des agents infectieux par l'eau. (Jarp et Karlsen, 1997), ont révélé dans une étude épidémiologique sur l'anémie infectieuse des salmonidés (AIS) que le risque de contamination par un élevage voisin double si celui-ci se trouve à moins de 5

km. De même, les élevages situés dans des eaux de surface peuvent aussi être exposés à un risque plus élevé de foyer que ceux qui se trouvent dans des zones côtières plus ouvertes. Il est aussi utile de disposer de sites complémentaires pour pouvoir séparer les classes d'âge et comptabiliser les entrées et les sorties.

2.2. Traitement de l'eau

L'eau approvisionnant les écloseries marines et les établissements d'aquaculture situés à terre devrait cependant être désinfectée avant utilisation, afin d'éviter toute contamination. Cependant, la désinfection de l'eau utilisée ainsi que des eaux usées dans les écloseries est un moyen efficace de prévention des maladies. Les technologies utilisées tels que le chauffage, l'ozonation, la chloration et l'irradiation par les UV doivent assurer une optimisation de certains facteurs tels que l'oxygénation, l'élimination des gaz nocifs dissous dans l'eau, le contrôle de la température et la désinfection ([Torgersen et Håstein, 1995](#)).

2.3. Aquaculture

En plus du choix de site et la qualité de l'eau, il existe d'autres facteurs pour réduire les facteurs pathogènes. Ces facteurs sont liés aux conditions proprement dites d'élevage aquacole. Il est important de respecter la densité optimale des poissons afin d'éviter le stress dû à la surpopulation. De même, il est également à désinfecter des œufs avant leur introduction dans les écloseries de séparer les classes d'âge avec dénombrement des entrées et des sorties et de réduire les manipulations des poissons ([Bergh et Jelmert, 1996](#) ; [Salvesen et Vadstein., 1995](#))

De plus, l'application d'un programme systématique de contrôle sanitaire permet aussi d'empêcher l'apparition de foyers de maladies graves et d'éviter le transfert accidentel d'une maladie d'un élevage à l'autre, la contamination des populations sauvages ou vice versa ([Carey et Pritchard, 1995](#)). À cet égard, il est aussi nécessaire de connaître l'état sanitaire de ces populations car des individus sauvages sont souvent introduits dans les élevages de poissons marins ([Slettan, 1995](#)). Il est donc essentiel que soit mis en place un programme de contrôle sanitaire efficace comportant des inspections professionnelles régulières et des étapes de diagnostic, de même qu'une régionalisation et une restriction des transferts de poissons.

2.4. Vaccination

Dans l'aquaculture la vaccination est largement employée pour protéger les poissons contre les différentes maladies bactériennes (Newman et Deupree, 1995). L'utilisation correcte de vaccins efficaces est l'un des outils essentiels de la lutte organisée contre les maladies infectieuses graves dans les espèces de poissons. L'un des gros avantages de la vaccination contre les maladies bactériennes courantes est la diminution de l'utilisation des produits antimicrobiens (Grave *et al.*, 1996 ; Lund *et al.*, 1992). Cependant, les vaccins destinés aux poissons doivent être reconnus comme des produits biologiques et devraient être approuvés par les autorités compétentes du pays concerné. Plusieurs aspects doivent cependant être pris en considération à cet égard (Håstein, 1988 ; Lillehaug, 1996 ; Rødseth et Knapskog, 1996). La maladie contre laquelle il faut vacciner, la méthode de vaccination (immersion, bain, injection), le moment de la vaccination et ses modalités (vaccination unique/revaccination/température).

2.5. Traitements médicamenteux

Afin de maîtriser les foyers des maladies, Il est parfois nécessaire de recourir à des traitements médicamenteux pour lesquels il n'existe pas encore de vaccin. Plusieurs médicaments peuvent être utilisés à cette fin (Austin, 1988 ; Håstein, 1994). Parmi ces médicaments ; les antibiotiques qui constituent le traitement de première ligne contre les infections bactériennes et jouent donc un rôle essentiel dans la médecine moderne (Davies *et al.*, 2013).

Les antibiotiques tels l'oxytétracycline (OTC) et l'acide oxolinique (OA) sont les plus utilisés dans l'aquaculture méditerranéenne des aliments pour animaux (Rigos et Troisi, 2005). Cependant, l'utilisation de molécules antimicrobiennes en aquaculture est régie par une variété de facteurs incluant la législation et la réglementation en vigueur, le pathogène considérés (et le profil d'antibiorésistance), le moment du traitement, l'état pathologique de l'hôte et les paramètres environnementaux (salinité, température, photopériode, etc.). Les données sur les quantités d'antibiotiques utilisées en aquaculture sont rares, car peu de pays contrôlent la quantité d'antibiotiques utilisés (Smith *et al.*, 2007). En général, l'utilisation des antibiotiques en aquaculture dépend des réglementations locales, qui varient considérablement. Dans certains pays (en particulier en Europe, en Amérique du Nord et au Japon), les réglementations sur l'utilisation des antibiotiques sont strictes et quelques antibiotiques sont homologués pour l'aquaculture

En Europe, par exemple, la pratique de l'antibiothérapie prophylactique non thérapeutique a été interdite en 2001 par la directive de l'UE sur les médicaments vétérinaires, telle que modifiée et codifiée dans la directive 2001/82 / CE [10,11,12]. En Norvège, une surveillance réglementaire plus stricte de l'utilisation des antimicrobiens, conjuguée à des vaccinations accrues et à une excellente gestion, explique en partie une baisse de 99% de l'utilisation des antimicrobiens entre 1987 et 2013, malgré une production aquacole multipliée par plus de 20 (O'Neill, 2015). Cependant, 90% de la production aquacole mondiale est pratiquée dans les pays en développement, dépourvue de réglementation claire sur l'utilisation des antibiotiques dans ce domaine (Chuah et al., 2016), ce qui entraîne une grande variabilité dans l'utilisation des antibiotiques. Cependant, l'augmentation des souches résistantes, voire multirésistantes, est une source de préoccupation majeure. Les bactéries peuvent acquérir des résistances aux antibiotiques soit par mutation, soit plus probablement par transfert de gène horizontal dans l'environnement, par transformation naturelle, transduction ou conjugaison (Aminov, 2011 ; Taylor et al., 2011). De plus les traitements antibiotiques se caractérisent par une action non spécifique touchant tout aussi bien les microorganismes pathogènes que les microorganismes bénéfiques, sans oublier la persistance de ces molécules dans les tissus et leur possible accumulation chez le consommateur final.

Les systèmes aquacoles et les fermes ont été désignés comme « réacteurs génétiques » ou « points chauds pour les gènes de résistance » où un échange génétique important et une recombinaison peuvent se produire, ce qui peut façonner l'évolution des futurs profils de résistance (Muziasariet al., 2016). Il a été estimé que 90% des bactéries provenant de l'eau de mer sont résistantes à un ou plusieurs antibiotiques et jusqu'à 20% des bactéries sont résistantes à au moins cinq antibiotiques (Martinez, 2003). L'utilisation prolongée d'antibiotiques en aquaculture augmente la pression sélective sur les populations bactériennes, même à des concentrations d'antibiotiques inférieures à la concentration minimale inhibitrice de la population sauvage sensible (Gullberg et al., 2011). Étant donné que les antibiotiques sont relativement stables et peu biodégradables, des quantités résiduelles d'antibiotiques peuvent demeurer dans le poisson et les mollusques et crustacés commercialisés pour la consommation (Santos et al., 2016).

2.6. Probiotiques comme stratégies alternatives aux antibiotiques

Les problèmes croissants associés aux maladies infectieuses chez les poissons, l'utilisation fréquente de médicaments pour le traitement et la prévention de ces maladies et

l'augmentation rapide de la résistance à ces antibiotiques représentent des défis majeurs pour cette source de production alimentaire dans le monde entier (Bourouni et al., 2012).

De ce fait, l'utilisation des bactéries probiotiques se présente comme une alternative majeure pour le contrôle des agents pathogènes potentiels (Gomez-Gil et al., 2000). Ainsi, remplacer les médicaments par des probiotiques efficaces et peu coûteux était devenu de plus en plus évident et nécessaire pour éviter la résistance dans les sites de pisciculture et les résidus d'antibiotiques dans la chair de poisson destinée à la consommation humaine (Balcàzar et al., 2006 ; Rengpipat et al., 2008). De plus, ils sont devenu l'objet de recherches intensives dans l'union européenne, le Japon et les États-Unis (Panigrahi et Azad, 2007).

Les probiotiques sont définis comme étant des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels (FAO / OMS, 2001). Ces microorganismes colonisent donc l'appareil gastro-intestinal de l'hôte et s'y installent en améliorant ainsi l'équilibre microbien intestinal et l'état de santé général du poisson (Gatesoupe, 1999). Sur la base de leurs mécanismes d'action, les probiotiques peuvent créer un environnement hostile pour les agents pathogènes par la production des antimicrobiens et l'inhibition de l'expression des gènes de virulence. Cependant, les effets antimicrobiens des probiotiques sont liés à la production d'antibiotiques, bactériocines, acides gras, peroxyde d'hydrogène, enzymes lytiques ou acides organiques.

En milieu aquatique, Verschuere et al. (2000) ont défini un probiotique comme « un complément microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte en modifiant la communauté microbienne associée à l'hôte, en améliorant l'utilisation de l'aliment ou en améliorant sa valeur nutritionnelle, en améliorant la réponse de l'hôte à la maladie ou en améliorant la qualité de son environnement ambiant ». De ce fait, l'utilisation des probiotiques, en aquaculture industrielle, s'est imposée comme nécessaire. Ainsi Yasuda et Taga, (1980), suggèrent que les bactéries probiotiques soient utilisées non seulement comme aliment mais aussi comme des agents biologiques régulateurs de l'état sanitaire des poissons. Leur incorporation dans la formulation des régimes alimentaires destinés aux poissons aux différents stades larvaires, afin de réduire les affections tout en limitant au minimum les coûts, fût alors envisagée à grande échelle (Ganguly et Prasad, 2012).

Les microorganismes probiotiques (Tableau 3) ciblés actuellement, pour une utilisation comme agents de lutte biologique en aquaculture sont les bactéries lactiques (*Lactobacillus* et *Carnobacterium*), bien que d'autres genres ou espèces aient également été étudiés, appartenant au genre *Vibrio*, au genre *Bacillus* ou au genre *Pseudomonas*, et aussi *Aeromonas* et *Flavobacterium* (Pérez-Sánchez et al., 2014).

En pratique, l'utilisation de bactéries lactiques est due au fait que ces bactéries produisent souvent les bactériocines ; peptides antimicrobiens synthétisés par des ribosomes et d'autres composés chimiques qui peuvent empêcher la croissance des bactéries pathogènes et renforcer l'immunité des poissons (Gildberg et al., 1997 ; Carnevalli et al., 2004).

Plusieurs bactéries ont été employées comme probiotiques dans les élevages larvaires de plusieurs animaux aquatiques. Celles-ci pouvant être directement additionné dans l'eau, ou par l'intermédiaire de vecteurs vivants tels que des larves d'*Artemia* (nauplii) et/ou des rotifères, ou bien encore ajoutées directement à l'alimentation sèche granulée (Gomez-Gil et al., 2000). Par conséquent, l'utilisation des probiotiques est actuellement de plus en plus en vogue pour parer l'effet des infections bactériennes mais également virales et fongiques en aquaculture industrielle.

Outre les bactéries lactiques, d'autres espèces telles les bactéries appartenant au genre *Bacillus* sont décrites comme ayant un bon potentiel pour un usage probiotique notamment dans l'industrie aquacole. *Bacillus* est un genre bactérien important constitué d'un groupe hétérogène d'organismes aérobies ou anaérobies facultatifs, comprenant au moins 172 espèces, formant des endospores, Gram positif, en forme de bâtonnet (Liu et al., 2013).

B. pumilus est fréquemment isolée des milieux marins (Ettoumi et al., 2009 ; Miranda et al., 2008) et a montré sa capacité à produire des substances ayant une activité antibactérienne, y compris le premier antibiotique pumilin (Bhate, 1955). Plus récemment la souche *B. pumilus* SBUG 1800 a été identifié pour produire des 2,5-dicétopipérazines (DKP), un certain nombre de pumilacidines et d'enzymes bactériolytiques différentes (Brack et al., 2015). Une autre bactérie marine appelée *B. pumilus* KMM 1364 produit quant à elle un mélange de lipopeptidiques analogues de la surfactine (Kalinovskaya et al., 2002). En termes de bactériocines, *B. pumilus* WAPB4 produit de la pumilicine 4, bactéricide à la fois pour le staphylocoque doré et les entérocoques résistants à la vancomycine (Aunpad et Na-Bangchang, 2007).

Tableau 3. Les probiotiques utilisés en aquaculture et l'effet sur leurs hôtes (Pérez-Sánchez et al., 2014)

Espèces hôtes	Potentiel probiotique	Effet sur l'hôte	Les références
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136	Altération dans les profils sanguins	(Panigrahi et al., 2010)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Aeromonas sobria</i> GC2 <i>bacillus subtilis</i> JB-1	Résistance accrue à <i>Yersinia ruckeri</i>	(Abbass et al., 2010)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Enterobacter sp.C6-6 et C6-8	Résistance accrue à <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	(Burbank et al., 2011)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> CLFP3, <i>Lactococcus lactis</i> CLFP 25 <i>leuconostoc mesenteroides</i> CLFP 68	Expression de gènes de cytokines et résistance accrue à <i>Lactococcus garvieae</i>	(Perez-Sanchez et al., 2011b)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Pseudomonas</i> sp.MSB1	Inhibition of <i>Lavobacterium psychrophilum</i> in vitro	(Strom-Bestor and Wiklund, 2011)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Stimulation immunitaire, améliorer la croissance et Résistance accrue à <i>Yersinia ruckeri</i>	(Tukmechi et al., 2011)
Truite arc-en-ciel (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Performance de croissance accrue une stimulation immunitaire	(Sheikhzadeh et al., 2012)
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	protection contre la vibriose	(Lara-Flores et al., 2003)

Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Pediococcus acidilactici</i> CNCM MA 18/5 M	Modulation des communautés bactériennes intestinales et stimulation de la réponse immunitaire non spécifique	((Ferguson et <i>al.</i> , 2010)
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Bacillus</i> sp. C5118	Inhibition de la croissance des espèces <i>Aeromonas</i> et <i>Pseudomonas</i> dans l'intestin des poissons	(Del'Duca et <i>al.</i> , 2013)
Tilapia du Nil (<i>Oreochromis niloticus</i>)	<i>Aeromonas</i> , <i>Pseudomonas</i>	Production élevée d'amylase	(Sugita et <i>al.</i> , 1996)
Cardeau hirame (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Lactobacil</i> et <i>sporolac</i> (produits commerciaux)	Stimulation immunitaire et résistance accrue à l'infection par le virus de la maladie Lymphocystis	(Harikrishnan et <i>al.</i> , 2010)
Cardeau hirame (<i>Paralichthys olivaceus</i>)	<i>Zooshikella</i> sp.JE-34	Stimulation immunitaire et résistance accrue à <i>Streptococcus iniae</i>	(Kim et <i>al.</i> , 2010)
Coquille st-jacques (<i>Pecten maximus</i>)	<i>Alteromonas haloplanktis</i>	résistance accrue à <i>Vibrio anguillarum</i>	(Riquelme et <i>al.</i> , 1996)
Coquille st-jacques (<i>Pecten maximus</i>)	<i>Roseobacter</i> BS107	Amélioration de la survie larvaire	(Ruiz-Ponte et <i>al.</i> , 1999)
Crevette (<i>Penaeus latissulcatus</i>)	<i>Pseudomonas synxantha</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	résistance accrue à <i>Vibrio harveyi</i>	(Hai et <i>al.</i> , 2009)
Crevette géante tigrée (<i>Penaeus monodon</i>)	<i>Bacillus</i>	résistance accrue à la luminescence des espèces <i>Vibrio</i>	(Moriarty, 1998)

Crevette géante tigrée (<i>Penaeus monodon</i>)	<i>Bacillus</i> S11	Stimulation immunitaire et résistance accrue <i>Vibrio harveyi</i>	(Rengpipat et <i>al.</i> , 2000)
Perche commune (<i>Perca fluviatilis</i>)	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> JF3835	Colonisation intestinal et résistance accrue à <i>Aeromonas sobria</i>	(Gobeli et <i>al.</i> , 2009)
Truite commune européenne (<i>Salmo trutta</i>)	<i>Lactococcus lactis</i> CLFP 100 <i>leuconostoc mesenteroides</i> CLFP 196	Stimulation immunitaire et résistance accrue à <i>Aeromonas salmonicida</i>	(Balc_azar et <i>al.</i> , 2007b)
Ombre chevalier (<i>Salvelinus alpinus</i>)	<i>Agrobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Staphylococcus</i>	Contribution au processus nutritionnel	(Ring et <i>al.</i> , 1995)
Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ou <i>sp.carnobacterium</i>	Protection contre la vibriose	(Gatesoupe, 1994)
Silure glane (<i>Silurus glanis</i>)	<i>Enterococcus faecium</i>	Croissance améliorée et réduction de l'incidence d' <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>sp.</i> <i>Clostridium</i>	(Bogut et <i>al.</i> , 2000)
Daurade royale (<i>sparus aurata</i>)	<i>Lactobacillus fructivorans</i>	Diminution de la mortalité des larves et des alevins	(Carnevali et <i>al.</i> , 2004)
Daurade royale (<i>sparus aurata</i>)	<i>Bacillus subtilis</i> CECT 35	Expressions des différents gènes impliqués dans le développement de l'inflammation et les processus de digestion	(Cerezuela et <i>al.</i> , 2013)

En plus de la production de composés antimicrobiens, les intérêts pour les bacilles augmentent en tant que probiotiques potentiels pour l'aquaculture. L'accumulation de données scientifiques prônait les allégations probiotiques de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* (Nayak, 2010 ; Olmos et Paniagua-Michel, 2014 ; Sreenivasulus et al., 2016). De nombreuses souches de *B. pumilus* ont été décrites pour caractères bénéfiques et leur utilisation possible en aquaculture, en tant que probiotique, pour contrôler les maladies bactériennes et diminuer l'utilisation d'antibiotiques (Prieto et al., 2014, Sreenivasulu et al., 2016).

Chapitre III. Métaux Traces
Dans Les Organismes
Aquatiques

1. Éléments Traces Métalliques (ETMs)

La pollution d'origine métallique constitue un des risques majeurs dans le monde actuel. C'est un problème d'actualité qui préoccupe toutes les autorités publiques. Souvent, désignés sous le nom des « métaux à l'état de traces » ou par extension « éléments traces », les métaux lourds sont des éléments chimiques naturels caractérisés par une masse volumique élevée supérieure à 5g.cm^{-3} . Ils sont présents dans les milieux à faibles doses (du ng. L^{-1} au $\mu\text{g. L}^{-1}$) et sont souvent réputés être toxiques (Rollin et Quiot, 2006).

Les éléments traces, au nombre de 68, ne représentent en masse que 0,6 % du total de la croûte terrestre et sont présents à des concentrations inférieures à 10^{-6} M dans l'eau de mer (Miquel, 2001 ; Neff, 2002). De nombreux ETMs sont essentiels à la vie (Bowen., 1979 ; Harrison et Hoare, 1980). Parmi ceux-ci, le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le vanadium (V) et le zinc (Zn). Les métaux lourds non essentiels comprennent habituellement le cadmium (Cd), le plomb (Pb) et le mercure (Hg).

Les ETMs sont naturellement présents dans la croûte terrestre et sont dispersés dans l'environnement suite à l'érosion des roches et aux retombées atmosphériques lors de feux de forêt ou d'éruptions volcaniques (Brignon et al., 2005). Toutefois, la présence de métaux dans les milieux aquatiques est globalement attribuable aux activités humaines telles que l'industrialisation, l'urbanisation et les pratiques agricoles.

Contrairement aux polluants organiques qui peuvent être dégradés en composants moins nocifs par des processus biologiques ou chimiques, les ETMs sont considérés comme des polluants non dégradables qui exercent par conséquent une pression chronique et diffuse sur les écosystèmes aquatiques (Thévenot et al., 2009). Dans cette étude, trois métaux sont étudiés en particulier : le Cu, le Ni et le Cd.

1.1. Cuivre

1.1.1. Sources naturelles et propriétés

Le Cu est présent dans l'environnement de manière ubiquiste. Sa concentration dans l'écorce terrestre est estimée à environ 70 mg.kg^{-1} . Le Cu est l'un des rares métaux à se trouver naturellement dans la nature. Il se présente dans des minerais sous forme de sels contenant 30

à 90% de Cu. Les minerais les plus importants sont la chalcoppyrite (minerai sulfuré), l'azurite bleue et la malachite verte (minerai carbonaté).

Métal de couleur rougeâtre, le Cu est malléable et ductile. Il possède une très grande conductivité électrique et thermique. Il présente une certaine résistance à l'air, à l'eau et à la corrosion. Le Cu présente aussi des propriétés antisalissures. Ses propriétés en font un matériau très utilisé dans l'industrie électrique (câbles) et thermique (tuyaux). Il sert aussi à la fabrication d'ustensiles de cuisine (chaudrons, casseroles). En métallurgie, il entre dans de nombreux alliages comme le laiton (Cu et Zn), le bronze (Cu et étain), le maillechort (Cu, Ni et Zn). En agriculture, le Cu sous forme de sels de Cu (sulfate, acétate, dérivés organiques) est utilisé comme fongicides ou algicides (Monbet et Coquery, 2013).

Le Cu est un métal essentiel, car il est indispensable au métabolisme des êtres vivants (Clemens, 2001 ; Atli et Canli, 2011 ; Tercier Waeber et al., 2012). Il est impliqué dans la formation d'hémoglobine et la maturation des polynucléaires neutrophiles et est un cofacteur spécifique de nombreuses enzymes et métalloprotéines de structure intervenant dans le métabolisme oxydatif, la respiration cellulaire, la pigmentation... (OMS-IPCS, 1998). De plus, chez les mollusques, le sang renferme un pigment respiratoire à base de cuivre, l'hémocyanine.

1.1.2. Sources anthropiques et niveau de contamination

Le Cu présent dans les écosystèmes côtiers, provient essentiellement du rejet des eaux usées urbaines et industrielles (métallurgie, chimie) et du lessivage des sols agricoles. Cependant, c'est un ingrédient commun dans les peintures des coques de navire qui sont appliquées sur les navires de surfaces et dans l'ingénierie offshore (Kennish, 1997). En dehors des pollutions industrielles ou de traitements agricoles, ce métal provient habituellement de la corrosion des tuyauteries de distribution.

Dans les milieux aquatiques, la concentration moyenne mondiale en Cu a été estimée entre 1 et 5 $\mu\text{g. L}^{-1}$ (Martin et Windom, 1991). Selon la base de données « Foregs Geochemical Atlas », les concentrations dissoutes en Cu mesurées dans les eaux de mer en Europe varient entre 0,08 et 15 $\mu\text{g. L}^{-1}$ pour une médiane estimée à 0,88 $\mu\text{g. L}^{-1}$. En France, une gamme de concentration similaire a été rapportée sur le bassin de la Seine (0,3 à 12,6 $\mu\text{g. L}^{-1}$) - (Lebrun

et *al.*, 2014). Des concentrations supérieures à 16 $\mu\text{g. L}^{-1}$ de Cu ont été enregistrées dans le bassin Ardières-Morcille, connu pour ses activités viticoles (Montuelle et *al.*, 2010).

1.2. Nickel

1.2.1. Sources naturelles et propriétés

Le Ni est un oligo-élément qui représente 0,8 à 0,9 % de la croûte terrestre. Dans l'environnement, le Ni est présent à des concentrations très faibles. Le Ni est un métal ductile et malléable de couleur blanche ou argentée. Il possède une bonne résistance à l'oxydation et à la corrosion et est ferromagnétique. Il entre dans de nombreux alliages ; les alliages Fe-Ni (écrans cathodiques, cryogénie, etc.), les alliages Cu-Ni (résistance à la corrosion en milieu marin) et les superalliages (turboréacteurs, chaudières, moteurs d'avion). Il est ajouté à l'or pour obtenir des teintes particulières (or jaune, or rosé, or blanc).

Physiologiquement, des traces de Ni sont essentielles pour les fonctions de croissance et de reproduction des animaux, ce qui indique que le Ni peut être considéré comme un oligo-élément essentiel (Woo et *al.*, 2009).

1.2.2. Sources anthropiques et niveau de contamination

La contamination des milieux aquatiques en Ni provient principalement des activités minières, du raffinage et de la combustion d'énergie fossile (Chau et Kulikovsky-Cordeiro, 1995 ; Eisler, 1998 ; Mukherjee, 1998). Le Ni entre également dans la composition de piles en Ni-Cd, tout comme dans de nombreux matériaux de construction et peut rejoindre les milieux aquatiques lors du ruissèlement des eaux pluviales.

En Europe, les concentrations dissoutes de Ni peuvent varier de 0,03 à 24 $\mu\text{g. L}^{-1}$ pour une médiane de 1,91 $\mu\text{g. L}^{-1}$. En France, les valeurs maximums ont été enregistrées en Bretagne (environ 7 à 8 $\mu\text{g. L}^{-1}$) (Foregs Geochemical Atlas). Les valeurs peuvent atteindre 2 000 $\mu\text{g. L}^{-1}$ dans les eaux polluées près des sites industriels, comme c'est le cas des rivières de l'Ontario au Canada (Chau et Kulikovsky-Cordeiro, 1995 ; Eisler, 1998).

1.3. Le cadmium

1.3.1. Sources naturelles et propriétés

Le Cd est naturellement présent à l'état de traces dans les roches superficielles de l'écorce terrestre. Il est principalement associé au Zn dans les minerais de Zn. Le Cd est également présent dans des minerais de Pb et de Cu ainsi que dans des phosphates naturels.

A l'exception de son rôle biologique découvert par Price et Morrel (1990), dans des conditions de limitation du Zn, le Cd favorise la croissance de la diatomée dans les diatomées marines *Thalassiosira weissflogii* (Price et Morel, 1990 ; Lee et al., 1995). Le Cd n'a aucun rôle biologique en raison de sa haute toxicité même à des concentrations très faibles. C'est un métal non essentiel pour les organismes (Cullen et al., 1999, Lane et al., 2005).

1.3.2. Sources anthropiques et niveau de cadmium

L'apport de Cd aux milieux côtiers provient en partie du compartiment atmosphérique (fumées et poussières des fonderies, des produits de l'incinération des matériaux recouverts de Cd) et provient d'autre part des lessivages des terrains agricoles renfermant des engrais.

Les concentrations en Cd dans les milieux aquatiques sont généralement très faibles (concentrations de l'ordre du ng. L⁻¹). La concentration de Cd dans l'eau de mer peut varier de 0,1 à 10 ng. L⁻¹ dans les eaux libres et de 10 à 60 ng. L⁻¹ dans les eaux côtières (Kennish, 1997). En Europe, les concentrations en Cd dans les milieux aquatiques sont généralement très faibles entre 0,002 et 0,010 µg. L⁻¹. Toutefois, en France, des concentrations dissoutes les plus élevées sont recensées dans la région de Bretagne (entre 0,100 et 0,119 µg. L⁻¹) (Foregs Geochemical Atlas).

2. Bioaccumulation des métaux

La présence des ETMs dans les milieux aquatiques induit des effets dévastateurs sur l'équilibre écologique de l'environnement aquatique (Katemo Manda et al., 2010). Les milieux aquatiques sont très sensibles aux éléments traces métalliques par la coexistence des phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification. En effet, la bioaccumulation est souvent un bon indicateur de l'exposition chimique des organismes dans les écosystèmes pollués (Phillips et Rainbow., 1994).

2.1. Définitions

Par définition la **bioaccumulation** désigne la capacité des organismes à absorber et concentrer certaines substances chimiques, éventuellement rares dans l'environnement (oligoéléments utiles ou indispensables ou toxiques indésirables). Selon [Ramade \(1992\)](#), c'est le processus par lequel un organisme vivant absorbe une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise.

Par ailleurs, [Ribeyre et Boudou \(1989\)](#) définissent la bioaccumulation comme étant le résultat des processus par lesquels le contaminant entre dans l'organisme et des processus de décontamination, une combinaison des mécanismes d'excrétion vers l'environnement et de biotransformation endogène.

La bioconcentration, aussi appelée la bioaccumulation par l'individu, est définie comme le processus par lequel la concentration en contaminant dans un organisme vivant est supérieure à celle de leur biotope ([Ogindo, 2001 ; Tabinda et al., 2010](#)). Ce processus d'accumulation s'exprime par une constante issue du rapport entre la concentration d'un composé étudié dans le biotope et la concentration dans l'organisme. Cette constante porte le nom de **facteur de bioconcentration** (FBC). Le FBC peut être défini comme le rapport de la concentration d'un élément dans un organisme en état d'équilibre à sa concentration dans le biotope ([Veith et al., 1979 ; Ramade, 1992](#)).

La bioamplification ou **biomagnification**, connue par la bioaccumulation entre individus, désigne le processus selon lequel la concentration d'un contaminant dans un biotope a tendance à augmenter le long d'une chaîne alimentaire.

Les deux voies principales par lesquelles les éléments métaux traces sont accumulés dans les organismes aquatiques sont la voie dissoute (le métal en solution dans l'eau) et la voie trophique (ingestion de nourriture contaminée). Dans les deux cas, la pénétration des métaux nécessite de franchir les structures biologiques spécifiques comme le revêtement extérieur et surtout l'épithélium branchial pour les contaminants présents dans l'eau et l'ensemble du tractus digestif pour les métaux associés aux particules ou contenus dans les proies ingérées ([Urien, 2015](#)).

2.2. Voie dissoute et le modèle de l'ion libre

Nous ne décrivons ici que la voie dissoute de pénétration des métaux dans les organismes de par les objectifs de notre travail.

Chez les organismes aquatiques, le transport des métaux en solution vers l'intérieur se fait principalement par les branchies (Verbost et al., 1989). L'assimilation du métal est fonction de sa concentration sous forme ionique libre la plus disponible (Kushner, 1993 ; Campbell, 1995). Cependant, la forte corrélation observée entre les effets biologiques et la concentration de métal libre (Morel, 1983) a conduit aux deux modèles suivants : le modèle de l'ion libre (FIAM ; de l'anglais *Free Ion Activity Model*) et le modèle du ligand biotique (BLM ; de l'anglais *Biotic Ligand Model*) (Di Toro et al., 2001).

Ainsi, la membrane plasmique est la barrière primaire engagée dans ce processus (Luoma, 1983) car elle constitue l'interface entre l'environnement et l'organisme. Elle est composée des transporteurs protéiques et des canaux ioniques engagés dans le transport d'ions à travers la membrane (Campbell, 1995) auxquelles s'ajoutent occasionnellement la diffusion passive qui ne nécessitent pas d'énergie (cas des complexes hydrophobes comme le Hg et le transport accidentel via des canaux insuffisamment sélectifs - cas des complexes M-histidine par exemple). L'endocytose, quant à elle, est majoritairement observée dans les membranes intestinales et est donc relative à l'accumulation des ETMs par voie trophique (Luoma et al., 2008 ; Simkiss et Taylor, 1995).

D'après Campbell, 1995, le modèle conceptuel de l'interaction métal-organisme, schématisé dans la

Figure 14, est composé de quatre étapes : 1) diffusion du métal de la solution vers la surface biologique (couche de diffusion), 2) diffusion du métal à travers la couche protectrice (mucus), 3) complexation du métal à des sites complexant de la membrane cellulaire, (4) prise en charge du métal, i.e. internalisation.

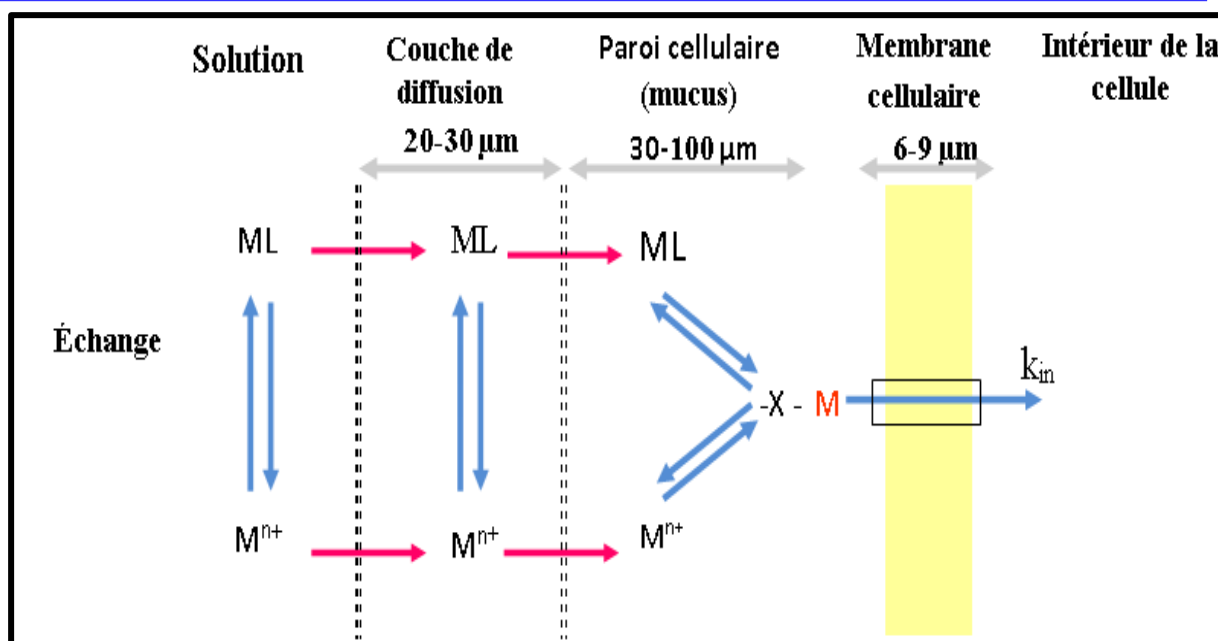


Figure 14 . Modèle conceptuel de l'interaction Métal-Organisme (modifié d'après [Campbell, 1995](#)).

3. Effet des Métaux traces sur les organismes aquatiques

Les métaux sont des constituants normaux de l'environnement à l'état de traces ([Bryan, 1984](#)). Ils peuvent tous, que ce soit des ETMs dits essentiels ou des métaux dits non essentiels, produire des effets toxiques au-dessus d'un certain seuil ([Kucuksezgin, 2006](#) ; [Chiffoleau et al., 2003](#) ; [Miquel, 2001](#) ; [Turkmen et al., 2005](#) ; [Lafabrie et al., 2007](#)). En effet, ils peuvent être très dangereux pour la santé de l'Homme et pour les autres êtres vivants ([Fakayode, 2005](#)).

3.1. Effet du cuivre

Le Cu est un élément essentiel au métabolisme des organismes bien qu'il puisse devenir toxique si les concentrations intracellulaires dépassent les besoins de l'organisme et sa capacité de détoxification ([Atli et Canli, 2011](#) ; [Viarengo, 1989](#) ; [Tercier Waeber et al., 2012](#)). Le Cu est à l'origine de perturbations au niveau des espèces dans le milieu marin ([Nakhlé, 2005](#)). La toxicité vis-à-vis des organismes marins dépend de la forme chimique du Cu et de son état d'oxydation. De même le Cu complexé est moins toxique que le Cu à l'état ionique.

Des concentrations élevées de Cu dissous montrent fréquemment des effets toxiques ([Krumschnabel et al., 2005](#)) et peuvent causer des dommages systémiques aux populations d'animaux aquatiques. Cependant, le(s) mode(s) d'action du Cu dissous au niveau des

mécanismes biochimiques est(sont) encore mal compris dans les organismes aquatiques, même si le Cu en représente un des contaminants dominants (Nor, 1987).

3.2. Effet du nickel

Le statut du Ni est plus ambiguë. Il a été montré que le Ni était essentiel pour la croissance des végétaux et de quelques espèces de vertébrés mais les études visant à déterminer son rôle, essentiel ou non, vis-à-vis des animaux aquatiques, ne sont pas concluantes (Chowdhury et al., 2008 ; Eisler, 1998). Au cours de cette dernière décennie, un niveau croissant de contamination de l'environnement en Ni s'est produit avec une exposition concomitante croissante des organismes vivants à ce métal (Muñoz et Cosa, 2012).

Ce métal a induit une néphrotoxicité, une hépatotoxicité et une tératogenèse chez les invertébrés et les vertébrés (DeForest et Schlekot, 2013 ; Vijayavel et al., 2009). L'exposition chronique au Ni est responsable du stress oxydatif, de la perturbation respiratoire et de l'osmorégulation du désordre cellulaire et de la diminution de la viabilité naupliaire (Pane et al., 2003 ; Jiang et al., 2013 ; Blewett et al., 2015). En effet, les expositions d'organismes aquatiques au Ni dissous dans l'eau peuvent contribuer à la production de radicaux libres dans les cellules et à l'appauvrissement de certaines enzymes antioxydantes (catalase, glutathion-S-transférases, catalase, glutathion peroxydases...) - (Denkhaus et Salnikow, 2002 ; Attig et al., 2010 ; 2014 ; Wang et Wang, 2010).

3.3. Effet du cadmium

Le Cd est fortement accumulé par les organismes marins. Son absorption est influencée par la disponibilité de sa forme ionique libre qui est dépendante de la salinité, de la température et du pH (Mubiana et Blust, 2007).

Les niveaux de pollution de l'environnement ont montré des corrélations positives avec les concentrations retrouvées dans des échantillons de tissus. Les concentrations tissulaires étaient souvent positivement corrélées avec la proximité de la source de pollution (Anderson et al., 1978 ; Bagatto et Alikhan, 1987a ; Schmitt et al., 2006 ; Besser et al., 2007).

Il est maintenant clairement démontré qu'e le Cd est un métal hautement néphrotoxiques des organismes vivants (Anderson et al., 1978 ; Eisler, 1985). La toxicité du Cd est attribuée à l'induction du stress oxydatif, au dysfonctionnement de l'homéostasie calcique, à la déplétion

des groupes sulfhydriles cellulaires (Petering., 2017) et à la substitution des métaux essentiels fonctionnels (ex : le Zn) - (Petering, 2017 ; Valko et al., 2016) causant des lésions cytotoxiques (ex. peroxydation lipidique et dommage à l'ADN). Une étude sur le copépode planctonique marin *Centropages ponticus*, a montré qu'une exposition à une concentration de 0,2 µg. L⁻¹ de Cd peut provoquer un stress oxydatif en induisant une peroxydation lipidique qui affecte de manière significative l'activité enzymatique et la synthèse des protéines (Ensibi et Yahia., 2017).

Des travaux étudiant les effets toxiques des ETMs sur les organismes aquatiques ont montré que globalement ces derniers peuvent être observés à différents niveaux biologiques : génétique (génotoxicité), biochimique (ionorégulation, activités enzymatiques...) ou encore physiologique (diminution de la locomotion, prédation, reproduction...). Ils peuvent se traduire *in fine* par la mort des individus avec de possibles répercussions à l'échelle de la population (Urien, 2015). Les effets des trois métaux étudiés dans ce travail sur les organismes aquatiques sont présentés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Études concernant l'impact du Cd, du Ni et du Cu chez les organismes aquatiques. Liste non-exhaustive (Urien., 2015).

Organisme	Espèce	Temps d'exposition et dose	Effet(s)	Références
Cadmium (Cd)				
Amphipode	<i>Gammarus pulex</i>	168 heures, 7.5 et 15 µg/L	↘ Locomotion ↘ Alimentation ↘ Ventilation	(Felten et al., 2008)
	<i>Gammarus fossarum</i>	3 et 7 jours, 15 µg /L	↗ Perturbation de l'osmorégulation	(Issartel et al., 2010)
Bivalve	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	14 jours, 10 µg/L	↗ Génotoxicité ↗ Imminotoxicité ↗ Cytotoxicité	(Rocha et al., 2014)
Poisson	<i>Gambusia affinis</i>	10 jours, 17 µg/L	↘ Reproduction	(Cazan and Klerks, 2015)
Nickel (Ni)				
Gastéropode	<i>Lymnaea stagnalis</i>	21 jours, 1.3 µg/L	↗ Perturbation de l'osmorégulation ↘ Croissance	(Niyogi et al., 2014)
Poisson	<i>Prochilodus lineatus</i>	24 et 96 heures, 25, 50 et 2500 mg/L	↗ Génotoxicité	(Palermo et al., 2015)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	117 heures, 12 µg/L	↘ Capacités respiratoires	(Pane et al., 2003)
Cuivre (Cu)				
Amphipode	<i>Gammarus pulex</i>	5 jours, 0.5 - 100 µg/L	↘ Métabolisme digestif	(Lebrun et al., 2012)
	<i>Gammarus pulex</i>	4 à 24 heures, 25 -1000 µg/L	↗ Perturbation de l'osmorégulation	(Brooks and Lloyd Mills, 2003)
Poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>	30 jours / 50 µg/L et 96h / 0.1, 0.5, 1.0 et 15mg/L	Perturbation de l'osmorégulation	(Atli and Canli, 2011)

MATERIEL & METHODES

1. Description des matrices étudiées

1.1. Eau de mer

Les échantillons d'eau de mer d'un litre sont prélevés dans des flacons en verre stériles à différents endroits. Un prélèvement a été effectué au niveau du canal de la Manche et les autres prélèvements aux niveaux de la station d'expérimentation d'aquaculture du Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG) de Wimereux et de la station d'expérimentation Nausicaa de Boulogne sur mer (Tableau 5).

Tableau 5. Origine, codification et lieu de prélèvement des eaux de mer

Origine d'eau	Codes	Lieu de prélèvement	Traitement
Manche orientale	EMB	Point de pompage	-
Station de Nausicaa	EMNAC	Pilote (cuve de 300	Filtration (élimination des particules en suspension)
	EMNA	à la sortie du système de filtration	Filtration (élimination des particules en suspension)
Station de Wimereux	EMFB	Pilote labo	Filtration biologique (élimination des bactéries)
	EMTR	Reserve de l'eau de mer	-

1.2. Microalgue

La microalgue *Rhodomonas sp* cultivée dans la station marine de Wimereux au Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences (LOG), a été utilisée pour nourrir les deux espèces de copépodes, *E. affinis* et *A. tonsa*. Les cultures sont réalisées dans des ballons de deux litres, remplis d'eau de mer caractérisée par une salinité de 33 et préalablement stérilisée à l'autoclave, et enrichie avec du milieu de Conwy (Annexe 1). Cette culture a été maintenue en laboratoire à 18°C et à une photopériode de 12h lumière : 12h obscurité sous une lumière fluorescente d'une intensité de 2500lux. Un bullage artificiel a été appliqué afin d'assurer une aération modérée.

1.3. Copépodes

Deux espèces de copépodes ont fait l'objet de notre travail ; *A. tonsa* utilisée pour l'analyse microbiologique et *E. affinis* pour la bioaccumulation des métaux traces. Les cultures de ces

copépodes ont été préparées en grand volume dans des cuves en plexiglas de 300L afin de satisfaire tous les besoins de nos expérimentations en matériel biologique.

1.3.1. *Eurytemora affinis*

E. affinis a été isolé de l'estuaire de la Seine en septembre 2014, est également cultivé dans la station marine de Wimereux et a été acclimatée aux conditions de laboratoire selon le protocole décrit par [Souissi et al. \(2016\)](#). *E. affinis* est cultivé dans une cuve en plexiglas transparent de 300 litres remplie de l'eau de mer filtrée plusieurs fois à travers une membrane de 1µm de porosité et de salinité de $15 \pm 0,01$ psu ajustée avec de l'eau distillée.

La culture est effectuée à une température constante de 18°C, sous une aération modérée et une photopériode de 12h d'obscurité /12h de lumière sous éclairage fluorescent d'une intensité de 2500lux. Les copépodes sont nourris tous les deux jours avec la micro-algue *Rhodomonas sp* en phase de croissance selon la méthode décrite dans [\(Arias et al., 2016a\)](#). En effet, les micro-algues collectées sont filtrées à travers un tamis d'une porosité de 33µm. Ensuite, une centrifugation de 50mL de filtrat est réalisée à 4000g pendant 5minutes à une température de 18°C. Le culot récupéré est solubilisé dans de l'eau de mer de salinité 15psu et rajouté à la culture des copépodes.

1.3.2. *Acartia tonsa*

A. tonsa a été obtenue auprès de l'Université de Roskilde. Cette espèce de copépode est cultivée à la station marine de Wimereux pendant plusieurs générations dans les mêmes conditions qu'*E. affinis*. La culture mère est réalisée dans des bonbonnes en polycarbonate de 20 litres. Les copépodes sont nourris tous les deux jours avec l'algue *Rhodomonas sp*.

1.4. Œufs d'*Acartia tonsa*

Les œufs d'*A. tonsa* sont recueillis selon le protocole décrit par [\(Pan et al., 2015\)](#). La culture mère (décrite dans le paragraphe 1.3.2) est filtrée à travers un tamis d'une porosité de 120 µm. Les adultes récupérés sont transférés dans une nouvelle culture de 20litres afin d'obtenir des œufs fraîchement pondus. Les œufs de copépodes sont siphonnés à travers des mailles de 70 et 120µm. Environ 15000 œufs, lavés trois fois avec de l'eau de mer stérile, sont placés dans des tubes de couleur brune de 15ml. Ces derniers sont remplis d'eau de mer diluée stérile (salinité 15psu) et conservés au réfrigérateur à 4°C.

2. Bioaccumulation des métaux traces chez les copépodes

2.1. Préparation des solutions métalliques

Les trois métaux testés dans cette étude sont le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le nickel (Ni). En effet, les solutions de métaux traces utilisées sont préparées au sein du laboratoire LASIR (UMR 8516 LASIR) à partir de sels correspondants (CuCl_2 , $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CdCl_2) qui proviennent de chez Merck (pureté de 99.9%). Les solutions de métaux utilisées dans les expériences d'exposition sont préparées aux concentrations voulues à partir de solutions mères de métaux de 1g.L^{-1} dans de l'eau de mer de culture filtrée. La préparation des solutions métalliques est réalisée dans le respect des mesures d'hygiène et de non contamination nécessaires.

2.2. Détermination des concentrations létales du Cd, Ni et Cu

Les concentrations létales (CL_{50}) sont déterminées selon le protocole utilisé par (Kadiene et al., 2017) à partir de concentrations croissantes de Cd (0, 40, 80, 150, 220 et $360\mu\text{g.L}^{-1}$), de Ni (0, 50, 150, 250, 350 et $500\mu\text{g.L}^{-1}$) et de Cu (0, 15, 20, 40, 220 et $400\mu\text{g.L}^{-1}$). Les expérimentations sont réalisées sur trois groupes de mâles et de femelles d'*E. affinis* de 25 adultes chacun. Les mâles sont distingués des femelles par stéréo-microscopie (stéréo-microscope SZX9 Olympus, Tokyo, Japon) en utilisant une illumination adéquate. Les caractéristiques de l'eau de mer utilisée dans les expériences sont : oxygène dissous $8 \pm 1\text{mg.L}^{-1}$, température $18 \pm 2^\circ\text{C}$, pH $8,4 \pm 0,2$ et salinité 15psu. Les groupes d'individus sont placés dans une chambre climatique (MLR 351, Sanyo, Tokyo, Japon) pendant 96h à $18 \pm 2^\circ\text{C}$ et sous une photopériode de 12h de lumière/12h d'obscurité. La viabilité des copépodes est observée toutes les 24h et les valeurs de CL_{50} sont calculées en utilisant l'analyse probit (Tlili et al., 2016). Dans le cadre de cette thèse ces données ont été obtenues par une stagiaire Master 2 (Capucine Bilais) qui a travaillé sous la responsabilité de S. Souissi.

2.3. Accumulation des métaux traces dans les copépodes *E. affinis*

2.3.1. Exposition d'*E. affinis* aux métaux

Les copépodes d'*E. affinis* sont exposés, pendant 144h et sans alimentation, à des concentrations sublétales de métaux traces seuls ou en mélange (mixture) des trois métaux. Les concentrations choisies sont inférieures ou égales à un tiers ($1/3$) de la CL_{50} de chaque métal. Elles sont de l'ordre de $32\mu\text{g.L}^{-1}$, $7\mu\text{g.L}^{-1}$ et $32\mu\text{g.L}^{-1}$ pour respectivement le Cd, le Cu

et le Ni. Cinq sous-échantillons identiques (témoin, Ni, Cu, Cd et mélange) contenant chacun en moyenne 1575 individus sont placés dans des béciers de verre de 10 litres renfermant de l'eau de mer filtrée et la concentration choisie de métaux (à l'exception du témoin). Les expérimentations sont menées en chambre à température constante ($18 \pm 2^\circ\text{C}$) sous un bullage d'air artificiel modéré sous une photopériode de 12h de lumière/12h d'obscurité. Le Tableau 6 présente la composition de l'eau de mer utilisée pour les expériences d'exposition.

Tableau 6. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer utilisée pour les cultures des copépodes d'*E. affinis*.

Traitements	T ($^\circ\text{C}$)	Salinité (psu)	pH	DO (%)
Témoin	$19,89 \pm 0,02$	$14,83 \pm 0,07$	$8,54 \pm 0,13$	$49,28 \pm 1,82$
Ni	$19,63 \pm 0,81$	$15,02 \pm 0,01$	$8,44 \pm 0,0$	$49,53 \pm 2,34$
Cu	$19,13 \pm 0,51$	$14,98 \pm 0,04$	$8,42 \pm 0,02$	$48,87 \pm 2,17$
Cd	$19,4 \pm 0,72$	$15 \pm 0,02$	$8,4 \pm 0,02$	$49,63 \pm 2,35$
Mélange	$19,1 \pm 0,53$	$14,93 \pm 0,15$	$8,47 \pm 0,08$	$48,03 \pm 0,98$

psu : unité de salinité pratique (Practical Salinity Unit). DO : oxygène dissout

2.3.2. Cinétique d'accumulation

Le suivi de la cinétique d'accumulation est réalisé pendant six jours (144h) en prélevant 500mL d'échantillon aux temps d'exposition 0, 4h, 24h, 48h, 72h, 96h et 144 h pour l'ensemble des traitements. Les échantillons prélevés sont ensuite filtrés sur les filtres de nitrate de cellulose de porosité $0,22\mu\text{m}$ (Sartorius Stedim biotech, 37070 Goettingen Allemagne). Les filtres sont séchés à 60°C pendant 72 h et pesés pour déterminer la fraction de métaux traces des copépodes. Parallèlement, 30 μL d'acide nitrique (HNO_3) sont ajoutés à 50mL de filtrats dans le but de les conserver afin de doser les métaux résiduels (fraction dissoute).

2.3.3. Indices d'accumulation

Les indices d'accumulation, représentant les constantes d'accumulation par la voie dissoute (K_u) sont calculés à partir de la cinétique d'accumulation réalisée selon le modèle décrit par (Luoma et Rainbow, 2005):

$$C_{in} = K_u C_w t$$

Où

C_{in} : la concentration de métaux dans les tissus ($\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec);

K_u : la constante du taux d'absorption ($\text{L.g}^{-1}.\text{J}^{-1}$);

C_w : la concentration de métal dans l'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$);

t : le temps d'exposition (jours).

2.4. Effet des métaux traces sur la population d'*E. affinis*

L'effet de l'accumulation des métaux traces après 50% du temps d'exposition (72h) sur la population est calculé par rapport au nombre d'individus témoins et après 72 heures d'exposition. Les échantillons sont conservés dans le formol avant le dénombrement des populations des différents stades de développement d'*E. affinis*.

2.5. Effet des métaux traces sur la flore aérobie totale

L'effet des métaux traces sur la flore microbienne est réalisé à partir de 100mL de milieu de culture de copépodes collecté après 4, 48, 96 et 144h de mise en contact. Les échantillons prélevés sont broyés pendant 3 min à l'aide d'un Ultra-turrax Ika-T25D (Imlab, Lille, France). Une série de dilutions de 10^{-1} à 10^{-8} est préparée en milieu tryptone sel (Annexe 2) et un inoculum de 100 μL de chaque dilution est étalé en surface sur de la gélose nutritive. Le comptage des colonies est effectué après 48 heures d'incubation à 25°C.

2.6. Dosage des métaux traces

La concentration des métaux (Cd, Ni et Cu) dans les différentes matrices est réalisée selon le protocole décrit par (Ouddane, 1990) légèrement modifié et adapté à nos échantillons. Les filtres secs contenant les copépodes sont dégradés de manière acide pendant 24h à 100°C dans des tubes en téflon à l'aide d'une solution acide composée de 1mL d'acide nitrique (Merck suprapur, 65%) et de 3mL d'acide chlorhydrique (Merck suprapur, 33%). Les solutions obtenues sont ensuite filtrées, diluées au volume final de 10mL avec de l'eau ultra-pure MilliQ et conservées à 4°C jusqu'à analyse. Les échantillons d'eau de culture et les 50mL du filtrat d'eau de culture des copépodes, quant-à-eux, ne subissent aucun traitement et sont directement analysés. Des témoins « blancs réactifs » sont également inclus dans la procédure analytique.

Les concentrations élémentaires des trois métaux testés de chaque échantillon sont déterminées en triplicat par spectrométrie d'émission atomique à plasma couplé par induction (ICP-AES, Vista Pro, Varian, Australie). L'échantillon minéralisé est vaporisé (nébulisation) et introduit dans une torche à plasma d'argon où il est ionisé et est réduit à l'état d'atomes indépendants. En retournant à des états de niveau d'énergie moins élevés, ces atomes excités par le plasma émettent des photons dont les longueurs d'onde (domaine UV-Visible) sont caractéristiques de l'élément dosé. Un système dispersif (diffraction) est ensuite utilisé pour séparer les émissions de longueurs d'onde différentes et obtenir un spectre optique caractéristique de chaque élément chimique. L'intensité des raies émises (proportionnelle à la concentration de chaque élément) est enfin enregistrée par un détecteur.

L'ICP-AES permet de doser la plupart des éléments à des concentrations de l'ordre de $1\mu\text{g L}^{-1}$, soit de l'ordre de la partie par milliard (ppm) en masse (ou ppb, partie par billion). Le contrôle de la qualité des données est basé sur l'utilisation des solutions de références certifiées ICP à 1000ppm de Cd, Cu et Ni, qui permettent d'établir des courbes étalons sur la gamme entière pour chaque élément.

2.7. Analyses statistiques

Toutes les moyennes sont calculées à partir de triplicats et sont exprimées $\pm$ écart-type. Les données sont comparées par ANOVA à un facteur suivi du test post hoc de Tukey, en utilisant le programme de statistiques R Commander (R_x64.3.43). Les différences sont considérées significatives pour $p < 0,05$.

La cinétique de la bioaccumulation de chaque métal lourd a été directement ajustée au modèle approprié en utilisant la boîte à outils *Curve Fitting* de Matlab Software (Mathworks Inc., vers 7.2).

3. Étude de la diversité microbienne

L'étude de la diversité microbienne de la chaîne trophique des larves de la daurade repose sur l'isolement conventionnel de la flore totale des différentes matrices suivie d'une identification par spectrométrie de masse (MS, de l'anglais mass spectrometry) de type matrix-assisted laser desorption/ionisation (MALDI) time of flight (TOF). Trois genres dominants seront ensuite confirmés par biologie moléculaire.

3.1. Dénombrement de la flore cultivable aérobie totale

Le dénombrement de la flore cultivable aérobie totale est effectué sur les différentes matrices à savoir les eaux de mer, les micro-algues et les d'œufs d'*A. tonsa*. Ces matrices sont prélevées en conditions d'asepsie dans des flacons stériles de 500mL et conservées à une température de 4°C. Les micro-algues et les d'œufs d'*A. tonsa* sont broyés pendant 3min à l'aide d'un Ultra-turrax Ika-T25D (Imlab, Lille, France). Une série de dilutions allant jusqu'à 10^{-8} de chaque matrice est préparée en milieu tryptone sel. Un inoculum de 100µL des dilutions décimales est étalé sur gélose nutritive et l'incubation se fait à 25°C pendant 48 heures.

3.2. Isolement et identification phénotypique des souches

Les caractéristiques morphologiques des isolats sont déterminées par une évaluation visuelle des colonies bactériennes sur les boîtes de gélose nutritive suivie d'un examen microscopique. En tenant compte de ces caractéristiques, des colonies sont isolées par strie sur gélose nutritive et incubées à 25°C pendant 48h.

L'étude morphologique des isolats est limitée aux tests phénotypiques classiques décrits dans le manuel de bactériologie systématique de Bergey tels que la coloration de Gram, la forme des colonies, le regroupement des cellules et l'activité catalase. Un stock bactérien purifié est ensuite préparé dans un bouillon nutritif contenant 30% de glycérol et est conservé à - 80°C pour des analyses ultérieures.

3.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS

3.3.1. Préparation de la cible

Dans cette première étape, une UFC bactérienne fraîchement isolée est prélevée avec une pointe de pipette stérile et est étalée en couche mince sur une cible de MALDI en suivant les recommandations du fabricant (Bruker Daltonics, Bremen, Allemagne). La préparation est ensuite recouverte de 1µL de solution d'acide formique à 70%, séchée à température ambiante, recouverte d'1µL d'une solution de matrice [10mg.mL⁻¹ d'alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) dissous dans une solution d'acétonitrile/eau MQ/acide trifluoroacétique (TFA) (50/47,5/2,5 : v/v/v)] et à nouveau séchée. Le dépôt de colonies se fait en triplicat.

3.3.2. Acquisition des profils de spectrométrie de masse

Les profils en MALDI-MS sont acquis sur un AutoflexSpeed (Bruker) fonctionnant sous flexcontrol 3.4. La calibration du spectromètre de masse est réalisée à l'aide du standard bactérien test commercialisé par le fabricant (bacterial test standard, BTS) et selon ces recommandations. Ce kit de calibrage contient un extrait protéique typique d' *E. coli* DH5 alpha enrichi de deux protéines pures supplémentaires (RNase A et myoglobine) pour couvrir toute la gamme de masse de 4 à 17kDa. Pour ce faire, un aliquot de BTS est repris dans une solution d'acétonitrile/eau MQ/acide trifluoroacétique (TFA) (50/47,5/2,5 : v/v/v)], vortexé pendant 30seconde et 1µL est alors co-cristallisé sur la cible avec 1µL de matrice HCCA. Le séchage des dépôts est réalisé à température ambiante.

Les profils MALDI-MS sont acquis en mode linéaire positif sur la gamme de masse sur charge (m/z) de 2000 à 20000 Da en utilisant la méthode automatique MBT-FC préconisée par le fabricant. Chaque profil MALDI-MS correspond à la somme des profils en masse obtenus pour 480 tirs de laser effectués au hasard sur différentes régions d'un même dépôt.

3.3.3. Identification des bactéries à l'aide de Biotyper

Les profils MALDI-MS obtenus sont retraités avec le logiciel Biotyper (version 3.0, Bruker Daltonics) fonctionnant avec la base de données Biotyper DB-5989. Les profils expérimentaux MALDI-MS obtenus sont comparés aux profils MALDI-MS de référence et les correspondances sont restituées par Biotyper selon un Log (score) associé à un code couleur (vert, jaune et rouge). Un Log (score) supérieur à 2,3 (couleur verte) indique une

identification hautement probable au niveau de l'espèce, Un Log (score) compris entre 2.0 et 2,3 correspond à une identification hautement probable au niveau du genre (couleur verte) et à une identification probable au niveau de l'espèce. Un Log (score) entre 1,7 et 2,0 (couleur jaune) implique seulement l'identification probable du genre alors qu'un Log (score) inférieur à 1,7 (couleur rouge) signifie qu'il n'y a pas de similarité significative entre le profil inconnu et l'un de ceux de la base de données.

Le dendrogramme des souches identifiées a été réalisé avec la méthode standard de création de dendrogramme MSP de BioTyper (version 1.4) en utilisant les paramètres par défaut. Trois spectres de masse de souches identifiées sont combinés dans les profils de spectre de masse (MSP) et utilisés pour générer le dendrogramme. Les paramètres par défaut sont les suivants : la mesure de distance est définie comme corrélation ; le lien est défini comme moyen ; le dendrogramme axé sur le score est sélectionné, la valeur seuil du score pour un organisme unique est de 300 et la valeur seuil du score pour les organismes apparentés est de 0.

3.4. Identification des souches par biologie moléculaire

3.4.1. Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN des souches bactériennes appartenant aux genres ; *Bacillus*, *Vibrio* et *Staphylocoque* est réalisée grâce au kit d'extraction et de purification d'ADN génomique Wizard R (Wizard® Genomic DNA Purification Kit) selon le protocole du fabricant. La concentration du matériel extrait est déterminée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop (Biowave II, Biochrom WPA, Cambridge, Royaume Uni) par la mesure de l'absorbance (260 nm) d'un échantillon de 1µL. L'ADN extrait est conservé à une température de – 20°C.

3.4.2. Électrophorèse en gel agarose

Les analyses quantitative et qualitative du matériel sont effectuées sur gel d'agarose à 0,6 %. Le gel d'agarose est préparé en dissolvant l'agarose dans le volume correspondant de tampon Tris Borate EDTA (TEB) 0,5X pH 8,3, préparé à partir d'une solution concentrée 5X dont la composition est la suivante : Tris 445mM ; acide borique 445mM ; EDTA 12,5mM). Le tout est ensuite chauffé deux minutes au four micro-ondes pour dissoudre l'agarose. Après un léger refroidissement, un volume correspondant à 1/5000 de Gel Red TM fourni par FluoProbes® est ajouté avec précaution. Le gel est ensuite coulé dans un support prévu à cet effet après avoir placé un peigne pour la création des puits. Une fois solidifié, le gel est déposé dans la cuve d'électrophorèse et 8µL d'échantillon, mélangés à 2µL de tampon de

charge (Saccharose, 50% ; EDTA, 50mM ; Bleu de bromophenol 0,01%; Urée, 4M), sont déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Fermentas) est déposé dans un puits comme référence.

La migration s'effectue à 100 V pendant une heure dans du tampon TBE (0,5X). Les résultats sont visualisés sous UV en utilisant l'appareil GelDoc 2000 de Doc 2000 de Biorad® et le logiciel Quantity one, Quantitation software (Bio-Rad laboratories, Hercule CA, USA)

3.4.3. Rep-PCR

Repetitive Element Palindromic-PCR (Rep-PCR) été réalisée en utilisant l'amorce universelle 5'- (GTG) 5-3. Le mélange réactionnel de 50 µL est composé de 5µL d'ADN de chaque souche, 5µL d'amorce 5'- (GTG) 5-3, 25µL de l'ADN polymérase DreamTaq (Thermoscientific, USA) et 15µL d'eau MQ. Le programme Rep-PCR consiste en une étape initiale de dénaturation (5min à 95°C) suivie de 30 cycles de dénaturation (1min à 94°C), d'hybridation (1min à 40°C), d'élongation (8min à 72°C) et une étape d'allongement final (16 min à 72°C).

Les amplicons sont séparés sur gel d'agarose à 1% par migration électrophorétique en tampon Tris-borate-EDTA (TBE) pendant 2 heures à 100V. Les gels sont classiquement colorés au GEL RED (Biotium, Canada) et les images des migrations électrophorétiques sont obtenues comme précédemment via un GelDoc 2000 et le logiciel Quantity One. Les images des gels sont retraitées par le logiciel PyElph 1.4 afin d'obtenir l'arbre phylogénétique correspondant (Pavel et Vasile, 2012).

3.4.4. Amplification de l'ADNr 16S par réaction en chaîne à la polymérase (PCR, de l'anglais *polymerase chain reaction*)

Le gène codant l'ARN 16S des souches est amplifié en entier en utilisant les amorces S1 (5'-GAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') et S2 16S reverse (5'-GGMTACCTTGTTACGAYTTC-3') (Drago et al., 2011). La concentration initiale des amorces utilisées est de 20µM pour toutes les PCR réalisées. Dans un tube de PCR dont le volume final est 50µL sont placés : 5µL d'ADN (40-50ng.µL⁻¹), 2,5µL de chacune des deux amorces S1 et S2, 25µL de la Master Mix et 15µL d'H₂O. Le programme de PCR pour l'amplification de l'ARN ribosomal 16S déroulé sur 29 cycles, est le suivant : 94°C/5 min, 29 cycles à 94°C/1 min, 55°C/1 min et 72°C/1 min et enfin 72°C/5 min (Al Atya et al., 2015).

3.4.5. Purification, séquençage et analyse phylogénétique des produits de PCR

Les produits amplifiés sont purifiés en utilisant le kit de purification pour PCR (Qiagen, Courtaboeuf, France) en suivant les recommandations du fabricant. Les séquençages de l'ADN ribosomique 16S des souches sont réalisés par Eurofins Genomics (Munich, Allemagne). Les séquences nucléotidiques sont ensuite soumises à une recherche d'homologie à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST de l'anglais *basic local alignment search tool*) du centre national des informations de biotechnologie (NCBI de l'anglais *National Center for Biotechnology information*). L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S par la méthode d'analyse du maximum de vraisemblance est réalisée en utilisant MEGA 7 selon (Hall, 2013).

4. Criblage et caractérisation des souches antagonistes

4.1. Sensibilité des souches cibles aux antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques testés sur les souches cibles de vibrions et Staphylocoques sont déterminées selon la méthode de dilution standard sur milieu gélosé MH selon les recommandations EUCAST (www.eucast.org). Une série de dilution en cascade est préparée de manière à obtenir une gamme de concentration comprise entre 64mg.L⁻¹ et 0,03mg.L⁻¹ pour chaque antibiotique ci-contre (amoxicilline, amoxicilline + acide clavulanique, ceftazidime, imipenem, gentamicine, amikacine, erythromicine, azithromycine, gamitromicine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, marbofloxacine, vancomycine, tetracycline, chlramphenicol, florfénicol et rifampicine). Des solutions d'agar MH aux concentrations en antibiotiques mentionnées ci-dessus sont immédiatement mélangées et versées dans des boîtes de Petri. En parallèle, une suspension bactérienne est préparée à partir d'une culture jeune de 18 à 24h sur milieu gélosé MH dans de l'eau physiologique stérile de 0,85%. La densité bactérienne est ajustée au standard Mc Farland 0,5 (10⁸ UFC/ml) puis dilué au 1/100. L'ensemencement des boîtes est fait par un enseigneur multipoints (dispositif de Steers). Chaque tige de cet enseigneur prélève 1 µl de la suspension bactérienne préalablement préparée. L'ensemencement est fait sur milieu gélosé MH contenant l'antibiotique à étudier en différentes concentrations. Les boîtes inoculées sont incubées pendant 24h à 37°C. La CMI est définie comme la plus faible concentration d'un antibiotique inhibant la croissance visible d'un micro-organisme après une nuit d'incubation.

4.2. Activité antibactérienne des souches de *Bacillus pumilus* et *Bacillus subtilis*

L'activité antibactérienne de plusieurs souches de *B. pumilus* et de *B. subtilis* est évaluée contre une série de bactéries à Gram-négative et à Gram-positive incluant des bactéries de référence et certaines bactéries isolées au cours de cette étude (Tableau 7).

Ainsi, les cultures bactériennes des souches testées sont préparées dans le bouillon nutritif pendant 48h à 25°C. Alors que, les bactéries cibles sont revivifiées dans un bouillon de Mueller Hinton (MH) à l'exception des staphylocoques qui sont revivifiés dans le Bouillon infusion cœur-cerveau (BHI) (de l'anglais *BD Brain Heart Infusion* et incubées à 25°C pendant 18 h. La suspension bactérienne des souches testées est ensuite diluée dans de l'eau peptonée de façon à obtenir une concentration initiale de cellules d'environ 10^6 UFC mL⁻¹. L'activité est recherchée selon deux méthodes : la méthode par contact cellulaire (méthode des spots) et la méthode de diffusion en gélose (méthode des puits) décrite par (Al Atya et al., 2015) et légèrement modifiée.

Tableau 7 . Liste des bactéries pathogènes utilisées dans cette étude comme espèces cibles pour les tests d'activité antimicrobienne

Groupe	Espèces cibles
Gram -	<i>V. angularum</i> (1 COPS), <i>V. alginolyticus</i> CIP, <i>V. alginolyticus</i> (17 EMB), <i>E. coli</i> CIP, <i>E. coli</i> E3A3, <i>E. coli</i> 147, <i>E. coli</i> 242, <i>E. coli</i> 289, <i>E. coli</i> 436
Gram +	<i>Listeria innocua</i> ATCC, <i>L. monocytogenes</i> 157, <i>L. monocytogenes</i> 158, <i>L. monocytogenes</i> 161, <i>L. monocytogenes</i> 157, <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> ATCC 33861, <i>S. aureus</i> (SARM)S1, <i>S. aureus</i> (SARM) ATCC 43300, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. epidermidis</i> 11 EMB, <i>S. epidermidis</i> 52 EMB, <i>S. hominis</i> 13 EMB, <i>S. condimenti</i> 25 EMB, <i>S. warnii</i> 27 EMB, <i>S. warnii</i> 8 EMB

4.2.1. La méthode par contact cellulaire

La méthode par contact cellulaire consiste à déposer un inoculum de 5µL de la suspension bactérienne préalablement préparée des souches de *B. pumilus* et des souches de *B. subtilis* sur les boîtes gélosées de MH et BHI préalablement inoculées avec 150µL des suspensions de souches pathogènes listées dans le (Tableau 7). Après incubation à 25°C pendant 48h,

l'activité antibactérienne est déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition autour des spots des cultures de *B. pumilus* et de *B. subtilis*. Tous les tests sont réalisés en triplicat.

4.2.2. La méthode de diffusion en gélose

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des surnageants de culture des souches de *Bacillus* à l'égard des souches pathogènes cibles retenues est réalisée par la méthode de diffusion en gélose (méthode de puits). Des cultures de 48h des souches de *B. pumilus* et de *B. subtilis* issues des bouillons nutritifs sont centrifugées (10000g. 10 minutes à 4°C). Les surnageants obtenus par centrifugation sont stérilisés par filtration à travers un filtre à seringue de 0,22µm de diamètre. Le pH des surnageants récupérés est alors contrôlé (pH entre 6,5 et 6,8) et ces derniers sont ensuite testés.

Quinze millilitres d'une gélose de MH et BHI (1% d'agar) inoculées avec 150µL (10^6 UFC mL⁻¹) de suspension des souches cibles pathogènes sont coulés dans des boîtes de Petri. Les puits sont creusés dans la gélose à l'aide d'une pipette pasteur stérile et remplis avec 50µL de surnageant des souches à tester. Les boîtes sont d'abord laissées à température ambiante dans des conditions stériles (sous hotte) pendant 1h, pour permettre la diffusion des molécules actives, puis incubées pendant 24-48h à 25°C et 37°C. L'activité antibactérienne est révélée par la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des puits. Le diamètre de chaque zone d'inhibition est mesuré. Chaque essai a été effectué en trois répliques.

4.3. Détermination de l'activité hémolytique

L'activité hémolytique est déterminée selon la méthode sur gélose au sang. Pour cette méthode, 5% de sang de cheval sont ajoutés à 100mL de milieu Luria Bertani (LB) (Annexe 3) gélifié avant de couler les boîtes de Pétri. Une UFC d'une culture fraîche de chaque souche est inoculée dans 5mL de bouillon LB et la culture est incubée 48 h à 25°C. Une goutte (2 µL) de cette culture est déposée au centre de la boîte. Le tout est alors séché jusqu'au séchage complet de la goutte au moins 15min sous hotte à flux laminaire. Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 48h. Le développement d'une zone claire autour des colonies est considéré comme un résultat positif. Cette expérience est réalisée en triplicat. L'activité hémolytique n'a été déterminée que pour les souches de *B.pumilus* nommées 35R COPS, 38 COPS, 35A COPS, 40 COPS et 18 COPS.

5. Purification et caractérisation des métabolites secondaires

5.1. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche *B.pumilus* 35R COPS

5.1.1. Préparation du surnageant

La souche de *B. pumilus* 35R COPS et la souche de *B.subtilis* 23COPS sont revivifiées dans le bouillon nutritif pendant 24-48h à 25°C. Les erlenmeyers de 500mL contenant le milieu Landy fraîchement préparé (Annexe 4) sont inoculés par 100µL de cette préculture. Les cultures sont ensuite incubées à 30°C sous agitation (160 tours/min), pendant 48-72h jusqu'à ce que la phase stationnaire de croissance soit atteinte. Les surnageants de culture exempts de cellules (CFS de l'anglais *cell-free supernatant*) sont obtenus par centrifugation (10 000 x g, 15min, 4°C) et filtration sur filtre 0,22 µm de porosité.

5.1.2. Analyse par chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC, de l'anglais *high performance liquid chromatography*)

Le surnageant de culture filtré de la souche *B. pumilus* 35 R COPS additionné de 15% d'acétonitrile est centrifugé à 1300tr/min pendant 1min. La collecte des fractions chromatographique est réalisée par l'injection de 5ml du surnageant de culture plus 15% d'acétonitrile à travers une colonne semi-préparative C18 250 mm -10 mm, XBridge Prep BEH130 5µm (Waters, Guyancourt, France) à un débit de 7mL.min⁻¹ à la température ambiante. Le système chromatographique est constitué d'une pompe automatique Waters 600^E et d'un détecteur photodiode Waters 2996 et un contrôleur Water 600. L'acquisition et le traitement des données sont réalisés grâce au logiciel Millenium. La détection UV en ligne est acquise entre 200 et 390 nm à une fréquence de 1,2 nm. Le solvant A utilisé est composé de 99,9% d'eau ultra-pure / 0,1% de TFA et le solvant B, de 99,9% d'ACN / 0,1% de TFA. Pour chaque analyse, la colonne est d'abord équilibrée avec 95% A pendant 5 min, puis un gradient linéaire de 5 à 40% B est appliqué en 22min suivie par un gradient linéaire de 40 à 100% B pendant 3 min puis suivie d'un plateau de 100% B pendant 7 min suivie d'un retour de 100% B à 5% B en 5 min suivi d'une période de rééquilibration de 10min à 95% A. Les chromatogrammes obtenus à la longueur d'onde de 215nm sont utilisés pour l'analyse des données.

Les fractions collectées dans des flacons coniques en polyéthylène de 50mL sont ensuite séchées par un concentrateur sous vide, centrifuge (miVac Quattro, Genevac™ SP Scientific, Ipswich, UK) à une température de 40°C. Ensuite, les fractions chromatographiques séchées sont solubilisées dans 100µL d'eau ultra-pure afin d'être analysées par MALDI-TOF-MS et utilisées pour des tests d'activité antagoniste.

5.1.3. Détection de la production de lipopeptides par spectrométrie de masse par MALDI-TOF-MS

Tous les échantillons de surnageant de culture et les fractions chromatographiques purifiées préalablement par HPLC sont déposés sur une cible MALDI (cible Ground Steel™ 384 spots, Bruker Daltonics, Allemagne). Les spectres de masse MALDI-TOF sont acquis sur un Autoflex Speed (Bruker Daltonics) en utilisant le programme Flex Control 3.0 (Bruker Daltonics) et la méthode de reflectron positif sur une gamme de masse 400 à 3000 m/z « RP_700-3500 » (Bruker Daltonics). Un µL de chaque échantillon est déposé sur la cible de MALDI TOF. Le dépôt est ensuite recouvert d'un µl de solution de matrice (10 mg/ml de CHCA fraîchement solubilisée en acétonitrile (ACN)/eau ultra-pure/acide trifluoroacétique (TFA), 50/47,5/2,5 (v:v:v) et laissé à température ambiante jusqu'à séchage complet. Les spectres sont ensuite analysés manuellement à l'aide du logiciel Flexanalysis version 3.4 (Bruker daltonics, Bremen, Allemagne).

5.1.4. Caractérisation des molécules par HPLC-MS

Les surnageants des cultures de *B. pumilus* 35R COPS et celui de la souche de *B. subtilis* 23 COPS sont séparés par chromatographie en phase inverse en utilisant un système HPLC ACQUITY biocompatible (Waters, Manchester, Royaume-Uni) équipé d'une colonne Phenomenex C18 Kenetex (ID 3,0mm × 150mm, 2,6µm, 100 Å). L'élution des molécules retenues sur C18 est réalisée selon un gradient linéaire d'ACN contenant 0,1% de FA (25-95% d'ACN sur 55min) et un débit de 0,5 mL.min⁻¹. L'éluant d'HPLC est directement électropulvérisé de l'extrémité de la colonne vers la source du spectromètre de masse grâce à une tension de 3kV.

Le système de chromatographie est couplé à un spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si-IMS (Waters) fonctionnant en mode dépendant des données. L'ionisation et le passage en phase gazeuse des composés sont réalisés à l'aide d'une source electrospray en utilisant un débit de

gaz de désolvatation (N₂) de 500L/h, une pression de nébulisation de 6,5bars et des températures de désolvatation comprises entre 150 et 300°C.

Les balayages complets de l'étude MS ont été acquis à une puissance de résolution de 20 000 (FWHM), sur la plage de masse de 300-3000 m / z. Les précurseurs observés avec une intensité supérieure à 1000 comptes ont été sélectionnés pour la fragmentation CID du piège ionique avec une fenêtre d'isolation de 3amu et soumis à une montée en énergie de collision de 10 à 20V pour faible masse et de 40 à 120V pour masse élevée.

Les spectres MS sont enregistrés sur la gamme de 50 à 3000m/z. Les spectres MS/MS sont enregistrés sur la même gamme de m/z. Un temps d'injection maximal de 100ms est utilisé pour générer les spectres MS/MS par dissociation induite par collision (CID, de l'anglais *collision induced dissociation*) des cinq ions les plus intenses. Les données de spectrométrie de masse MS et MS/MS sont retraitées manuellement en utilisant le logiciel Mass Lynx (version 4.1, Waters). Les spectres n'ont pas subi de lissage et la ligne de base reste à zéro. L'annotation des pics est réalisée sur tous les signaux. Les structures moléculaires sont dessinées grâce au logiciel ChemDraw Ultra (version 12.0.2.1076, Cambridge, MA, Etats-Unis).

5.1.5. Activité antibactérienne des fractions collectées du fractionnement HPLC séparatif

Les fractions d'amicoumacine collectées par HPLC semi-préparative sont testées pour leur activité antibactérienne contre *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *S. aureus* et *S. aureus* résistant à la méthilicine (SARM). La méthode utilisée est celle de puit décrite dans la section 4.2.

5.1.6. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des fractions collectées du fractionnement HPLC séparatif.

Les souches *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *S. aureus* (SARM) ATCC 43300, MRSA-S1 et *S. aureus* ATCC 25923 sont cultivées en bouillon BHI pendant une nuit à 37°C. Dix µL de chaque culture à environ 10⁶ UFC.mL⁻¹ sont inoculés dans des puits de microplaques 96 puits de culture cellulaire (Cellstar) contenant différentes concentrations d'amicoumacine A et amicoumacine B allant de 0,125 à 128mg.mL⁻¹. Les CMIs sont définies comme précédemment.

5.1.7. Test de cytotoxicité du surnageant de culture actif et des fractions d'amicoumacine

Le test de cytotoxicité est réalisé en utilisant des cellules HT-29-MTX (Sigma Aldrich, Allemagne). Les cellules HT-29 sont cultivées en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) en flasque de 75cm² pendant 6 à 7 jours à 37°C, 5% CO₂ entre les passages 15 et 30. Après récupération des cellules et comptage sur cellule de Malassez, 8000 cellules sont déposées dans chacun des puits d'une plaque 96 puits dans un volume final de 200µL de DMEM. Après incubation à 37°C, 5% CO₂ pendant 7 jours, les cellules sont à confluence et prêtes à être utilisées.

Après 2 lavages des puits, les fractions d'amicoumacines A et B et le surnageant de culture actif à une dilution de 1/8, préparés en milieu DMEM, sont mis en contact pendant 24h avec les tapis cellulaires. Les témoins négatifs de toxicité (milieu DMEM seul) et les témoins positifs (milieu DMEM à 0,1% de Triton X100) de cytotoxicité sont incubés dans les mêmes conditions. Chaque test est répété dans 3 puits distincts.

Après l'incubation, les échantillons testés sont retirés et les cellules sont lavées par 100µL de tampon phosphate PBS puis un volume de 200µL DMEM contenant 5% du réactif CCK-8 (Dojindo Molecular Technologies, Japon) est ajouté dans tous les puits. Ce réactif permet de mesurer l'activité des déhydrogénases mitochondriales des cellules HT-29. Les plaques sont incubées 2h à 37°C, 5% de CO₂. L'absorbance de la plaque est lue à une longueur d'onde de 450 nm par un spectrofluorimètre Xenius XC (Safas Monaco, Monaco). La viabilité cellulaire est calculée par rapport à la moyenne des absorbances des puits témoins (correspondant à 100 % de cellules vivantes).

5.1.8. Séquençage du génome de *B. pumilus* 35R COPS et analyse in silico

L'ADN total de la souche de *B. pumilus* 35R COPS est extrait en utilisant le kit de purification d'ADN génomique Wizard (Promega Corp., Madison, WI, USA) selon les instructions du fabricant. Le génome bactérien est séquencé par MicrobesNG (<http://www.microbesng.uk>) en utilisant les plates-formes technologiques Illumina MiSeq et HiSeq 2500, avec des séquences appariées de 250 -bp. L'analyse des séquences est réalisée par MicrobesNG en utilisant une procédure standardisée impliquant les logiciels Kraken (Wood DE et Salzberg SL., 2014) pour déterminer le génome de référence existant le plus proche, l'algorithme Burrows-Wheeler Aligner (BWA) MEM (<http://bio-bwa.sourceforge.net>) pour cartographier les

séquences et évaluer la qualité des données. Le génome est reconstitué par assemblage *de novo* en utilisant le logiciel SPAdes (<http://cab.spbu.ru/software/spades/>). L'annotation prédictive du génome a été réalisée par le serveur RAST (Rapid Annotations using Subsystems Technology) (<http://rast.nmpdr.org>). L'analyse de la présence de clusters de gènes impliqués dans la synthèse de métabolites secondaires a été faite avec antiSMASH (Weber et al 2015).

5.2. Caractérisation des métabolites secondaires produits par *B. pumilus* 38 COPS

5.2.1. Conditions de culture de *B. pumilus* 38 COPS

B. pumilus 38 COPS est cultivé dans plusieurs flacons de 500ml contenant du bouillon Luria Bertani (LB) (Sigma Aldrich, Allemagne), un bouillon nutritif (Sigma Aldrich, Allemagne) et dans du milieu Landy préparé juste avant utilisation. L'incubation est effectuée à 30°C sous agitation (160 tours/min) pendant 48-72h jusqu'à atteindre la phase stationnaire. Les surnageants de culture obtenus par centrifugation (10000g, 15min, 4°C) sont filtrés sur filtre 0,22 µm avant toute utilisation.

5.2.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

Le surnageant de culture utilisé pour évaluer l'activité antibactérienne est obtenu à partir de cultures fraîches de *B. pumilus* 38 COPS. Les puits sont préparés dans des plaques d'agar BHI, puis ils sont pré-inoculés avec 150µL de souche cible de *Staphylococcus* (Tableau 7) et remplis avec 50µL de surnageant de culture de *B. pumilus* 38 COPS. Les plaques d'agar sont laissées à température ambiante, dans des conditions stériles, pendant 1 heure avant incubation pendant 24-48h à 37°C. Chaque essai est effectué en triple. L'activité antibactérienne est évaluée comme moyen des diamètres des zones d'inhibition autour du puits contenant le surnageant de culture.

5.2.3. Test de damier

L'effet combiné de l'érythromycine (Sigma Aldrich, Allemagne) et du surnageant de culture actif, obtenu après croissance de *B. pumilus* 38 COPS dans du milieu Landy pendant 48-72 h, est déterminé à l'aide d'une méthodologie de test en damier. Les concentrations d'érythromycine variaient de 1 à 256µg.mL⁻¹, tandis que le surnageant de culture actif est testé

sur des dilutions dans un bouillon BHI. Les dilutions de surnageant de culture se situent entre 1/2 et 1/16. Notamment, le milieu Landy non fermenté (sans croissance de *B. pumilus* 38 COPS) est utilisé comme contrôle négatif et donc combiné à l'érythromycine dans les mêmes proportions que le surnageant de culture actif. Des plaques à 96 puits sont inoculées avec des souches cibles (SARM ATCC 43300, SARM SA-1, *S. epidermidis* 11EMB et *S. hominis* 13EMB) à 106CFU.mL⁻¹, dans un volume final de 200µL par puits, et incubées pendant 24h à 37°C. La CMI est considérée comme la plus faible concentration en érythromycine inhibant la croissance visible de la souche cible après incubation à 37°C pendant 24h, mélangée ou non avec les différentes dilutions de CCS.

5.2.4. Cytotoxicité de surnageant de culture actifs de *Bacillus pumilus* 38 COPS

Le test de cytotoxicité réalisé sur le surnageant de culture de *B. pumilus* 38 COPS est fait de la même manière décrite dans la section 5.1.7. Le surnageant de culture actif obtenu après croissance dans le milieu Landy a été testé à différentes dilutions de 1/4 à 1/8 dans le milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM) sans antibiotiques et sérum et a été ajouté aux cellules confluentes correspondantes dans les puits. Du DMEM témoin contenant du milieu Landy 1/4 non fermenté dilué a également été testé. Les résultats sont exprimés en % de croissance de base observée avec des cellules non traitées.

5.2.5. Séquençage du génome de *Bacillus pumilus* 38 COPS et analyse in silico

La séquence du génome entier de *B. pumilus* 38 COPS a été analysée en utilisant RAST, un outil disponible en ligne afin de prédire les cadres de lecture ouverts (ORF), et annoter les gènes (<http://rast.nmpdr.org>) (Aziz et al., 2008). Les données obtenues ont été analysées à l'aide de la base de données SEED (Overbeek et al., 2005). L'analyse du logiciel en ligne AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org#!/start>) a été réalisée pour révéler la présence de gènes putatifs codant pour les peptides synthases non ribosomiques (NRPS) et les bactériocines (Weber et al., 2015).

RESULTATS & DISCUSSION

**Chapitre I. Bioaccumulation des
Métaux Traces chez le Copépode**

E. affinis

La contamination par les métaux lourds des organismes aquatiques est en partie responsable de plusieurs problèmes écotoxicologiques. Pour mieux comprendre ces phénomènes, la bioaccumulation et l'étude de l'interaction entre les contaminants et les organismes biologiques présentent un intérêt tout à fait particulier.

Dans ce premier chapitre nous avons exposé une population de copépodes *E. affinis* à trois métaux traces ; le Cd, le Cu et le Ni seuls ou en mélange. Avant de réaliser des expérimentations d'exposition en grand volume (type mésocosme de 10 Litres). Nous avons tout d'abord déterminé les concentrations létales du Cd, du Cu et du Ni, puis nous avons ensuite quantifié par voie d'entrée, dissoute et particulaire, la bioaccumulation des différents métaux vis-à-vis d'*E. affinis*. Pour finir, nous avons étudié les réponses des différents stades de développement d'*E. affinis*, les réponses sexe-spécifiques ainsi que les réponses de la flore bactérienne totale aux métaux traces étudiés.

1. Les concentrations létales (CL₅₀)

Les métaux traces sont omniprésents dans divers milieux naturels et peuvent être toxiques à des concentrations plus ou moins élevées pour les organismes marins. Dès lors, la détermination de la concentration létale est une étape essentielle dans toutes les études toxicocinétiques. La mortalité des individus d'*E. affinis* due à la toxicité du Cd, Ni et Cu a été analysée sous l'angle du modèle statistique de régression binomiale : le modèle probit. La (Figure 15 A, B, C) représente les lignes de régression binomiale « concentration-mortalité » après 96 heures d'exposition au Cd, Ni et Cu pour les deux sexes. Cette figure montre clairement que la mortalité des deux sexes des individus d'*E. affinis* augmente avec l'augmentation de la concentration des trois métaux traces étudiés.

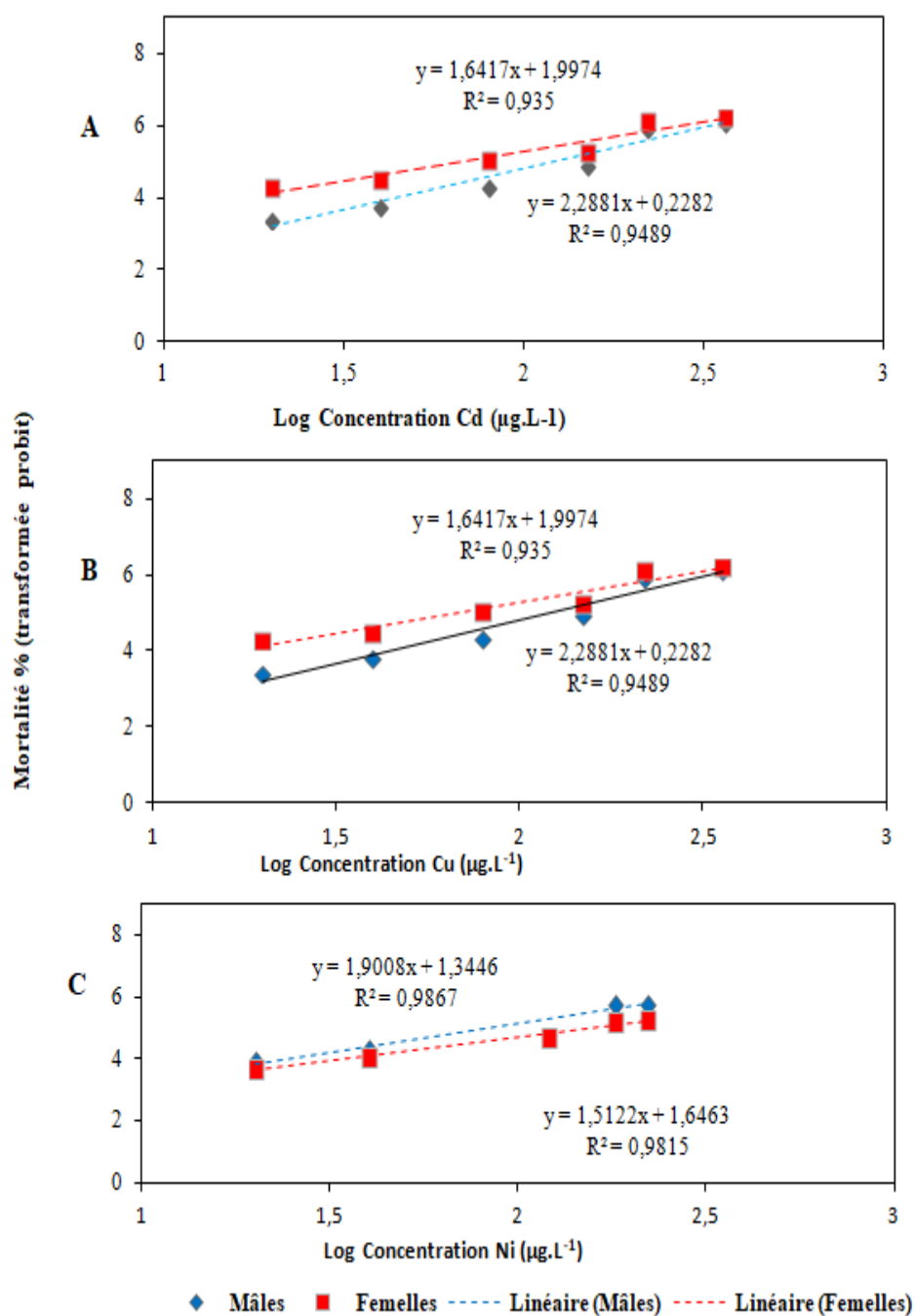


Figure 15. Courbes de régression binomiale « concentration-mortalité » durant 96h d'exposition des copépodes mâles et femelles d'*Eurytemora affinis* exposés aux Cd (a), Cu (b) et Ni (c).

Les valeurs des concentrations létales (CL) sont extrapolées à partir de ces courbes de régression « concentration-mortalité ». Les CL₅₀ du Cd, du Ni et du Cu pour les femelles et

les mâles adultes d'*E. affinis* sont résumés dans le Tableau 8. *In fine*, la sensibilité des deux sexes augmente avec le temps d'exposition et elle est significativement différente.

Tableau 8. Concentrations létales aiguës (CL₅₀ en µg.L⁻¹) du cadmium, du cuivre et du nickel chez le copépode adulte *E. affinis* après 48 h, 72 h et 96 h d'exposition.

	CL ₅₀ (µg.L ⁻¹)								
	48h			72h			96h		
	Cd	Cu	Ni	Cd	Cu	Ni	Cd	Cu	Ni
Femelles	239	-	-	121	224	-	90	39	161
Mâles	-	145	-	67	51	88	128	28	90

- : Non déterminée

Après 48h, 72h et 96h d'exposition au Cd, les valeurs de CL₅₀ relatives aux femelles sont respectivement de 239, 121 et finalement 90µg.L⁻¹. De la même manière ces valeurs pour les mâles sont respectivement non déterminables, de 67 et 128µg.L⁻¹. Des lors, après 72h d'exposition, les mâles sont 2 fois plus sensibles que les femelles alors qu'après 96h d'exposition ce sont les femelles d'*E. affinis* qui sont environ 1,4 fois plus sensibles (CL₅₀ = 90,0 µg.L⁻¹) que les mâles (CL₅₀ = 128µg.L⁻¹) au Cd.

Pour le Ni, nous remarquons que la sensibilité est très faible dans les premier temps d'exposition. Pour preuve, il n'est pas possible de déterminer les CL₅₀ à 48h d'exposition. Même après 72h d'exposition, nous constatons aussi que la sensibilité est faible et que CL₅₀ est déterminable que pour les males (88µg.L⁻¹). Des lors, après 96h d'exposition, les mâles sont environ 1,8 fois plus sensible que les femelles.

Concernant le cuivre, nous notons que les copépodes mâles ont montré une sensibilité élevée à cet élément avec dès lors 48h d'exposition, les CL₅₀ sont de l'ordre de 145 µg.L⁻¹. Après 96h d'exposition, nous constatons que la sensibilité des copépodes augmente avec des CL₅₀ faibles de 28µg.L⁻¹ et 39µg.L⁻¹ respectivement pour les mâles et les femelles d'*E. affinis*. En comparaison, la sensibilité des copépodes au Ni et au Cd est respectivement 2,3 et 4,12 fois plus faible.

Au final, ces résultats montrent que la sensibilité des mâles et des femelles d'*E. affinis* augmente avec le temps d'exposition et que cette sensibilité est différente chez les deux sexes par rapport aux trois métaux. Après 96h d'exposition, les mâles sont plus sensibles au Cu ($CL_{50} = 28 \mu\text{g.L}^{-1}$), suivi du Ni ($CL_{50} = 90\mu\text{g.L}^{-1}$) et du Cd ($128\mu\text{g.L}^{-1}$) tandis que les femelles sont plus sensibles au Cu ($39\mu\text{g.L}^{-1}$), suivies du Cd ($90,04\mu\text{g.L}^{-1}$) et du Ni ($161\mu\text{g.L}^{-1}$).

Après 96h d'exposition, les mâles et les femelles d'*E. affinis* présentent donc une bonne tolérance au Cd et au Ni. Comparés à des études similaires menées sur *E. affinis*, les valeurs de Cd déterminées sont considérées comme relativement faibles (Tableau 9). Bien qu'aucune étude sur *E. affinis* ne puisse être utilisée pour comparer les valeurs de toxicité aigüe pour le Ni, les résultats obtenus ($90\mu\text{g.L}^{-1}$ mâle, $161\mu\text{g.L}^{-1}$ femelle) sont relativement faibles comparés à ceux rapportés dans des études sur d'autres espèces (Barka et al., 2001; Tlili et al., 2016 ; Taylor, 1981). De manière intéressante, l'effet extrêmement toxique du Cu montré dans cette étude a également été rapporté dans plusieurs études sur les copépodes (Barka et al., 2001; Hutchinson et al., 1994; Sullivan et al., 1983a).

Tableau 9. Valeurs de toxicité aigüe des métaux traces 96h- $CL_{50}(\mu\text{g.L}^{-1})$ pour l'espèce tempérée *E. affinis* relevées dans la littérature

Stade de vie	96h- $CL_{50} (\mu\text{g.L}^{-1})$			Référence
	Cd	Cu	Ni	
adulte (Femelles)	90,04	39	161	Présente étude
Adulte (Mâles)	127,75	28	90	Présente étude
Adulte femelle	90,04			(Kadiene et al., 2017)
Adulte mâle	127,75			(Kadiene et al., 2017)
Nauplie	>120	30		(Sullivan et al., 1983a)
Nauplii	51,6 (5salinité)			(Hall et al., 1995)
Nauplii	213(15 salinité)			(Hall et al., 1995)
Nauplii	82,90 (25 salinité)			(Hall et al., 1995)
-	147,7			(Cripe and Cripe, 1990)
-	60			(Roberts et al., 1982)
-	29			(Toudal and Riisgard, 1987)

2. La cinétique de la bioaccumulation du Cd, du Cu et du Ni

Afin de mieux comprendre le phénomène de bioaccumulation et de le rapprocher de l'état de présence des métaux traces dans les milieux ambiants, une population de copépodes (*E. affinis*) est exposée aux 1/3 ou moins de la CL50 des trois métaux Cd, Cu et Ni seuls et en mélange pendant une durée de 144h. Les concentrations utilisées dans le cas de l'expérimentation d'exposition en mélange étaient de 1/3 ou moins de la CL₅₀ de chacun des métaux. Ce suivi à long terme nous a permis d'étudier la cinétique de bioaccumulation en calculant les indices d'accumulation correspondant (Tableau 10).

Tableau 10. Indices d'accumulation de Cu, du Ni et du Cd dans *E. affinis*.

Métaux traces	Cu		Ni		Cd	
	Seul	En mélange	Seul	En mélange	Seul	En mélange
Indices d'accumulation (L.g⁻¹.d⁻¹)	0,575	0,718	0,084	0,018	0,083	0,067
r²	0,529	0,914	0,771	0,811	0,970	0,933

E. affinis Seul : sont exposés à 1/3 ou moins de CL50 de chaque métal séparément. En mélange : *E. affinis* sont exposés à un mélange non équimolaire mais de 1/3 ou moins de la CL₅₀ de chacun des métaux.

2.1. Bioaccumulation du Cd et concentration résiduelle dans le milieu

Comme indiqué sur la (Figure 16), après 4h, 24h, 48h, 72h et 96h d'exposition au Cd seul, les concentrations de Cd dans les tissus d'*E. affinis* sont respectivement 0,83 ; 2,60 ; 6,32, 7,37 et 12,09 µg.g⁻¹ poids sec et elles sont de 1,28 ; 2,38 ; 3,39 ; 5,05 et 8,63 µg.g⁻¹ poids sec dans le traitement en mélange. En effet, la tendance d'accumulation du Cd dans les tissus d'*E. affinis*, testé seul et en mélange, est quasi-linéaire et conduit respectivement à des concentrations finales de 15µg.g⁻¹ poids sec et de 9,45µg.g⁻¹ poids sec à la fin de l'exposition. De même, la concentration résiduelle de ce métal non essentiel dans l'eau tend à diminuer avec le temps d'exposition passant de 32,89µg.L⁻¹ au 25,63µg.L⁻¹ et 28,87µg.L⁻¹ respectivement pour les traitements seul et en mélange après les 144h d'exposition. Cependant, l'accumulation relative à l'exposition au Cd seul est plus élevée que celle relative à l'exposition au Cd en mélange, avec des indices d'accumulation de respectivement 0,083L.g⁻¹.d⁻¹ et 0,067L.g⁻¹.d⁻¹ (Tableau 10). D'autre part, les concentrations de Cd dans les tissus d'*E. affinis* témoins étaient inférieures à la limite de détection. Cette bioaccumulation

linéaire de Cd chez *E. affinis* a aussi été observée chez certaines espèces de crustacés comme les copépodes calanoïdes ; *A. tonsa*, *Calanoïdes acutus* (Kahle et Zauke, 2002a; Pavlaki et al., 2017) et les amphipodes antarctiques *Chaetogammarus marinus* et *Paramoera walkeri* (Clason et al., 2004 ; 2003).

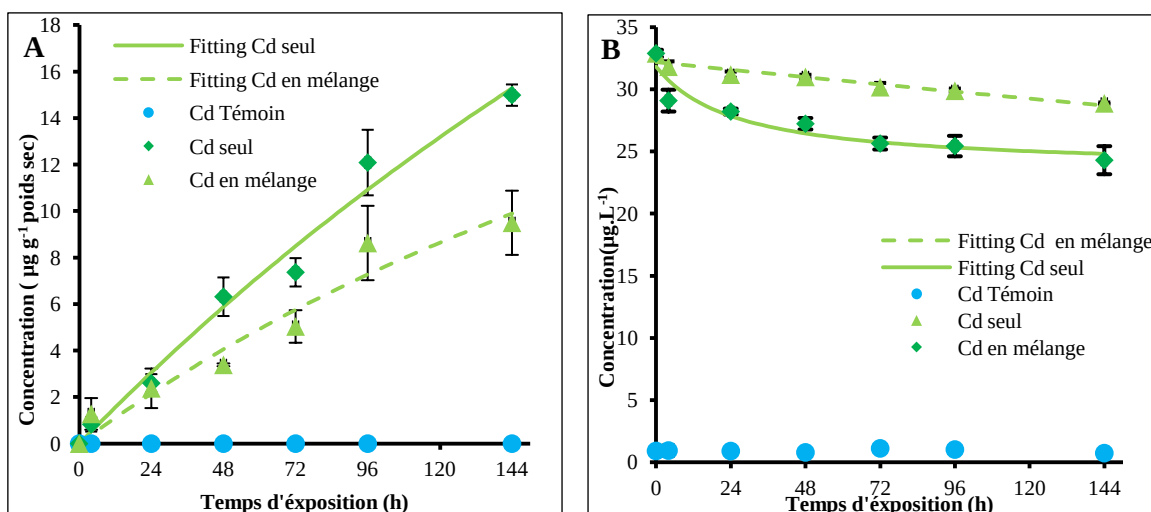


Figure 16. Accumulation (A) au niveau du copépodes *E. affinis* exposés et concentration résiduelle (B) du cadmium testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. Les symboles bleus représentent le niveau de bioaccumulation chez les copépodes témoins.

Ce profil d'accumulation est dû à un manque d'élimination du Cd par l'organisme. En effet, les crustacés ne peuvent réguler leur concentration corporelle en métaux non essentiels tels que le Cd; ce qui conduit à une élimination lente du Cd et une capacité de stockage élevée (M. D. Pavlaki et al., 2017) ; Rainbow, 1984; 1998).

2.2. Bioaccumulation du Ni et concentration résiduelle dans le milieu

En ce qui concerne la cinétique de l'accumulation du Ni (Figure 17), les profils d'accumulation sont statistiquement différents ($p < 0,01$) pour les deux traitements seuls et en mélange. En effet, dans le cas du traitement au Ni seul, l'accumulation atteint après seulement après 24 heures d'exposition une valeur de concentration élevée de $22,83 \mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec (Figure 17). Bien qu'une rapidité d'accumulation soit remarquée dans les premiers temps d'exposition, l'accumulation de ce métal essentiel atteint rapidement un plateau et

progressivement la valeur moyenne limite de $28,33\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec (Figure 17) signe d'une saturation de l'accumulation.

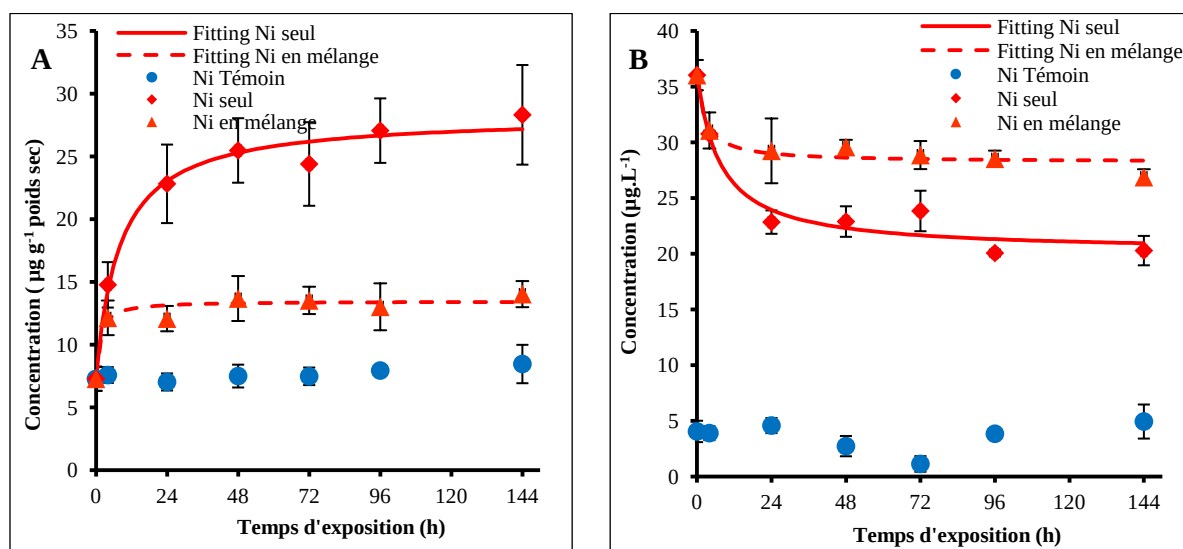


Figure 17 . Accumulation (A) au niveau du copépode *E. affinis* exposés et concentration résiduelle (B) du nickel testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. (Matière sèche ; ms). Les symboles bleus représentent le niveau de bioaccumulation chez les copépodes témoins

L'accumulation du Ni au niveau des copépodes *E. affinis* exposés au mélange de métaux atteint presque la valeur moyenne seuil de concentration de $13,69\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec juste après un jour d'exposition. Comme précédemment, l'accumulation atteint une concentration limite dès les premières heures d'exposition qui n'augmente pas de manière significative tout au long du temps d'exposition (Figure 17A). La différence entre les valeurs des taux d'accumulation des deux traitements mesurés se retrouve dans les indices d'accumulation ($0,085 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (Ni seul), $0,018 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ (mélange Ni, Cu, Cd) (Tableau 10).

Parallèlement, ces cinétiques croissantes de concentrations d'accumulation sont inversement proportionnelles aux concentrations résiduelles dans l'eau. Les pourcentages de diminution sont au final de 43,71% dans le traitement seul et 25,40% dans le traitement en mélange (Figure 17B). Dans les copépodes témoins, nous notons des concentrations de Ni qui allant de $2,99\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec après 24 h de culture à $2,91\mu\text{g.g}^{-1}$ poids sec à la fin de l'expérience (144h).

2.3. Bioaccumulation du Cu et concentration résiduelle dans le milieu

Les données de l'accumulation de Cu présentées dans (Figure 18) montrent une augmentation graduelle des concentrations accumulées au fil du temps que ce soit pour les copépodes *E. affinis* exposés à une solution renfermant uniquement du Cu ou un mélange de Cu, Ni et Cd qui atteint un plateau après 72 h d'exposition. Les concentrations maximales de Cu atteintes sont respectivement de 67,66 et 50,19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec pour les copépodes *E. affinis* exposés au Cu seul ou au mélange Cu, Ni et Cd. Notons, qu'une légère diminution est observée à la fin de l'expérience. Alors que, les concentrations dans le témoin restaient relativement stables tout au long de l'expérience avec une valeur de 16,54 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ poids sec après 144h d'exposition.

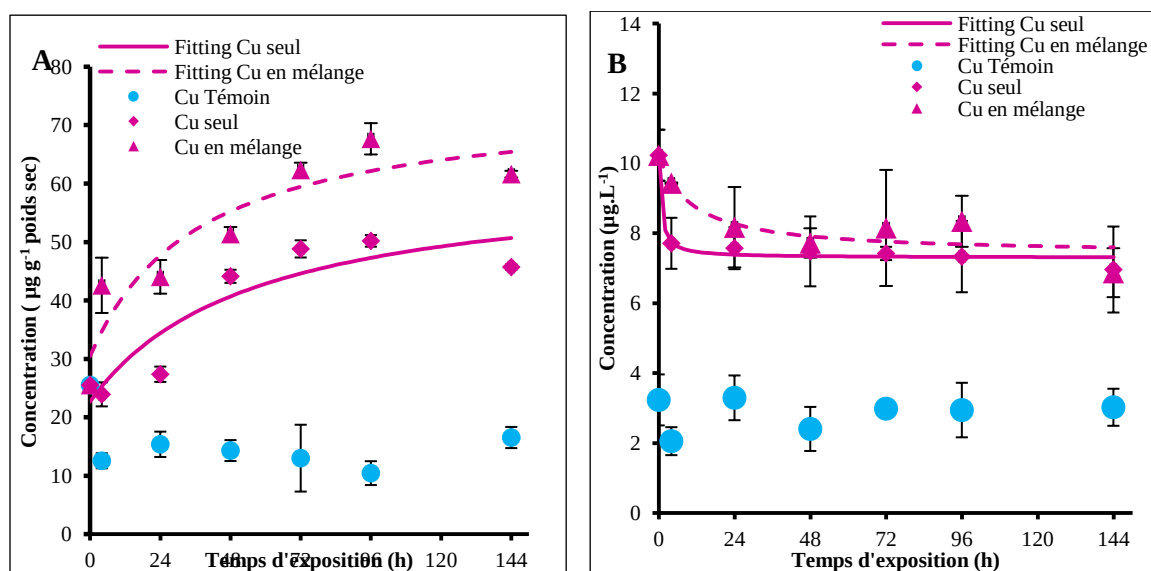


Figure 18. Accumulation (A) au niveau du copépode *E. affinis* exposés et concentration résiduelle (B) du cuivre testé seul et en mélange à la concentration de 1/3 de la CL50 pendant une durée de 144h. (Matière sèche ; ms). Les symboles bleus représentent le niveau bioaccumulation chez les copépodes témoins.

Contrairement au Cd et au Ni, l'accumulation est plus importante dans le cas du traitement en mélange que dans le traitement seul avec des indices d'accumulation respectivement de 0,7178 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ et 0,5755 $\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (Tableau 10). Comme attendu, une diminution progressive dans l'eau la concentration de ce métal non essentiel est enregistrée pour les deux traitements. A la fin de l'exposition elle est de 31,96% (Cu seul) et 32,84 (Cu en mélange) (Figure 18).

Ces cinétiques d'accumulation des métaux traces dans les copépodes *E. affinis* associées aux cinétiques de diminution des concentrations en solution de ces métaux démontrent clairement

que *E. affinis* accumule, au fil du temps, des concentrations significativement élevées de métaux traces tel que le Cu et le Ni. Leurs indices d'accumulation élevés sont d'ailleurs les témoins de cette constatation. Des profils similaires d'accumulation du Ni et du Cu ont été rapportés dans les études de [Tlili et al., 2016](#) chez le copépode *Pseudodiaptomus marinus* et de Barka et Amiard-Triquet chez *Tigriopus brevicornis* ([Barka and Amiard-triquet, 2010](#)).

Le plateau atteint lors de l'accumulation de ces métaux traces peut être expliqué par une saturation des sites de liaison à des concentrations accumulées élevées. En effet, les copépodes peuvent accumuler des métaux traces par complexation avec différents types de chélateurs glutathion, métallothionéines (MT) et acides aminés ([Rainbow, 2007](#)); [Roesijadi et Robinson 1994](#)). Ces chélateurs ont une forte affinité pour les métaux en raison de leur richesse en groupes thiols. La séquestration dans les granules du système lysosomal par complexation et stockage est une voie majeure de détoxification ([Rainbow, 2007 ; Viarengo et al., 1987](#)).

Bien que le phénomène de la bioaccumulation soit bien étudié pour les métaux seuls ([Croteau et Luoma, 2007 ; Jakob et al., 2017; Kahle, 2002; Kahle et Zauke, 2003a; Luoma et Rainbow, 2005; Manimaran et al., 2012; Rainbow et Luoma, 2011 ; Tlili et al., 2016](#)), la littérature concernant la bioaccumulation des métaux en mélanges reste limitée. L'analyse comparative des cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Cu et du Ni dans les copépodes montre nettement des différences selon la nature de l'exposition : Métal unique ou métaux en mélange. En effet, le Cd et le Ni s'accumulent plus rapidement et en concentration plus importante lorsque les copépodes sont exposés aux métaux seuls contrairement au Cu. De plus, ce dernier s'accumule plus chez d'*E. affinis* que le Cd puis le Ni. Cet ordre d'accumulation est vraisemblablement dû à la complexation compétitive entre les trois métaux et aux interactions subséquentes des métaux avec des protéines détoxifiantes telles que les métallothionéines (MT) ([Wang et al., 2018](#)). Cet ordre (Cu, Cd puis Ni) relatif aux concentrations d'accumulation n'est pas en accord avec celui trouvé dans d'autres études ([Wang et al., 2018](#)) travaillant sur le développement d'un modèle d'interaction multi-métal chez *Daphnia magna* qui montre que le Cd a une plus grande affinité pour les MT suivi de Pb et Cu.

3. Réponses aux métaux traces

3.1. Réponses des individus des stades de développement aux métaux traces

Dans cette expérimentation un grand nombre d'individus de la population d'*E. affinis* en culture a été utilisé. Le comptage initial de la fraction de la population retenue sur un tamis de taille 200µm montre une structure de la population composée de 4% nauplii, 48% copépodites, 11% pré-adultes et 37% d'adultes. L'effet des trois métaux traces sur la structure de la population et plus précisément sur les différents stades du cycle de vie d'*E. affinis* est présenté dans la (Figure 19). Les résultats montrent qu'après 72h d'exposition (50% du temps total d'exposition) à différents métaux, testés seuls et en mélange, que la structure de la population est affectée négativement et selon des intensités différentes.

Comme le révèle la (Figure 19A), le nombre de nauplii par litre est significativement ($p < 0,001$) plus faibles pour les individus exposés au Cu par rapport au témoin. Le pourcentage de diminution du nombre de nauplii, (Figure 19 B) exposés au Cu est de 47%. Le nombre de nauplii, par litre, exposés aux Ni et aux métaux en mélange est légèrement plus faible que le nombre de nauplii témoin (% de diminution de respectivement 05% et 10%). Inversement, ce nombre de nauplii par litre est plus important pour la population d'*E. affinis* exposée au Cd (% d'augmentation de 22%). Cette augmentation peut s'expliquer par une éventuelle éclosion.

En ce qui concerne les copépodites, la diminution du nombre d'individus exposés aux trois métaux seuls et à leur mélange est significative ($p < 0,001$) par rapport au témoin (Figure 19). Cette diminution est aussi plus intense dans le cas du cuivre avec un pourcentage de 44%. Alors que les pourcentages de diminution de copépodites, exposés aux Cd, Ni et au mélange des trois métaux sont respectivement 8%, 15%, 23% (Figure 19B).

Comme clairement montré dans la Figure 19A, le nombre des préadultes par litre est significativement ($p < 0,001$) très touché pour les individus exposés aux trois métaux séparément par rapport au témoin. En effet, les diminutions du nombre de préadultes sont de 58%, 64% et 66% respectivement pour le Ni, Cu et Cd, par rapport au groupe témoin. Pour le traitement en mélange, malgré que le nombre des individus est aussi affecté mais sa diminution reste moins faible que les autres traitements (% de diminution est de 45%).

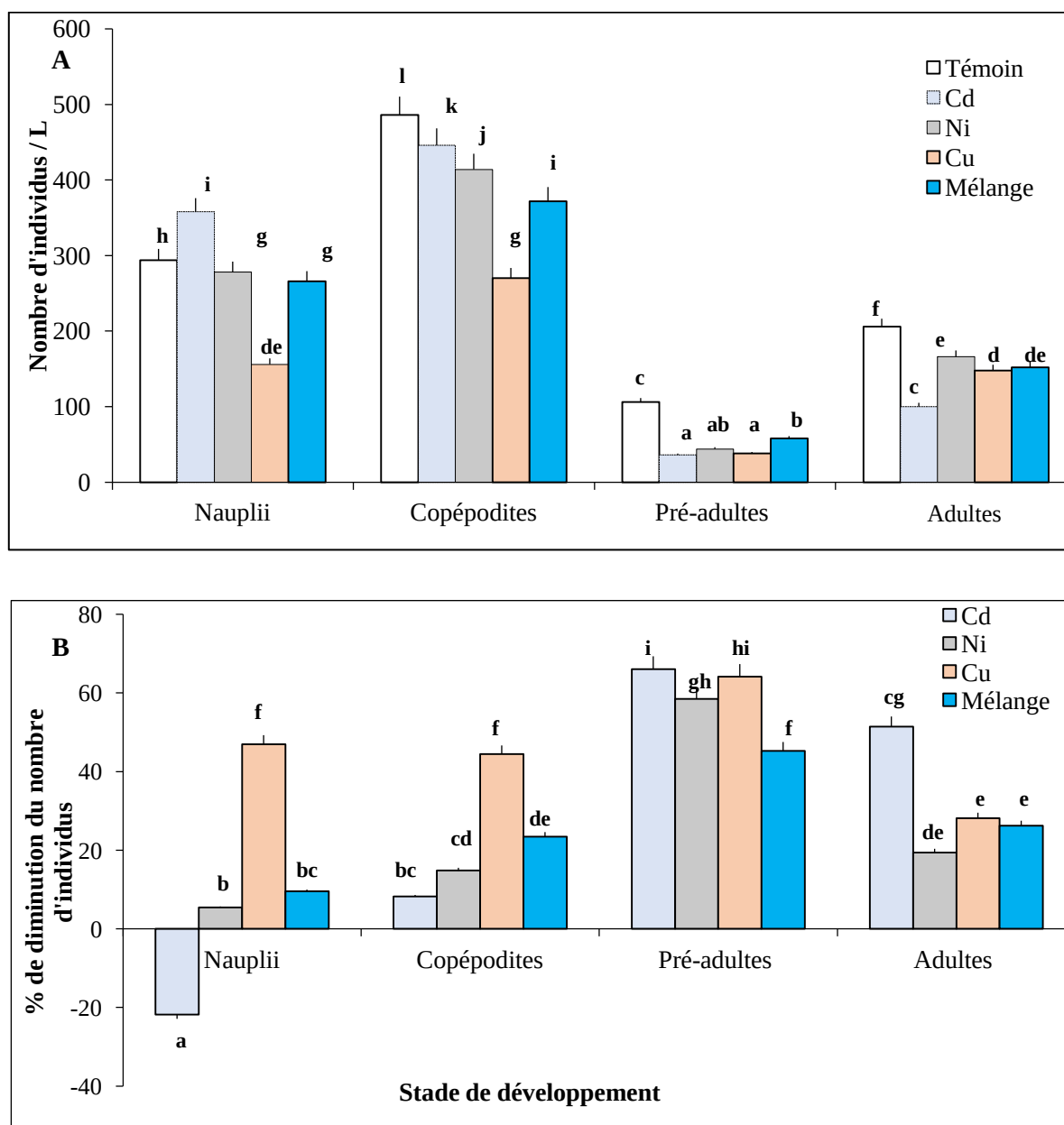


Figure 19 .Effet des métaux traces sur les stades de développement d'*E. affinis* après 72h d'exposition (50% du temps total d'exposition). **A** : nombre d'individus par litre, **B** : pourcentage de diminution du nombre d'individus. Par l'analyse anova Rcommander, Les valeurs sont présentées sous forme de moyennes $\pm$ écart-type ($n = 3$), Les barres d'histogramme annotées avec des lettres différentes diffèrent de façon significative ($p < 0,05$).

D'après les résultats obtenus (Figure 19A et B) , nous remarquons que le nombre des adultes exposés au Cd est significativement plus faible que le nombre dans le témoin ($P < 0,001$). De plus ce groupe d'adultes a montré une sensibilité importante par rapport aux autres traitements ; Ni, Cd et le mélange des trois métaux. La mortalité des adultes (Figure 19B)

exposés au Cd est de 51%. La mortalité des adultes exposés aux Ni, Cu et aux métaux en mélange est presque similaire, elle est de respectivement 19%, 28% et 26%.

3.2. Réponses sexe-spécifiques aux métaux traces

Les résultats qui concernent la viabilité des copépodes (*E. affinis*), à différents stades de maturité et en fonction du sexe, après l'exposition aux différents métaux (Cd, Cu et Ni) seuls ou en mélange sont présentées dans la (Figure 20 A et B). Ainsi après 72h d'exposition aux trois métaux, seuls et en mélange, la viabilité des adultes et des pré-adultes des deux sexes diminue significativement lorsqu'elle est comparée à celles du groupe témoin.

D'autre part, la viabilité des pré-adultes femelles exposés au Ni et au Cu est significativement plus faible que celui des mâles pré-adultes avec un pourcentage de diminution de respectivement 74% et 79% comparé au groupe témoin alors que le nombre de femelles adultes exposées au Ni n'est significativement pas différent ($p > 0,05$) par rapport au nombre du groupe témoin.

Pour les adultes des deux sexes, l'évolution est différente. Le nombre d'individus femelles est significativement faible dans le cas du Cd et du Cu seul ($p < 0,001$) tandis que le nombre de mâles montre une diminution significative au traitement des métaux en mélange comparé au Cu et au Ni seul ($p < 0,001$). Inversement, le nombre d'individus exposés au Cd est plus faible que celui des individus exposés au mélange.

En ce qui concerne les femelles ovigères, après 72 heures d'exposition au Cd et au Ni seul, leur nombre diminue considérablement par rapport à celui du groupe témoin. Inversement, aucun effet n'est relevé dans le cas de l'exposition de ces femelles ovigères au mélange des 3 métaux.

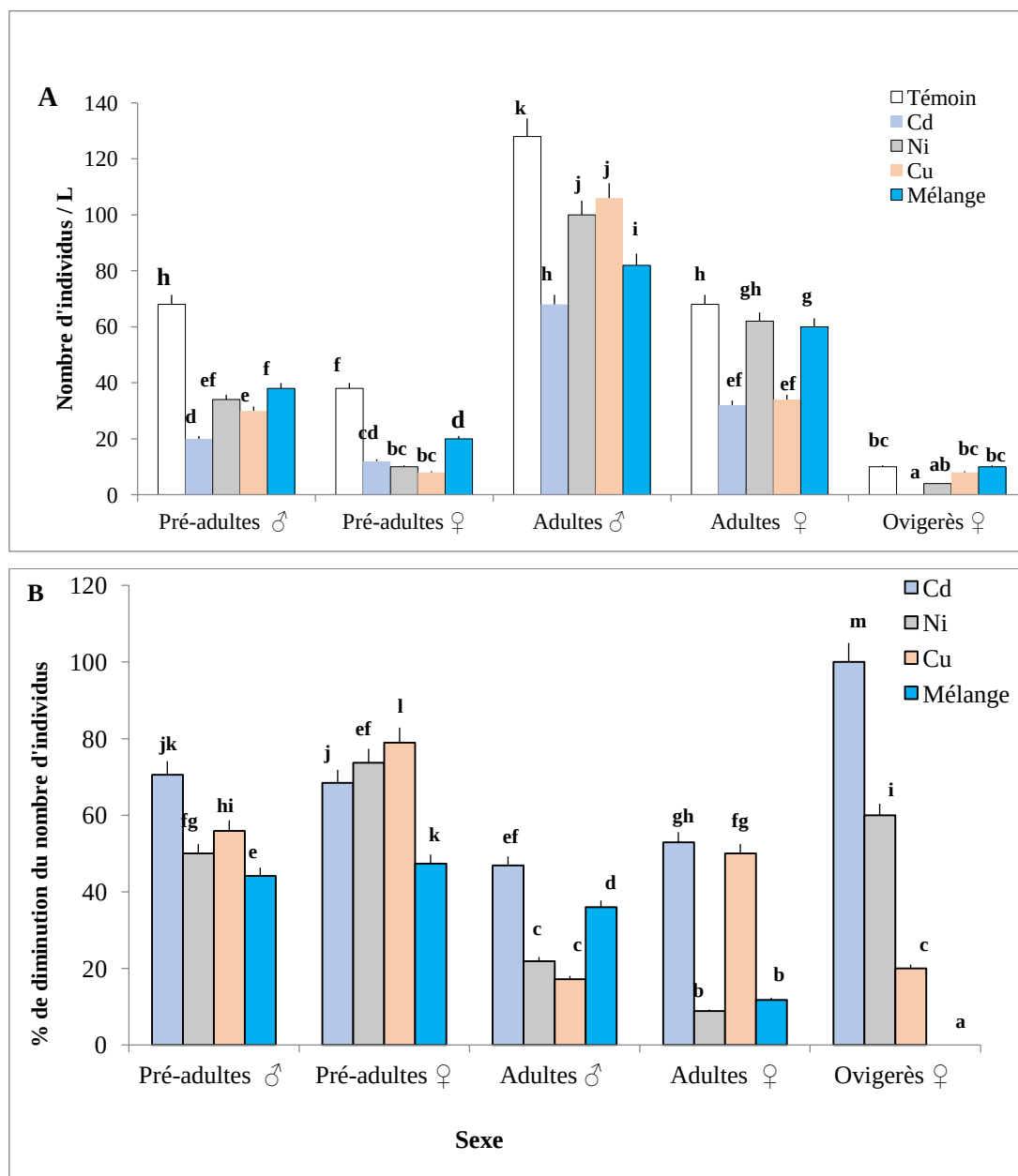


Figure 20 . Effet des métaux traces sur la viabilité de mâles et femelles d'*E. affinis* après 72h d'exposition (50% du temps total d'exposition). A : nombre d'individus, B : pourcentage de diminution du nombre individus. Les valeurs sont présentées en tant que moyennes $\pm$ SD (n = 3) Les barres d'histogramme annotées avec des lettres différentes diffèrent de façon significative ($p < 0,05$) test anova.

D'une manière globale, en comparant l'effet des traitements seuls du Cd, Ni et Cu par rapport au traitement en mélange des trois métaux sur l'évolution de la population, nous constatons que le traitement du mélange des trois métaux étudiés ne se distingue pas par un effet

remarquable, au contraire il a le même effet (cas des adultes) ou moins (cas pré-adultes des deux sexes) que les traitements seuls. Ceci peut s'expliquer par absence d'effet synergique de toxicité des trois métaux en mélange.

Selon ces résultats, le Cd, le Cu et le Ni seul et en mélange induisent un effet toxique sur *E. affinis* qui conduisent à des mortalités respectives de 14,29%, 43,96%, 17,40% et 22,34%. Le Cu est l'élément le plus toxique de trois métaux utilisés seuls. Nos résultats sont partiellement en accord avec ceux de Jiang *et al.* relatifs à l'espèce *A. pacifica* qui montrent que le Cu seul induit une mortalité élevée totale de 46,6% et une mortalité de 31,5% pour le Cd seul après 3 jours d'exposition (Jiang *et al.*, 2007). L'exposition des individus au mélange des 3 métaux n'induit pas, quel que soit le sexe ou le stade, de toxicité additive pour *E. affinis* contrairement à ce qui a été rapporté par Meyer *et al.* vis-à-vis de mélanges de Cu et de Zn qui pourraient induire une toxicité additive ou une toxicité supplémentaire chez *Daphnia magna* (Meyer *et al.*, 2015).

Les métaux traces sont reconnus pour leurs effets toxiques à la fois dans l'environnement et sur les organismes marins (Berasategui *et al.*, 2017 ; Florence *et al.*, 1994 ; Luoma *et al.*, 1995 ; Zyadah et Abdel-Baky, 2000 ; Niebor et Templeton, 1994 ; Ghosal et Kaviraj, 2001, 2002). En conséquence, la contamination peut réduire le potentiel de recrutement des nauplii des copépodes et ainsi diminuer le succès des éclosions. La contamination peut également augmenter la mortalité aux stades nauplii ou copépodites. L'impact de la contamination varie alors avec la concentration en métaux, la durée d'exposition et l'espèce (Jiang *et al.*, 2007; Kadiene *et al.*, 2017; Mohammed *et al.*, 2011).

De la même manière, l'étude de Kormans *et al.* relative aux facteurs de stress environnementaux chez *E. affinis* suggère que l'exposition au Zn et au Cu est en grande partie responsable de la réduction des densités de population dans un estuaire contaminé comme l'Escaut (Korsman *et al.*, 2014). En outre, l'étude de Lira *et al.* a montré une sensibilité similaire avec une diminution de la densité de population du nématode marin *Rhabditis (Pellioditis) marina* lorsqu'elle est exposée au Cd (Lira *et al.*, 2011).

3.3. Réponses de la flore totale aux métaux traces

L'évolution quantitative de la flore totale des copépodes a également été suivie de manière cinétique au cours du temps d'exposition aux solutions de métaux seuls ou en mélange. La Figure 21 expose les courbes de survie du nombre de bactéries (Log de g UFC.mL⁻¹) au cours de l'exposition. Bien que la diminution de la charge bactérienne aérobie (figure 21, courbe bleue) relative à l'échantillon témoin décroisse d'un Log et de manière quasi linéaire au cours de l'expérimentation, l'effet des traitements seuls et du mélange sur la charge bactérienne aérobie est globalement négatif pour atteindre des valeurs faibles, comprises entre $5,77 \pm 1,2$ et $6,06 \pm 0,1$ Log de g UFC.mL⁻¹, après 96h d'exposition. Ces diminutions du nombre de bactéries sont significativement différentes entre les expérimentations d'exposition aux métaux traces seuls et à celles d'exposition au mélange de métaux et d'exposition de contrôle ($p < 0,01$).

En effet, la charge microbienne chez les copépodes *E. affinis* exposés au Ni seul (figure 21, courbe rouge) décroît d'une manière linéaire pour atteindre une valeur planchée de $5,27 \pm 0,41$ Log du nombre de bactéries par mL⁻¹ au bout des 144h d'exposition. La charge microbienne des copépodes d'*E. affinis* exposés au Cd seul (Figure 21, courbe verte) augmente légèrement au début de l'expérience pour atteindre une valeur haute de $6,74 \pm 0,25$ Log du nombre de bactéries par ml à 48h d'exposition puis diminue progressivement jusqu'à la fin de l'expérience pour finalement atteindre $5,6 \pm 0,02$ Log du nombre de bactéries par ml au bout des 114h d'exposition. Contrairement au Cd et au Ni, le nombre total de bactéries aérobies des copépodes exposé au Cu (Figure 21, courbe jaune) diminue considérablement dès les 1^{ère} 48h d'exposition pour atteindre $5,93 \pm 0,36$ Log du nombre de bactéries par ml. Cette charge reste ensuite stable jusqu'à la fin de l'expérience.

Quel que soit le temps d'exposition, le mélange des trois métaux lourds semble avoir moins d'effet que les éléments séparés. La charge totale bactérienne aérobie (Figure 21, courbe noire) diminue progressivement à une valeur finale de $6,06 \pm 0,39$ Log du nombre de bactéries par ml puis ré-augmente légèrement ($6,2 \pm 0,05$ Log du nombre de bactéries par ml).

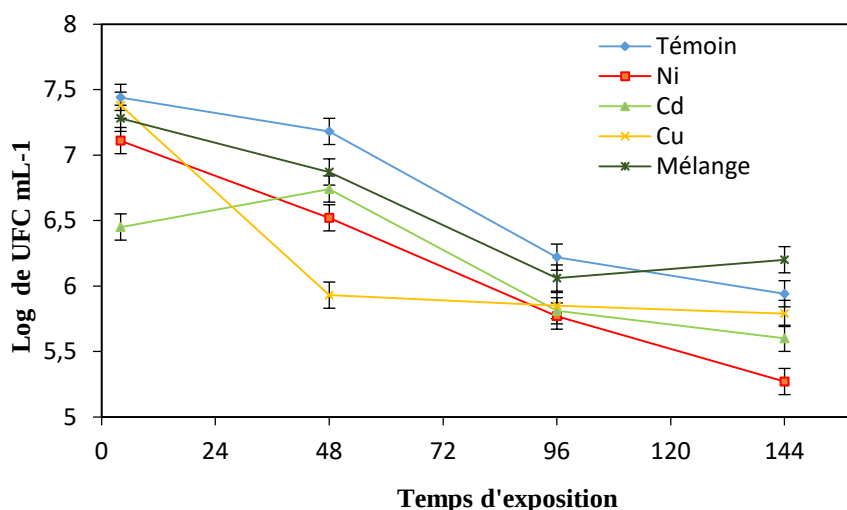


Figure 21 . Évolution de la flore aérobie totale chez les copépodes *E. affinis* exposés à 1/3 de CL_{50} de Ni, Cu, Cd seul et en mélange.

La charge bactérienne dans toutes les cultures de copépodes exposées aux métaux Cd, au Ni et au Cu seul et en mélange est affectée au même titre que la population d'*E.affinis* elle-même. Le Cu exerce un effet négatif supérieur à celui du Cd et du Ni. De même, comme pour la population, le traitement en mélange des trois métaux n'a pas montré un effet synergique sur l'évolution de la charge bactérienne.

Bien que le nombre des études sur l'effet des métaux lourds sur les populations microbiennes soit restreint, certains auteurs ont signalé que les métaux lourds, sous diverses formes dans l'environnement, peuvent produire des changements significatifs dans les communautés microbiennes et leurs activités (Hiroki, 1994, 1992 ; Doelman et al., 1994 ; Guzzo et al., 1994 ; Starzecka et Bednarz, 1993).

Certains métaux sont essentiels pour les micro-organismes à une concentration relativement faible (Co, Cu, Zn, Ni) en tant que cofacteurs vitaux pour les métalloprotéines et les enzymes (Eiland, 1981 ; Doelman et al., 1994). Cependant ces métaux lourds exercent à plus forte concentration dans l'environnement une action inhibitrice sur les micro-organismes en bloquant les groupements chimiques fonctionnels essentiels, en déplaçant l'équilibre des ions métalliques essentiels ou en modifiant les conformations actives des molécules biologiques (Li et Tan, 1994 ; Wood et Wang, 1983 ; Doelman et al., 1994).

**Chapitre II. Etude de la diversité
microbienne de la chaine trophique
des larves de la daurade**

Sparus aurata

En plus de la contamination métallique, les organismes aquatiques sont souvent exposés à d'autres dangers tels les contaminants biologiques. Ces derniers peuvent engendrer d'intenses mortalités dans les systèmes aquacoles. En conséquence, des traitements préventifs ou curatifs sont souvent mis en place et sont en partie associée à des méthodes d'identification améliorées de souches pathogènes.

Traditionnellement, le référencement par méthodes phénotypique et biochimique de toutes les espèces de la flore totale de ce milieu est rendu difficile de par le temps nécessaire à sa réalisation mais aussi de par la difficulté de discrimination des espèces étroitement apparentées. Depuis récemment, la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS fournit une méthode simple, rapide et rentable pour identifier un nombre important de bactéries dans un temps réduit. Cette étude a permis de mettre à profit les capacités d'identification de la cette technique basée sur la spectrométrie de masse afin d'évaluer et de comparer ses performances vis-à-vis des méthodes conventionnelles, dont la biologie moléculaire.

Dans ce chapitre nous nous intéressons à évaluer la diversité microbienne de la chaîne trophique des larves de la daurade *Sparus aurata*. Les matrices étudiées sont l'eau de mer des différents endroits de la station d'expérimentation d'aquaculture du Laboratoire d'Océanologie et de Géoscience, LOG de Wimereux et de la station d'expérimentation Nausicaa de Boulogne sur mer, les micro-algues et les copépodes d'*A. tonsa*.

1. Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT)

Par définition, la flore mésophile aérobie totale (FMAT) est un indicateur sanitaire important. Elle regroupe l'ensemble des microorganismes se développant en présence d'oxygène à une température optimale de 30°C. En effet, une FMAT élevée représente un risque de présence de germes pathogènes (Bougeois et Leveau, 1996). Le dénombrement de cette flore a été effectué, pour les différentes matrices à savoir l'eau de mer, les micro-algues et les œufs de copépodes, par la méthode d'étalement classique sur un milieu gélosé non sélectif. Les résultats obtenus exprimés en unités formant colonies (UFC) par millilitres sont présentés dans la (Figure 22).

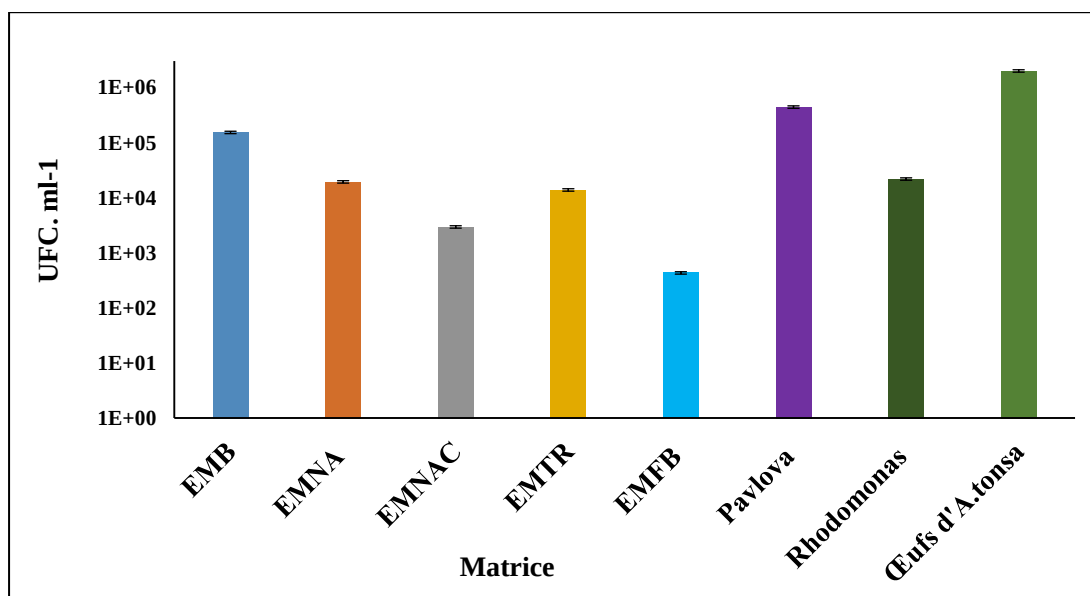


Figure 22. Densités moyennes de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) des trois matrices ; eau de mer, micro-algues et les œufs du copépode *Acartia tonsa*. EMB : eau de mer brute, EMNA : eau de mer Nausicaa., EMNAC : eau de mer Nausicaa cuve, EMTR : eau de mer cuve de réserve, EMFB : eau de mer filtre biologique.

Dans le cas des matrices d'eau de mer, les densités relevées relatives aux différents points de prélèvement sont comprises entre $4,31 \times 10^2 \pm 0,04$ et $1,53 \times 10^5 \pm 1,2$ UFC.mL⁻¹. Fort logiquement, la densité microbienne la plus élevée est trouvée dans l'eau de mer brute (EMB). Les faibles densités cellulaires trouvées dans les eaux des autres lieux de prélèvement (EMNA, EMNAC, EMFB et EMTR) comparant à l'eau de mer brute, s'expliquent aisément par les processus de filtration de l'eau effectuée pour assurer une qualité d'eau constante tout au long de l'année.

Les densités microbiennes enregistrées au niveau des microalgues, *Rhodomonas sp* et *Pavlova lutheri*, et des œufs de copépodes d'*A. tonsa* sont élevées avec des valeurs de respectivement $2,18 \times 10^4 \pm 0,92$, $4,4 \times 10^5 \pm 1,34$, et $1,99 \times 10^6 \pm 1,3$ UFC.mL⁻¹. Ce nombre total important de germes trouvés dans les œufs de copépodes est semble-t-il dû au fait que les copépodes sont des hôtes de bactéries (Skovgaard et al., 2015). En effet, les copépodes jouent un rôle important en fournissant des milieux favorables aux bactéries associées, facilitant ainsi la croissance et l'activité bactérienne et augmentant la diversité bactérienne et la migration ou le transfert tout au long de la chaîne trophique (Dziallas et al., 2013; Grossart et al., 2010).

2. Caractérisation phénotypique des isolats

Les résultats détaillés par morphotype sont regroupés dans le Tableau 11 pour information et ne seront pas commentés en détails. En effet, la caractérisation morphologique des isolats obtenus sur la gélose nutritive révèle que sur un total de 434 isolats, 69% ont une forme de bacilles, 21% sont des cocci et 10 % sont des coccobacilles. Concomitamment, 53% des isolats totaux de la chaîne trophique sont des Gram positives et 47% sont des Gram négatives alors que 48% des isolats expriment une activité catalase positive et 52% une activité catalase négative. Les résultats obtenus, montre clairement que la matrice des d'A. tonsa permet d'isoler le plus d'isolats (175 isolats).

Tableau 11. Caractérisation morphologique et biochimique des isolats des trois matrices ; eau de mer, micro-algues et les œufs de copépodes *Acartia tonsa*.

	Eau de mer					Microalgues		Œufs d'A.tonsa
	EMB	EMNA	EMNAC	EMFB	EMTR	<i>Pavlova sp</i>	<i>Rhodomonas sp</i>	
Nombre d'isolats	60	45	53	14	12,50	36	39	175
Bacilles(%)	73,33	73,33	66,04	100	00	61,11	64,10	69,14
Cocci(%)	13,33	20,00	30,19	0	41,67	25,00	25,64	19,43
Coccobacilles(%)	13,33	6,67	3,77	0	8,33	13,89	10,26	11,43
Gram positif (%)	73,33	60,00	83,02	50,00	66,67	58,33	69,23	30,29
Gram négatif(%)	26,63	40,00	16,98	50,00	33,33	41,67	30,77	69,71
Catalase positive (%)	38,33	40,00	33,96	64,29	41,67	44,44	35,90	60,00
Catalase négative(%)	61,67	60,00	66,04	35,71	58,33	55,56	64,10	40,00

3. Identification bactérienne par profilage MALDI-TOF-MS

Le recours aux technologies plus récentes tel le profilage par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS est d'une grande utilité dans le domaine de la microbiologie clinique. Cette technique d'identification bactérienne, est non seulement simple mais rapide et efficace. Elle permet dans le domaine de la recherche, d'identifier plus rapidement les espèces les plus intéressantes.

L'application de cette technique d'identification des bactéries par profilage MALDI-TOF-MS a permis d'identifier 248/434 isolats issus de la chaîne trophique de la daurade *Sparus aurata*. Ainsi, les vingt-deux genres identifiés sont présentés dans le Tableau 12.

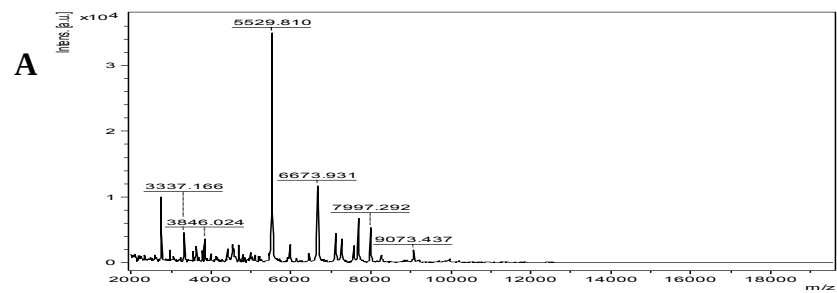
Tableau 12 .Vingt-deux genres identifiés de 248 isolats de la chaîne trophique de *Sparus aurata* identifiés par spectrométrie de masse MALDI-TOF

Genre	Identification BioTyper		
	Nombre de souche	Genre	Espèce
<i>Proteus</i>	23	23	23
<i>Vibrio</i>	54	54	25
<i>Staphylococcus</i>	44	44	35
<i>Morganella</i>	1	1	1
<i>Shewanella</i>	4	4	2
<i>Bacillus</i>	39	39	29
<i>Brevibacillus</i>	2	2	2
<i>Pseudomonas</i>	26	26	16
<i>Halomonas</i>	4	4	1
<i>Dietzianatrono</i>	1	1	0
<i>Micrococcus</i>	3	3	2
<i>Rhodococcus</i>	9	9	3
<i>Microbacterium</i>	23	23	12
<i>Kocuria</i>	1	1	0
<i>Lactobacillus</i>	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	1	0
<i>Achromobacter</i>	4	4	3
<i>Sphingopyxis</i>	1	1	1
<i>Ralstonia</i>	1	1	0
<i>Neisseria</i>	1	1	0
<i>Rhizobium</i>	1	1	0
<i>Rhodotorula</i>	4	4	4

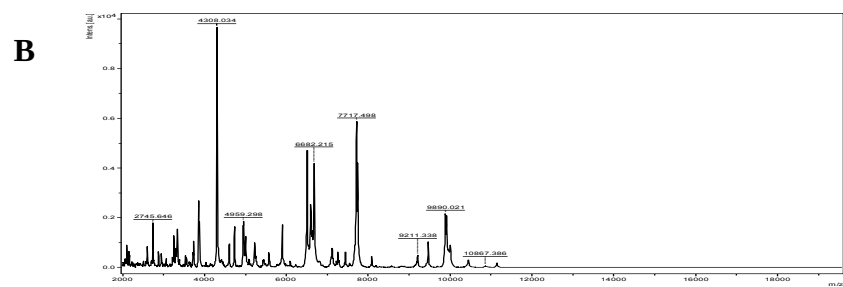
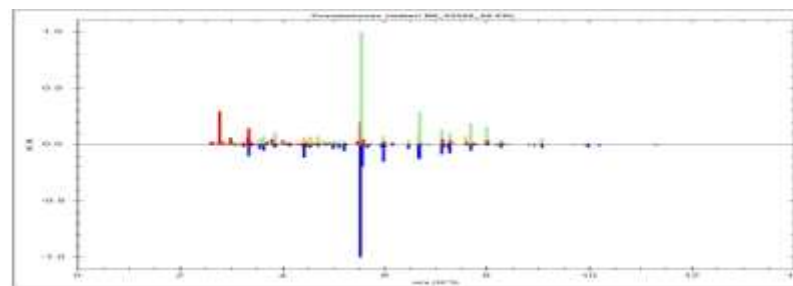
En effet, l'identification par MALDI-TOF-MS de toutes les souches a généré des spectres représentant les masses moléculaires moyennes des protéines les plus abondantes et les mieux ionisées de chaque souche. Ces spectres MALDI-TOF MS expérimentaux obtenus de quelques espèces appartenant aux genres dominants identifiés dans ce travail, diffèrent nettement en termes de nombre et d'intensité des signaux de masse (Figure 23 A, B, C, D, I, J, K et L). Ces spectres de masse obtenus sont ensuite informatiquement comparés aux spectres de masse de la base de données de spectres de référence BioTyper. Ainsi, l'appariement entre les spectres obtenus et les spectres de références est exprimé par BioTyper selon un Log (Score).

Les spectres de bâton en couleur présentés dans la Figure 23 (E, F, G, H, M, N, O et P) éclaircissent l'appariement du profil expérimental MALDI-TOF-MS de la souche (moitié

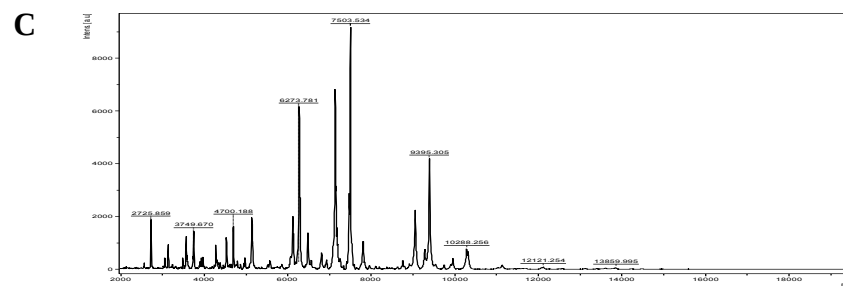
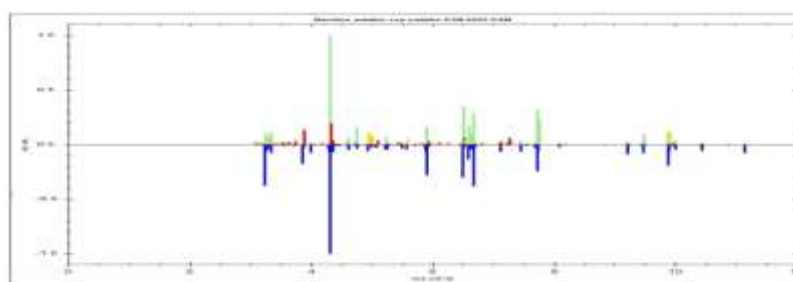
supérieure des spectres de bâton colorés) et les profils correspondants MALDI-TOF MS de la base de données BioTyper (moitié inférieure des spectres de bâton colorés). Le code couleurs associées (vert, jaune et rouge) aux spectres en bâton dans la moitié supérieure montrent le degré de la pertinence de l'appariement du pic (intensité et valeur m/z) entre les profils MALDI-TOF MS expérimentaux et ceux de référence de la base de données. Ce code couleur traduit en Log (scores) prend en compte le nombre de pics correspondants, le nombre total de pics, le poids maximal représentant la spécificité de l'espèce et un facteur de corrélation lié à l'intensité de pic correspondante (Cherkaoui et al., 2010).



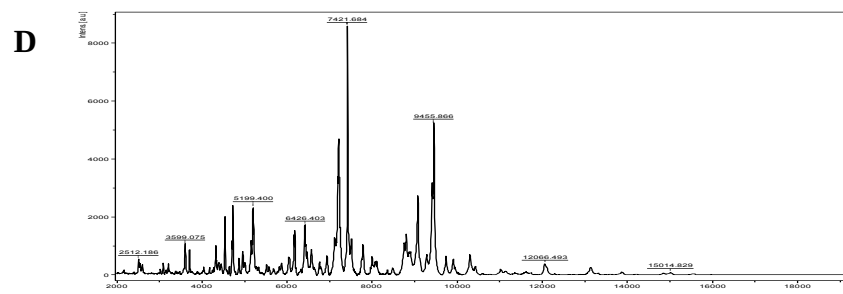
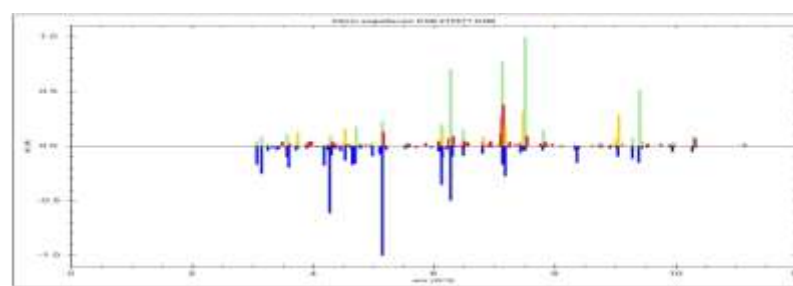
E



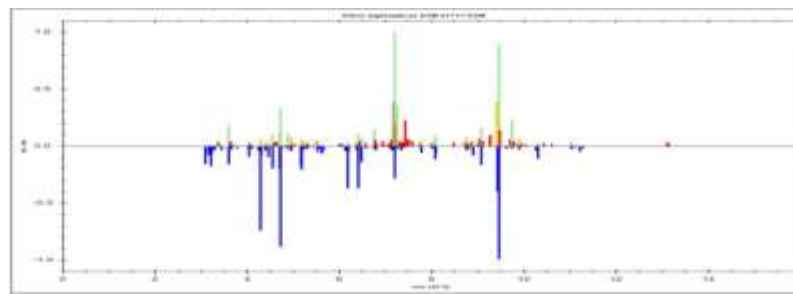
F



G



H



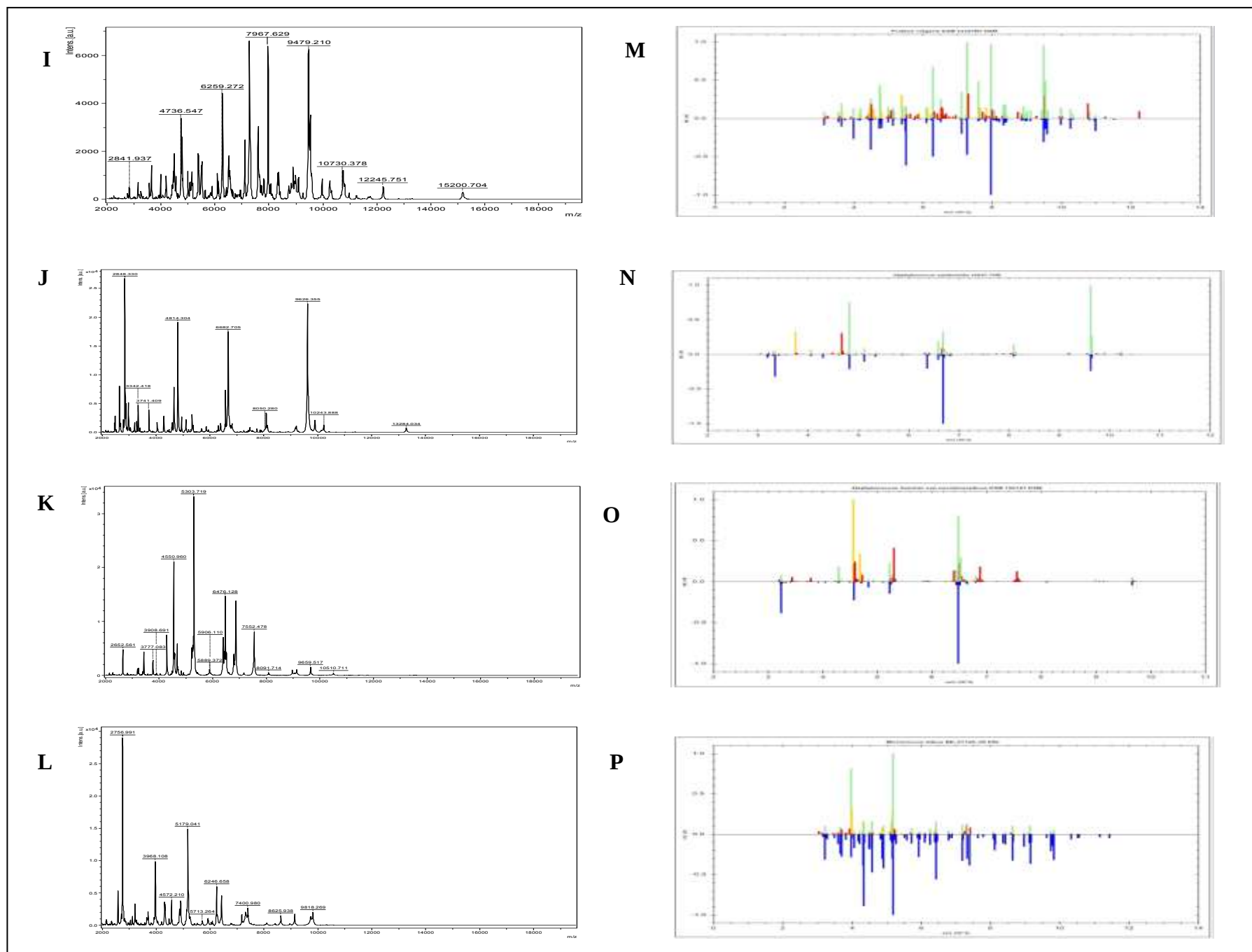


Figure 23. Profils MALDI-TOF-MS bruts panneau gauche (A, B, C, D, I, J, K et L) et les identifications correspondantes de bactéries obtenues à partir de trois colonies distinctes pour chaque souche panneau droit (E, F, G, H, M, N, O et P). Le log (scores) d'identification est de 2,19 (E : *P. stutzeri*), de 2,20 (F : *B. subtilis*), de 2,12 (G : *V. anguillarum*), de 2,07 (H : *V. alginolyticus*), de 2,51 (*Proteus vilgaricus*), de 2,24 (*Staphylococcus épidermidis*), de 2,31 (*S.hominis*) et de 2,18 (*Micrococcus luteus*)

3.1. Microflore de l'eau de mer

Les résultats d'identification bactérienne des 184 isolats d'eau de mer issus des différents points de prélèvements, sont présentés dans le Tableau 13. Plus de 50% de ces isolats (soit un total de 107) sont identifiés par profilage MALDI-TOF-MS. La majorité (76 %) des isolats est identifiée avec certitude au niveau du genre et de l'espèce avec $\log(\text{score}) \leq 3,000$ et $\geq 2,000$ contre 24 % seulement au niveau du genre avec $\log(\text{score}) \leq 1,999$ et $\geq 1,700$. La non-identification des isolats restant est probablement due à l'absence de spectres de masse de référence liés à ces espèces au sein de la base de données Bruker.

Tableau 13 . Bilan d'identification ou de non identification des isolats d'eaux de mer des différents points de prélèvements.

Origine	Codes	Isolats		
		Total	Non identifiés	Identifiés
Canal de la Manche	EMB	60	8	52
Station de Nausicaa	EMNA	45	27	18
	EMNAC	53	24	29
Station de Wimereux	EMFB	14	9	5
	EMTR	12	9	3
Total		184	79	107

L'identification bactérienne par profilage MALDI-TOF-MS des isolats issus de l'eau de mer de tous les points de prélèvement confondus montre une richesse spécifique de la flore bactérienne. Les 107 isolats identifiés appartiennent aux genres suivants : *Proteus* (21,5 %), *Vibrio* (16,8%), *Staphylococcus* (15,9%), *Pseudomonas* (15.9%), *Rhodococcus* (8,4 %), *Microbacterium* (7,5 %), *Achromobacter* (3,7 %), *Brevibacillus* (1,9 %), *Halomonas* (1,9 %), *Micrococcus* (1,9 %), *Dietzia* (0,9 %), *Morganella* (0,9 %), *Shewanella* (0,9 %), *Bacillus* (0,9 %), *Sphingopyxis* (0,9 %). De la même manière, la distribution des espèces bactériennes isolées de l'eau de mer, illustrée dans la Figure 24, montre que les espèces les plus abondantes sont : *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas stutzeri*, *Vibrio anguillarum*, *Rhodococcus facians* et *Staphylococcus epidermidis*.

La majorité des genres isolés de l'eau de mer des différents points de prélèvement font partie de la flore marine naturelle.

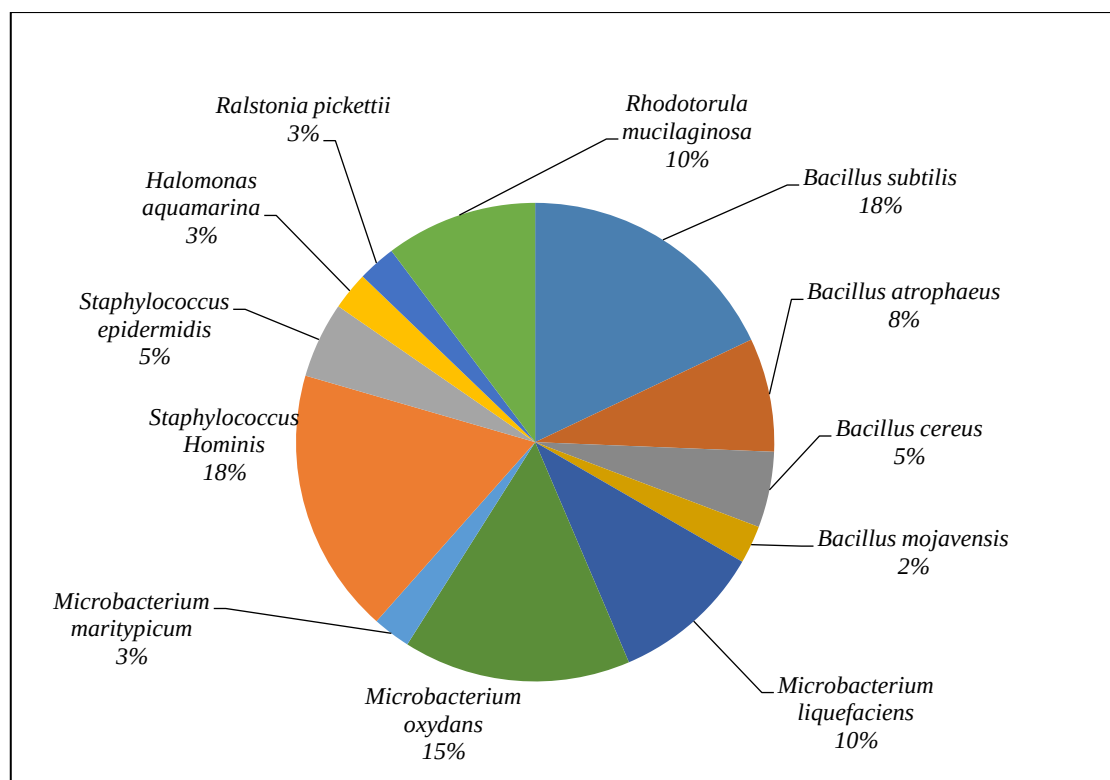


Figure 25 . Distribution des espèces bactériennes isolées des micro-algues des deux espèces (*Pavlova sp* et *Rodomonas sp*) confondues et identifiées par profilage MALDI-TOF-MS.

3.3. Microflore des œufs d'*Acartia tonsa*

Comparativement aux deux matrices décrites ci-dessus, le profilage MALDI-TOF-MS permet d'identifier 58% d'isolats sur un total de 175 isolés des œufs de copépodes d'*A. tonsa*, dont 54% des identifications le sont avec certitude au niveau du genre et de l'espèce pour 46% seulement au niveau du genre. L'identification par profilage MALDI-TOF-MS révèle donc également une grande diversité de souches bactériennes appartenant à douze genres différents ; *Vibrio* (34,31%), *Staphylococcus* (17,64%), *Bacillus* (24,50%), *Pseudomonas* (13,73%), *Shewanella* (2,94%), *Kocuria* (0,98%), *Lactobacillus* (0,98%), *Escherichia* (0,98%), *Halomonas* (0,98%), *Nesseria* (0,98%), *Rhizobium* (0,98%), *Micrococcus* (0,98%) (Figure 26), avec comme genres dominants *Vibrio*, *Staphylococcus* et *Bacillus*.

Parmi les 29 espèces identifiées, les plus dominantes sont : *V. anguillarum* (19 souches), *S. hominis* (10 souches), *B. subtilis* (9 souches), *P. putida* (9 souches), *V. pomeroyi* (6 souches), *S. epidermidis* (6 souches), *B. pumilus* (5 souches) et *B. cereus* (5 souches). En plus de ces espèces dominantes, d'autres telles que *E. coli*, *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens*,

Micrococcus luteus, *Rhizobium radiobacter* et *Neisseria flavescens* ont également été identifiés sans ambiguïté par profilage MALDI-TOF-MS (Figure 26).

Ces genres trouvés dans les œufs d'*A. tonsa* ont été signalés précédemment dans l'étude de Hansen et Bech (1996) mais sur la microflore des pelotes fécales d'une autre espèce de copépode de l'hémisphère Nord, *A. tonsa* (Dana). Elle était dominée par *Bacillus*, *Cytophaga/Flavobacterium*, *Vibrio* et *Pseudomonas*. Ces bactéries se trouvaient principalement attachées à l'exosquelette des copépodes et, dans une moindre mesure, à l'intestin, ainsi qu'à l'intérieur du tissu musculaire squelettique.

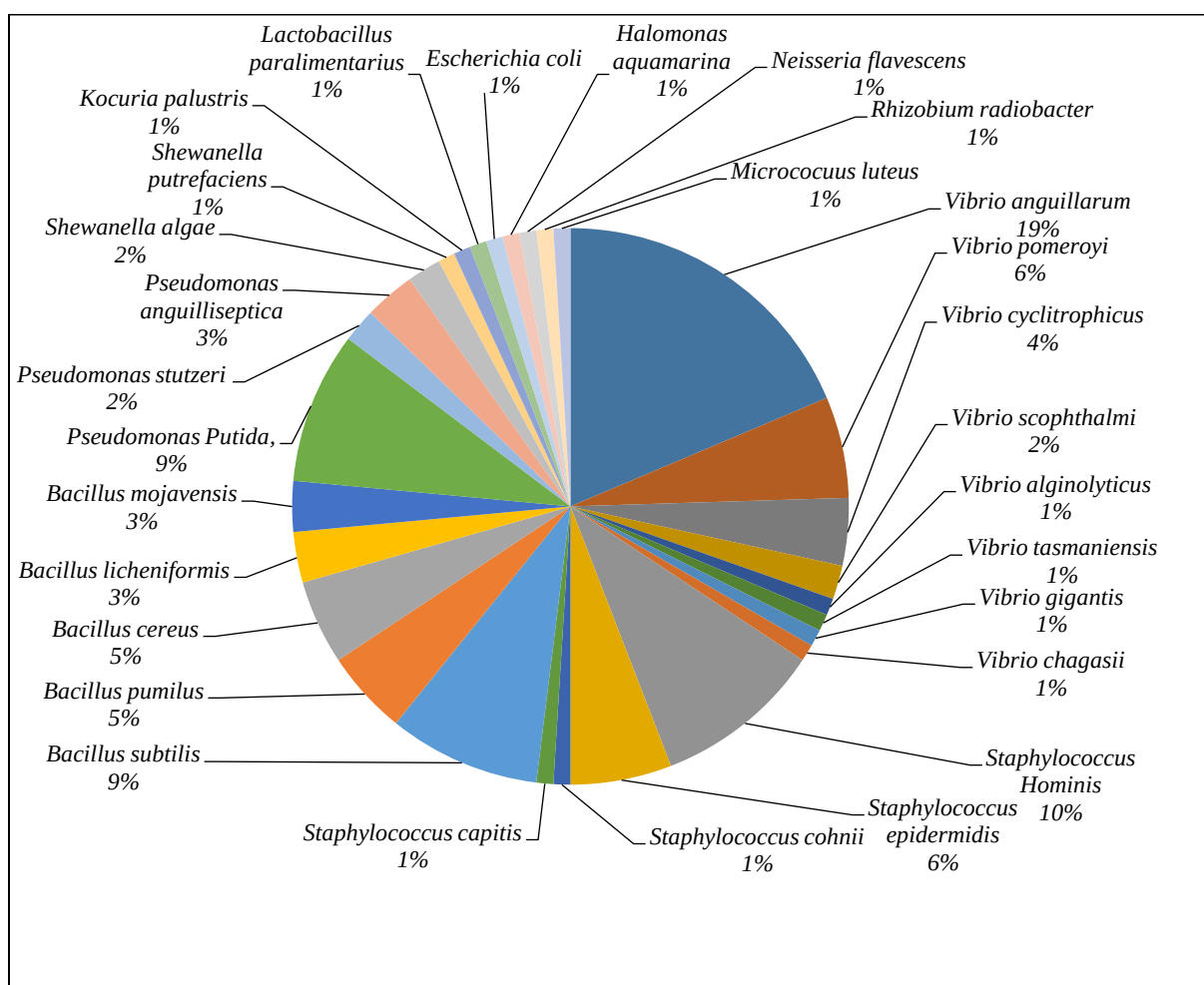


Figure 26 . Distribution des espèces bactériennes identifiées par profilage MALDI-TOF-MS, isolées à partir des œufs de copépode *A. tonsa*.

L'analyse des résultats du profilage MALDI-TOF-MS révèle que les genres les plus dominants pour l'ensemble des matrices sont les *Vibrio* (21,77%), *Staphylococcus* (17,74%), *Bacillus* (15,73%). Les dendrogrammes générés pour les différentes souches de ces genres par

la méthode standard de création de dendrogramme MSP de BioTyper (Figure 27 et Figure 28) montrent une classification hiérarchique des souches et fournissent les relations de similarité entre chacune des espèces détectées.

En effet, la Figure 27 montre que les souches nommées 51COPS, 4C0PS, 57C0POS, 48COPS, 49COPS, 39COPS, 34COPS, 20COPS, 22COPS, 44COPS, 25COPS, 54COPS, 1COPS, 17COPS, 14COPS, 46COPS, 56COPS, 47COPS (couleur verte) sont alignées aux souches de références de la base de données Bruker *Vibrio anguillarum* DSM21597TDSM. Les souches nommées 24EMB, 16EMB, 7EMCOPS, 521EMB, 52EMB, 42COPS, 12COPSH, 18COPS (couleur violette) sont alignées à la souche de référence *V. cyclitrophicus* LMG21359THAM. Alors que les souches nommées 34EMCOPS, 1EMCOPS, 35EMCOPS (couleur rouge) sont alignées à la souche *V. pomeroyi* DSM17180THAM. Pour les nommées 4EMB, 17EMB (couleur bleue) sont alignées à la souche de *V. alginolyticus* DSM2171TDSM.

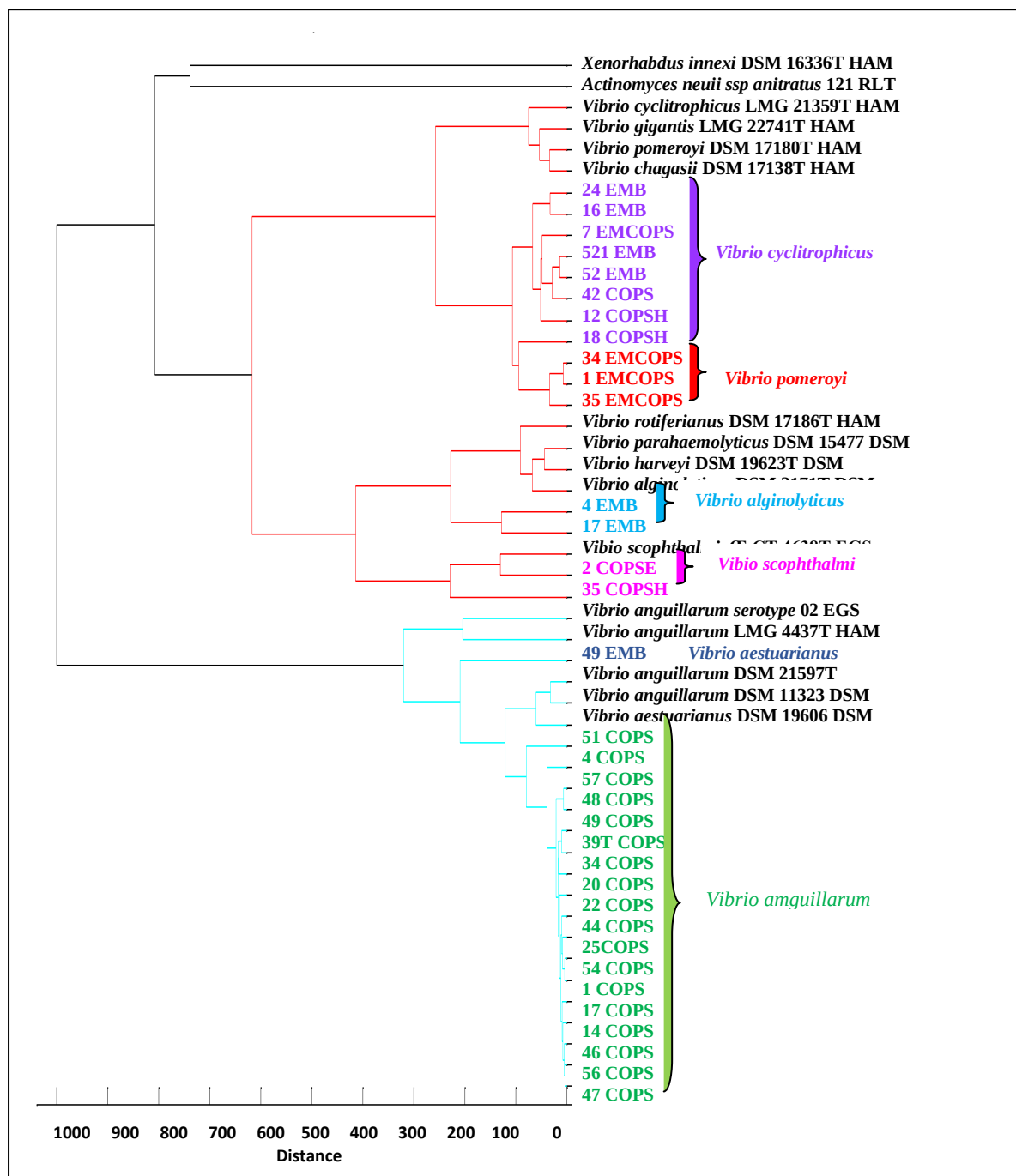


Figure 27. Dendrogramme des profils de spectres de masse MALDI-TOF-MS des souches *Vibrio* isolées à partir d'œufs de copépodes d'*Acartia tonsa* (COPS) et l'eau de mer (EMB). Créés par la méthode standard de création de dendrogramme MSP de BioTyper, version 1.4 avec les paramètres par défaut suivants : mesure de la distance : corrélation ; lien : -300, apparenté-0. Le regroupement a été effectué avec les souches de références de la base de données Bruker. au profil MS de référence de base de Bruker pour *B. pumilus* DSM 13835.

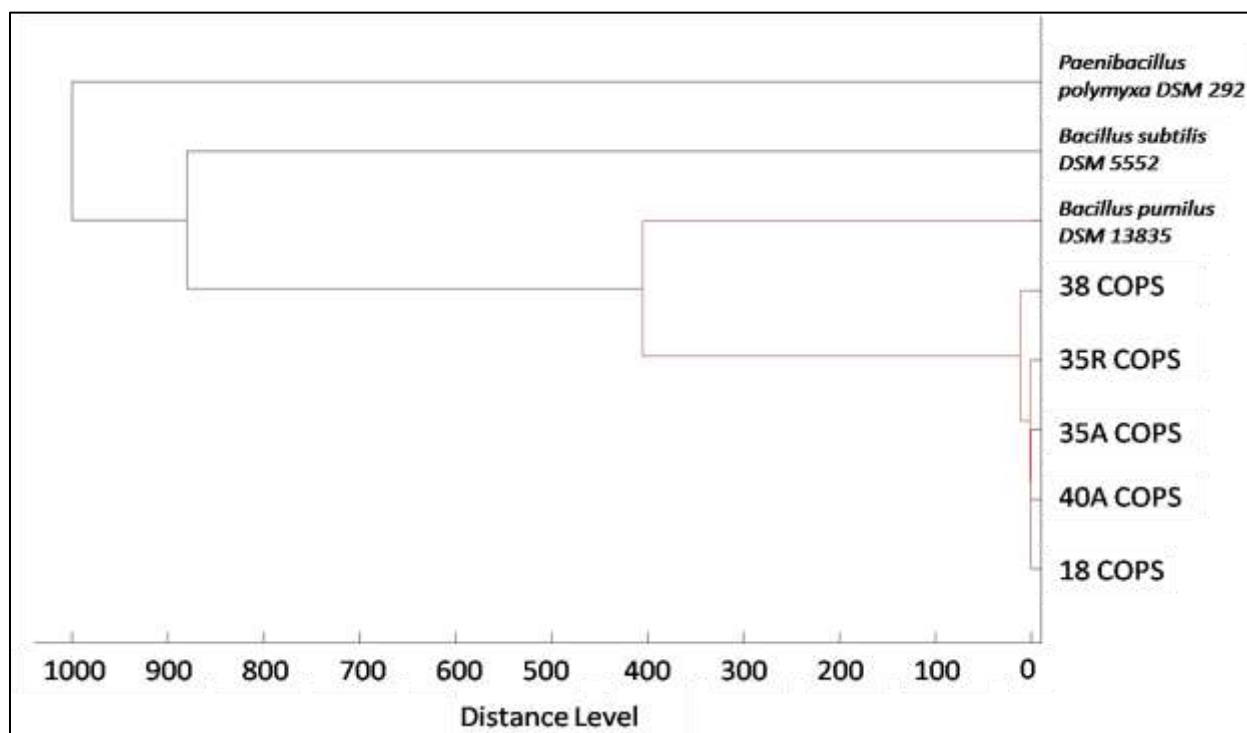


Figure 28. Dendrogramme des profils de spectres de masse MALDI-TOF-MS des souches de *B. pumilus* isolées à partir des œufs d'*A. Tonsa*, créé par la méthode standard de création de dendrogramme MSP de Biotyper, version 1.4 avec les paramètres par défaut suivant: mesure de la distance: corrélation; lien: -300, apparenté-0.

4. Identification par séquençage de l'ADNr 16S

L'analyse du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S), consistant à comparer au niveau génétique les « nouvelles » espèces à des souches dites de référence, est la méthode la plus utilisée pour attribuer une souche bactérienne à un groupe taxonomique. Ce gène procaryote spécifique a été de loin choisi comme marqueur phylogénétique car il est joué un rôle clef dans la traduction et qui est présent dans presque toutes les espèces bactériennes (gène universel).

Parmi les 21 genres identifiés par profilage MALDI-TOF-MS, les plus dominants sont : *Vibrio* (21,77%), *Staphylococcus* (17,74%), *Bacillus* (15,73%). Les souches de ces genres dominants sont confirmées par séquençage de l'ADNr 16S.

4.1. Identification moléculaire de souches de *Vibrio*

L'amplification et le séquençage de l'ADNr (Figure 29) ont identifié les souches 20COPS, 22COPS, 2EMB, 34COPS, 1COPS, 39TCOPS et 49COPS comme *Vibrio anguillarum*. Les séquences d'ADNr 16S ont des scores maximums entre 2202 et 2591 et de valeurs E de 0 et des scores d'identification de 99%. La souche 49EMB est identifiée à 99% comme *V. aestuarianus* et une valeur E de 0 et un score de 2593. Alors que la souche 17EMB est identifiée à 100% comme *V. alginolyticus* valeur E de 0 et un score de 2521.

Cependant l'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S montre que l'ensemble de ces souches est bien affiliée et très proche des souches de références.

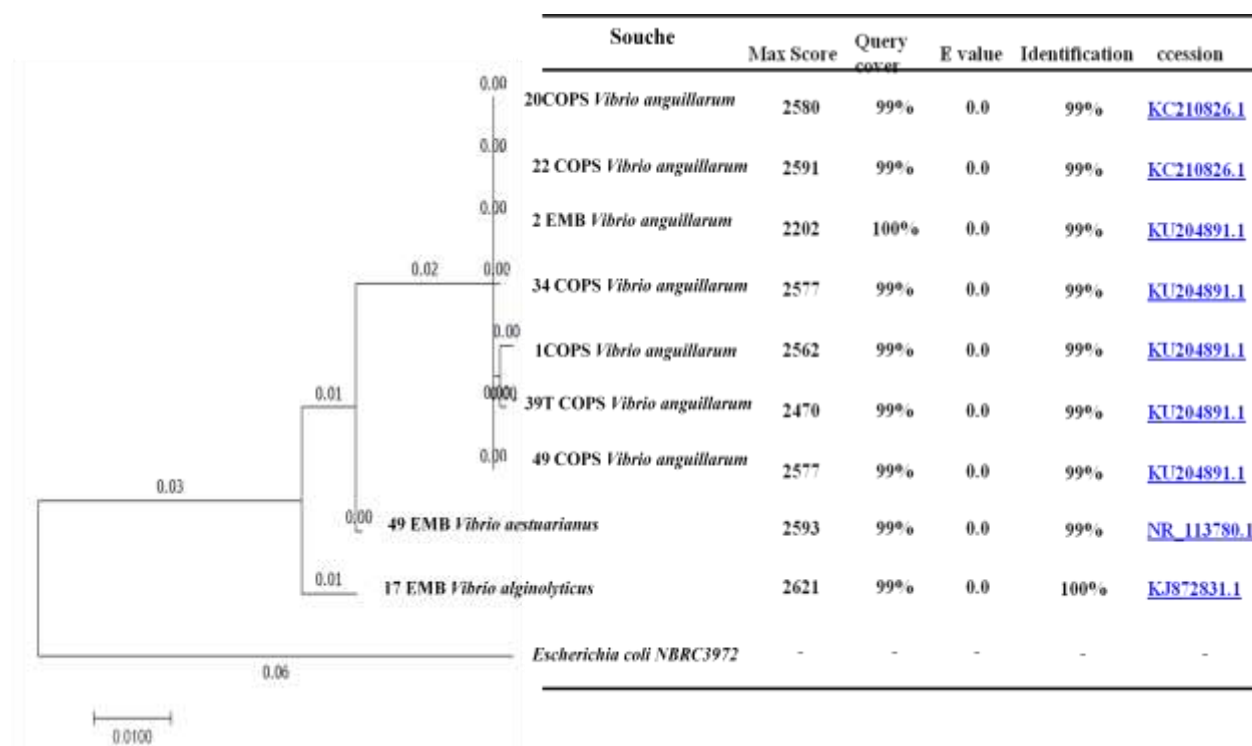


Figure 29 . Arbre phylogénétique et tableau des scores d'alignement des séquences du gène ADNr 16S de souches de *Vibrio* isolées à partir des œufs d'*A. tonsa* et l'eau de mer en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel MEGA 7.

4.2. Identification moléculaire de souches de *Bacillus pumilus*

L'amplification et le séquençage de l'ADNr ont également identifié les souches 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS comme *B. pumilus*. Les séquences d'ADNr 16S sont soumises à Gen bank et les numéros d'accèsion sont respectivement MF692772,

MF692773, MF692774, MF692775 et MF692776 avec des scores maximums entre 1982 et 2617, des valeurs E de 0 et des scores d'identification de 99%.

L'analyse phylogénétique des séquences d'ADNr 16S (Figure 30) montre que ces cinq souches sont affiliées et très proches les unes des autres, à l'exception du 35R COPS souche qui est groupée seule. De plus, les 4 souches 18 COPS, 35A COPS, 38 COPS et 40A COPS semblent constituer un groupe distinct, et semblent affiliées à la souche de référence *B. pumilus* ATCC7061. Il est intéressant de noter que ce groupe est groupé sur la même branche d'où provenait la souche COPS 35R, cette souche formant une ramification isolée. Le score d'identification de 96% pour la souche 35R COPS suggère qu'elle pourrait être d'une nouvelle souche qui ne figure pas dans la base de données du NCBI. Cette découverte nous a conduits à caractériser les métabolites secondaires produits par cet isolat (Chapitre 3. section 4.2).

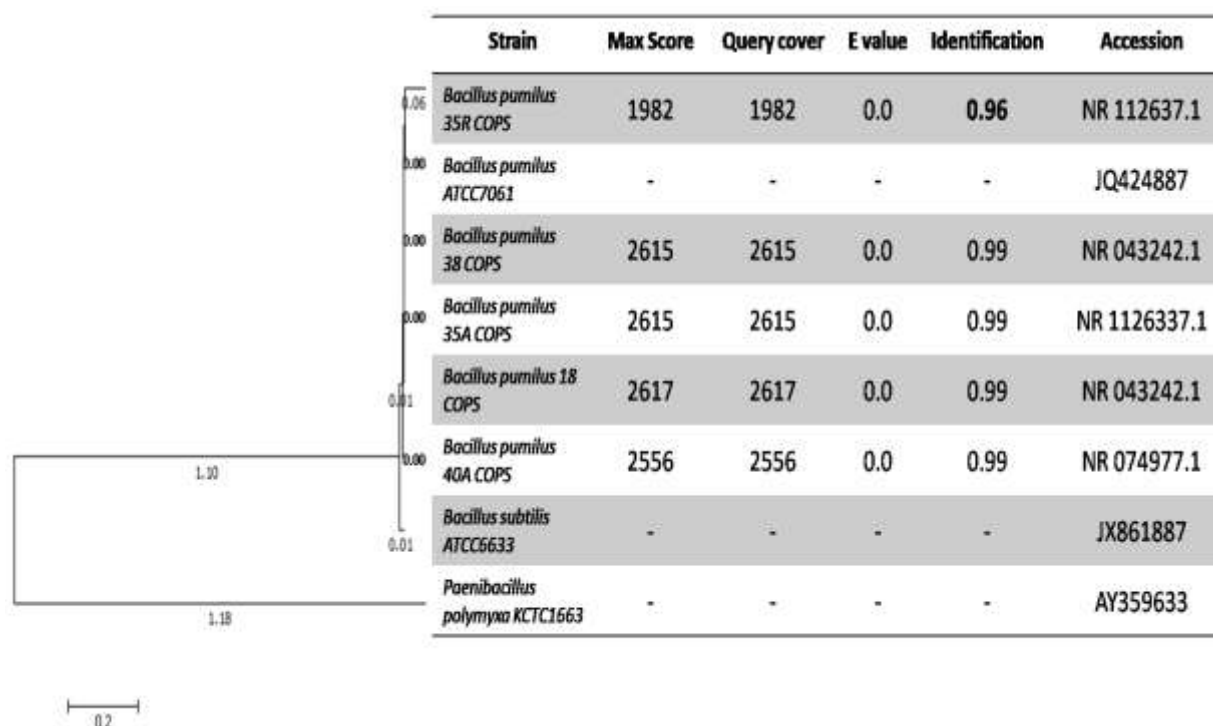


Figure 30 . Arbre phylogénétique et tableau des scores d'alignement des séquences du gène ADNr 16S de souches de *Bacillus pumilus* isolées à partir des œufs d'*A. tonsa* en utilisant le logiciel de nucléotides (BLAST) NCBI, l'arbre généré en utilisant le logiciel MEGA7.

4.3. Identification moléculaire des *Staphylococcus*

Les résultats d'identification par MALDI-TOF-MS ont montré que les souches 8EMB et 27EMB correspondent à *S. warneri*, tandis que 11EMB, 13 EMB et 25EMB correspondent à *S. epidermidis*, *S. hominis* et *S. condimenti*, respectivement. L'identification de ces souches de

Staphylococcus est confirmée par séquençage de l'ADNr 16S. Les résultats obtenus montrent des scores compris entre 1982 et 2617 et des scores d'identification de 100% (Tableau 14). Les séquences d'ADNr 16S sont soumises à Genbank et les numéros d'accèsion des souches EMB2, EMB25, EMB13, EMB11 et EMB8 sont respectivement MH267811.1, MH267810.1, MH 267809.1, MH 267808.1 et MH2678071.

Tableau 14. Scores d'identification moléculaire des séquences du gène l'ADNr 16S des souches de *Staphylococcus* isolées de l'eau de mer.

Code des Souches	Identification de l'organisme	Score max	Score total	Query cover	e value	Identification	Nombre d'accèsion
EMB 8	<i>Staphylococcus warneri</i>	2603	2603	99%	0.0	99%	NR_102499.1
EMB 11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2549	2549	100%	0,0	99%	NR_113957.1
EMB 13	<i>Staphylococcus hominis</i>	1269	1269	100%	0,0	100%	NR_041323.1
EMB 25	<i>Staphylococcus condimentii</i>	734	734	99%	0,0	99%	KC252790.1
EMB 27	<i>Staphylococcus warneri</i>	2597	2597	99%	0,0	99%	KR027924.1

La FMAT, identifiée par profilage MALDI-TOF-MS au niveau des différentes matrices (eaux de mer des tous les points de prélèvements (107 isolats), œufs d'*A. tonsa* (104 isolats), microalgues (39isolats) présente une richesse bactérienne spécifique importante (Tableau 15). Les genres dominants sont *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Micobactérium*, *Proteus*, *Rhodococcus*, *Achromobacter* et *Shewanella*. Cependant, des études dans l'environnement aquatique ont clairement montré la présence de ces genres (Hansen et Bech, 1996 ; Skovgaard et al., 2015 ; Skovgaard et al., 2015).

Bien que les souches isolées puissent avoir pour origine l'environnement (par exemple : eau de mer, copépodes adultes : accouplement, libération d'œufs, pellets fécaux, microalgues), certaines souches identifiées sont des agents pathogènes opportunistes pour les poissons, les humains ou les deux ex *V. anguillarum*, *B. cereus*. Les bactéries inoffensives pour les poissons mais pathogènes pour l'homme (*Listeria*, *Staphylococcus* et *Vibrio*) constituent une menace d'autant plus importante que les poissons vivant dans les eaux polluées porteurs de streptocoques et de coliformes fécaux (Gatesoupe et Lésel, 1998)

Des espèces du genre *Vibrio*, le genre le plus dominant dans cette étude, ont été isolé de façon systématique dans les d milieux marins et estuariens (Colwell et Huq, 1998 ; Kapperud et Jonsson, 1978 ; Colwell et al., 1981; Kaper et al., 1979, 1981 ; Moites et al.,1983). Certaines espèces pathogènes identifiées telles que *V. anguillarum* et *V. alginolyticus* ont été décrites comme responsables des problèmes majeurs en aquaculture (Austin et Newaj-Fyzul, 2017). Pour preuve, une étude plus approfondie sur *V. alginolyticus* rapporte une mortalité chez la daurade d'élevage (*Sparus aurata*).

Les *Pseudomonas* sont des bactéries ubiquitaires, rencontrées surtout dans les eaux douces et marines. Parmi les espèces identifiées *P. anguilliseptica* et *Pseudomonas putida* sont considérées dans plusieurs études comme agents pathogènes affectant une variété d'espèces de poissons (Austin et Austin, 1999 ; Toranzo et al., 2005 ; Wakabayashi et Egusa, 1972).

Le genre *Bacillus* est fréquemment isolé des milieux marins (Ettoumi et al., 2009 ; Miranda et al., 2008). Il peut constituer jusqu'à 20% de la flore hétérotrophe totale du milieu aquatique. Il se distingue dans cette étude par son nombre d'espèces inoffensives, à l'exception de *B.cereus*. Les souches *B. subtilis* et *B. pumilus* résultent comme les espèces les plus dominantes.

A côté de cette flore autochtone adaptée rigoureusement aux conditions de vie marine, une flore accidentelle a été identifiée : c'est le cas des *Staphylococcus*. Naturellement présentes chez l'homme et les animaux à sang chaud, éliminées dans le milieu extérieur, ces bactéries très résistantes sont fréquemment retrouvées dans l'environnement (Ciupek et al., 2002). L'espèce *Staphylococcus epidermidis*, rencontrée dans les différentes matrices étudiées, a préalablement été signalée par Gunn et al. (1982) comme également présente dans l'environnement aquatique.

Tableau 15 . Identification de 248 isolats de la chaine trophique de *Saprus aurata* par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Espèce	Identification Bio Typer								
	Eau de mer*			Micro-algues**			Œufs d'A. tonsa		
	Nombre de souche	Genre	Espèce	Nombre de souche	Genre	Espèce	Nombre de souche	Genre	Espèce
<i>Proteus vulgaris</i>	23	23	23	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio anguillarum</i>	9	9	5	0	0	0	19	19	9
<i>Vibrio pomeroi</i>	0	0	0	0	0	0	6	6	0
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	4	4	4	0	0	0	4	4	1
<i>Vibrio scophthalmi</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	2	2	0	0	0	1	1	1
<i>Vibrio aestuarianus</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio rotiferianus</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>Vibrio gigantis</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Vibrio splendidus,</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vibrio chagasii</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7	7	7	2	2	2	6	6	6
<i>Staphylococcus hominis</i>	2	2	2	7	7	6	10	10	8
<i>Staphylococcus capitis</i>	2	2	2	0	0	0	1	1	0
<i>Staphylococcus cohnii</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Staphylococcus warneri</i>	2	2	2	0	0	0	0	0	0
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0

<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Morganella morganii</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Shewanella algae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	1
<i>Shewanella fidelis</i>	1	1	0	0	0	0	1	1	1
<i>B.pumilus</i>	0	0	0	0	0	0	5	5	5
<i>B.subtilis</i>	0	0	0	7	7	4	9	9	9
<i>B.altitudinis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>B.mojavensis</i>	0	0	0	1	1	0	3	3	1
<i>B.atrophaeus</i>	0	0	0	3	3	1	0	0	0
<i>B.licheniformis</i>	0	0	0	0	0	0	3	3	1
<i>B.cereus</i>	0	0	0	2	2	2	5	5	5
<i>Brevibacillus laterosporus</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Brevibacillus borstelensis</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudomonas Putida,</i>	0	0	0	0	0	0	9	9	4
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	0	0	0	0	0	0	3	3	0
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	12	12	11	0	0	0	2	2	1
<i>Halomonas elongata</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Halomonas aquamarina</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	0
<i>Dietzianatrono limnaea</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	2	2	2	0	0	0	1	1	0
<i>Rhodococcus facians</i>	9	9	3	0	0	0	0	0	0
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	6	6	3	4	4	1	0	0	0

<i>Microbacterium oxydans</i>	2	2	0	6	6	3	0	0	0
<i>Microbacterium maritopicum</i> ,	4	4	4	1	1	1	0	0	0
<i>Kocuria palustris</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Lactobacillus paralimentarius</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Achromobacter Piechaudii</i>	4	4	3	0	0	0	0	0	0
<i>Sphingopyxis terrae</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0
<i>Ralstonia pickettii</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0
<i>Neisseria flavescens</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Rhizobium radiobacter</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	0	0	0	4	4	4	0	0	0

* : Tous les points d'eau de mer confondus, ** : deux espèces de micro-algues confondues.

En plus des différentes espèces bactériennes isolées, une seule espèce de levure a été trouvée chez les micro-algues. Il s'agit de *Rhodotorula mucilaginosa*. Cette levure saprophyte omniprésente a également été isolée d'eaux marines polluées par les déchets ménagers (Ekendahl et al., 2003 ; Hagler et Mendonça-Hagler, 1981). Sa présence a aussi été signalée chez les mollusques comestibles et les crustacés (Eklund et al., 1965). *Rhodotorula spp.* sont des agents pathogènes opportunistes, en particulier chez les individus immunodéprimés émergents (Capoor et al., 2014).

**Chapitre III. Criblage et Caractérisation
de Souches Productrices de Molécules
Antagonistes**

Bien que l'activité aquacole ait connu un grand développement au cours des trois dernières décennies, les maladies infectieuses sont devenues un facteur limitant dans le domaine de l'aquaculture de par l'utilisation de plus en plus importante d'antibiotiques qui a conduit à l'émergence généralisée des résistances aux antibiotiques. Afin de limiter les résistances aux antibiotiques, la réglementation européenne encadre l'utilisation des antibiotiques en aquaculture. De nouvelles stratégies de lutte contre les infections doivent donc être développées. Parmi celles-ci, l'utilisation de microorganismes est une voie prometteuse. Ainsi *B. pumilus* est une bactérie déjà décrite dans la littérature comme productrice de molécules naturelles antimicrobiennes mais aussi comme souche probiotique potentiellement utilisable en l'aquaculture.

Dans ce chapitre, nous avons concentré notre attention principalement sur deux souches de l'espèce *B. pumilus* initialement identifiées par MALDI-TOF-MS. Après avoir évalué leurs activités antibactériennes vis à vis d'une série de bactéries pathogènes, notre travail s'est focalisé sur l'identification des molécules responsables de ces activités antimicrobiennes mais aussi sur l'identification du système génétique codant ces molécules d'intérêt.

1. Sensibilité des souches cibles aux antibiotiques

La sensibilité des souches aux antibiotiques est effectuée conformément aux recommandations de l'European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST, www.eucast.org). Ainsi, toutes les souches de *Staphylococcus* isolées de l'eau de mer ont montré une résistance à l'amoxicilline et à l'imipenem mais une sensibilité à la gentamycine, à l'amikacine, à la ciprofloxacine, à la moxifloxacine, à la lévofloxacine et au chloramphénicol. De plus, les souches *S. epidermidis* 11EMB et *S. hominis* 13EMB étaient résistantes à l'érythromycine et à d'autres antibiotiques tels que la tétracycline (Tableau 16). Quant aux souches de vibrion, toutes les souches isolées dans cette étude ont montré une résistance à l'amoxicilline, à l'érythromycine et à la vancomycine. Plus particulièrement, les souches *V. alginolyticus* (22 COPS) et *V. anguillarum* (19TCOPS, 34COPS, 22COPS) isolées des œufs d'*A. tonsa* ont montré un profil de résistance plus large aux antibiotiques. Comme c'est présenté dans le tableau 17, toutes les souches de *vibrio* ont montré une sensibilité à l'azithromycine, gamithromycine, ciprofloxacine, moxifloxacine, lévofloxacine et marbofloxacine.

Tableau 16. Sensibilité des souches de *vibrio* et de *Staphylococcus* isolées de la chaîne trophique de la daurade contre différents antibiotiques.

Souche	Code	Famille d'antibiotiques																	
		Lactamines		Aminoside		Macrolides		Fluoroquinolones		Glycopeptide	Cycline	Phénicoles		Rifampicine					
		Amoxicilline	Amoxicilline + acide clavulanique	Ceftazidime	Imipénem	Gentamycine	Amikacine	Erythromycine	Azithromycine	Gamithromycine*	Ciprofloxacine	Moxifloxacine	Levofloxacine	Marbofloxacine *	Vancomycine	Tetracycline	Chloramphénicol	Florfenicol *	Rifampicine
<i>V. anguillarum</i>	1 COPS	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R
<i>V. alginolyticus</i>	V ALG	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>CIP 103336</i>																			
<i>V. alginolyticus</i>	17 EMB	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>V. alginolyticus</i>	22 COPS	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>V. anguillarum</i>	19T COPS	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
<i>V. anguillarum</i>	34 COPS	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S
<i>V. anguillarum</i>	22 COPS	R	R	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>S. epidermidis</i>	52 EMB	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
<i>S. condimentis</i>	25 EMB	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. hominis</i>	13 EMB	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
<i>S. warneri</i>	8 EMB	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S
<i>S. warneri</i>	27 EMB	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S

* : Antibiotique à utilisation vétérinaire

S : phénotype sensible ; R: phénotype résistant.

2. Activité antibactérienne des souches de *Bacillus*

Les activités antagonistes *in vitro* des cultures et des surnageants des souches de *Bacillus* sont évaluées vis-à-vis d'un ensemble de souches bactériennes pathogènes cibles, comprenant à la fois des bactéries à Gram-positif et des bactéries à Gram-négatif. Les tests d'antagonisme sont réalisés par les méthodes contact cellulaire et diffusion.

L'activité antagoniste *in vitro* par contact cellulaire montre que les souches de *B. pumilus* 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS ont des activités antagonistes contre *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *S. aureus* ATCC33862 et *Koccuria rizophila* CIP53.4 avec des diamètres de zones d'inhibition compris entre 8 et 16 mm (Figure 31).

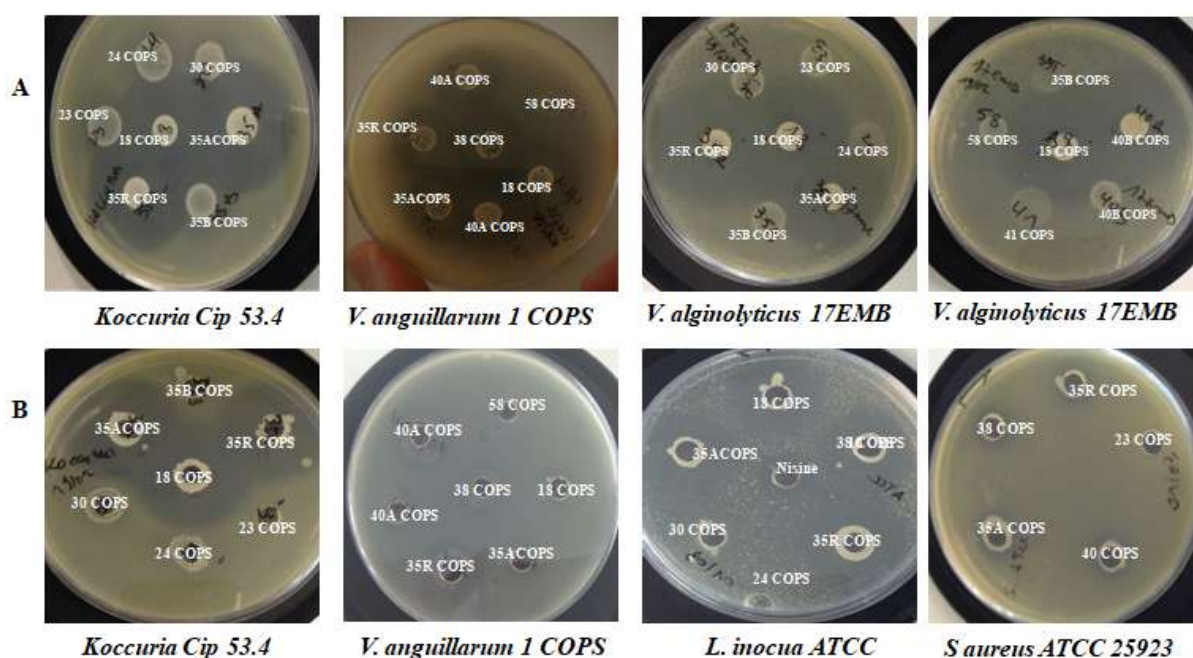


Figure 31. Photographie des activités antibactériennes (A) des cultures évaluées par contact cellulaire et (B) des surnageants (cell free supernatants, CFSs) évalués par diffusion sur gélose, des souches de *Bacillus pumilus* (18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS) et *Bacillus subtilis* (23 COPS, 24 COPS, 30 COPS, 35B COPS, 58 COPS) contre certaines souches pathogènes (*Koccuria* CIP 53.4, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *L. inocua* ATCC et *S. aureus* ATCC33862).

En revanche, les souches de *B. subtilis* testées ne montrent pas d'activité antagoniste pour toutes les souches cibles (Tableau 17). Afin de confirmer l'activité antagoniste de nos souches de *Bacillus* et de déterminer si l'activité antimicrobienne est due à des molécules sécrétées,

l'activité antimicrobienne des surnageants de culture issus de bouillons nutritifs de *B. pumilus* et de *B. subtilis* a été évaluée par la méthode de diffusion. Les résultats sont rassemblés dans le Tableau 18.

Les surnageants de culture des souches de *B. subtilis* ne montrent aucune activité contre notre gamme de pathogènes, y compris les souches de *Vibrio*, *Listeria* et *Staphylococcus*. Contrairement aux surnageants de culture des souches de *B. pumilus* qui montrent aussi des activités contre ces pathogènes (Figure 31 B)

L'activité antagoniste la plus élevée pour les surnageants de culture des souches de *B. pumilus* testées est observée contre *V. alginolyticus* CIP103336 et *V. alginolyticus* 17EMB (isolées de l'eau de mer), pour lesquelles les zones d'inhibition obtenues varient entre 10 et 15 mm, à l'exception de l'activité de *B. pumilus* 40A COPS contre *V. alginolyticus* CIP103336. Une activité antagoniste similaire est observée contre *Listeria innocua* ATCC 51742 et *L. monocytogenes* 157 avec une large zone d'inhibition (10-15 mm). De manière intéressante, ces antagonismes semblent être spécifiques de la souche car aucune zone d'inhibition n'est observée pour les autres souches de *L. monocytogenes* testées (*L. monocytogenes* 158, 161 et 162). Le surnageant des souches de *B. pumilus* présente des activités contre *S. aureus* ATCC 33862, *S. aureus* ATCC 25923 et *V. anguillarum* 1 COPS (isolé à partir d'œufs d'*A. tonsa*) pour lesquels les diamètres des zones d'inhibition obtenues sont proches de 6-8 mm. Ces activités antagonistes sont plus faibles que les activités observées contre les souches de *V. alginolyticus*. Aucune activité n'est observée pour aucune des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline SARM et *S. epidermidis* respectivement.

Tableau 17. Activités antibactériennes, établies par contact cellulaire, des souches de *Bacillus* cultivées en bouillon nutritif.

Souches testées		Pathogènes Gram -										Pathogènes Gram +				
		<i>V. anguillarum</i> 1 COPS)	<i>V. alginolyticus</i> CIP 103336	<i>V. alginolyticus</i> (17 EMB	<i>Kocuria</i> CIP 53.4	<i>L. innocua</i> ATCC 51742	<i>L. monocytogenes</i> 157	<i>L. monocytogenes</i> 158	<i>L. monocytogenes</i> 161	<i>L. monocytogenes</i> 162	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> (MRSA) S1	<i>S. aureus</i> (MRSA) S2	<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
<i>B. pumilus</i>	18 COPS	+	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-
	38 COPS	+	++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	-	-
	35R COPS	+	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	40A COPS	+	++	++	++	+++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	35A COPS	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	181 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	351 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	401 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	411 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	58 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): absence de Zone d'inhibition; +: Zone d'inhibition de 7-10 mm; ++: Zone d'inhibition de 10-15 mm; +++: Zone d'inhibition > 15 mm.

Tableau 18. Activités antibactériennes, établies selon la méthode de diffusion, des surnageants de cultures des souches de *Bacilles* cultivées en bouillon nutritif

Souches testées		Pathogènes Gram -									Pathogènes Gram +					
		<i>V. angularum</i> (1 COPS)	<i>V. alginolyticus</i> CIP 103336	<i>V. alginolyticus</i> (17 EMB)	<i>Kocuria</i> CIP 53.4	<i>L. innocua</i> ATCC 51742	<i>L. monocytogenes</i> 157	<i>L. monocytogenes</i> 158	<i>L. monocytogenes</i> 161	<i>L. monocytogenes</i> 162	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 33862	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>S. aureus</i> (MRSA) S1	<i>S. aureus</i> (MRSA) S2	<i>S. aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
<i>B.pumilus</i>	18 COPS	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	+	++	-	-	-
	38 COPS	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	35R COPS	+	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	40A COPS	+	+	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	35A COPS	+	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	++	++	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	181 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	351 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	401 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	411 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	58 COPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-): absence de Zone d'inhibition; +: Zone d'inhibition de 7-10 mm; ++: Zone d'inhibition de 10-15 mm; +++: Zone d'inhibition > 15mm.

3. Détermination de l'activité hémolytique

L'hémolyse ou la lyse des hématies est par définition la destruction de la membrane plasmique des hématies. Cette propriété des microorganismes se traduit par la formation d'une zone de lyse en présence d'érythrocytes. Cette propriété est facilement détectée lorsque les cellules produisent des molécules de la famille des surfactines (Nakano *et al.*, 1988). Grâce à leur nature amphiphile, ces composants sont des agents tensioactifs qui déstructurent les membranes biologiques par solubilisation des lipides de structures qui les composent.

Comme illustré sur Figure 32, les souches de *B. pumilus* cultivées sur milieu LB complété de 5% de sang de cheval ne montrent pas d'activité hémolytique.

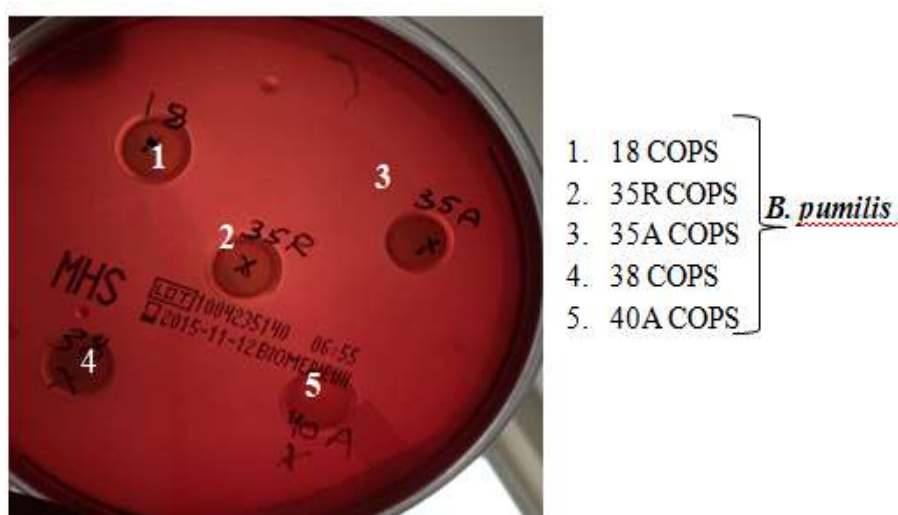


Figure 32. Photographie témoignant de l'absence d'activité hémolytique des souches de *B. pumilus* (1 à 5) .

En effet, l'absence de l'activité hémolytique chez les deux souches de *B. pumilus* ; 35RCOPS et 38COPS ainsi que leur effet antimicrobien remarquable contre une série de souches pathogènes, nous a encouragé à approfondir et caractériser les métabolites secondaires produites par ces deux souches.

4. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche *B. pumilus* 35R COPS

4.1. Détection de la production de lipopeptides et des molécules actives par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS

Dans l'optique de confirmer les résultats concernant les activités des souches de *B. pumilus* par la mise en évidence de la production de molécules potentiellement actives, une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS a été effectuée sur le surnageant des cultures bactériennes sur milieu Landy. Pour exemple, dans la gamme de masse sur charge (m/z) 1000-1130, les spectres de masse révèlent la présence de composés de m/z compris entre 1059,57 et 1117,62 (Figure 33). Ces composés sont détectés en tant qu'ions de type $[M+H]^+$ ou de type $[M+Na]^+$. De plus, les écarts de masse de 14,0x (ou $x = 0, 1$ ou 4) comme mentionnés sur la figure correspondent probablement à une différence d'un CH_2 entre chaque composé. Néanmoins, à ce stade de la caractérisation moléculaire, ceci reste une supposition qui doit être confirmée par des analyses complémentaires.

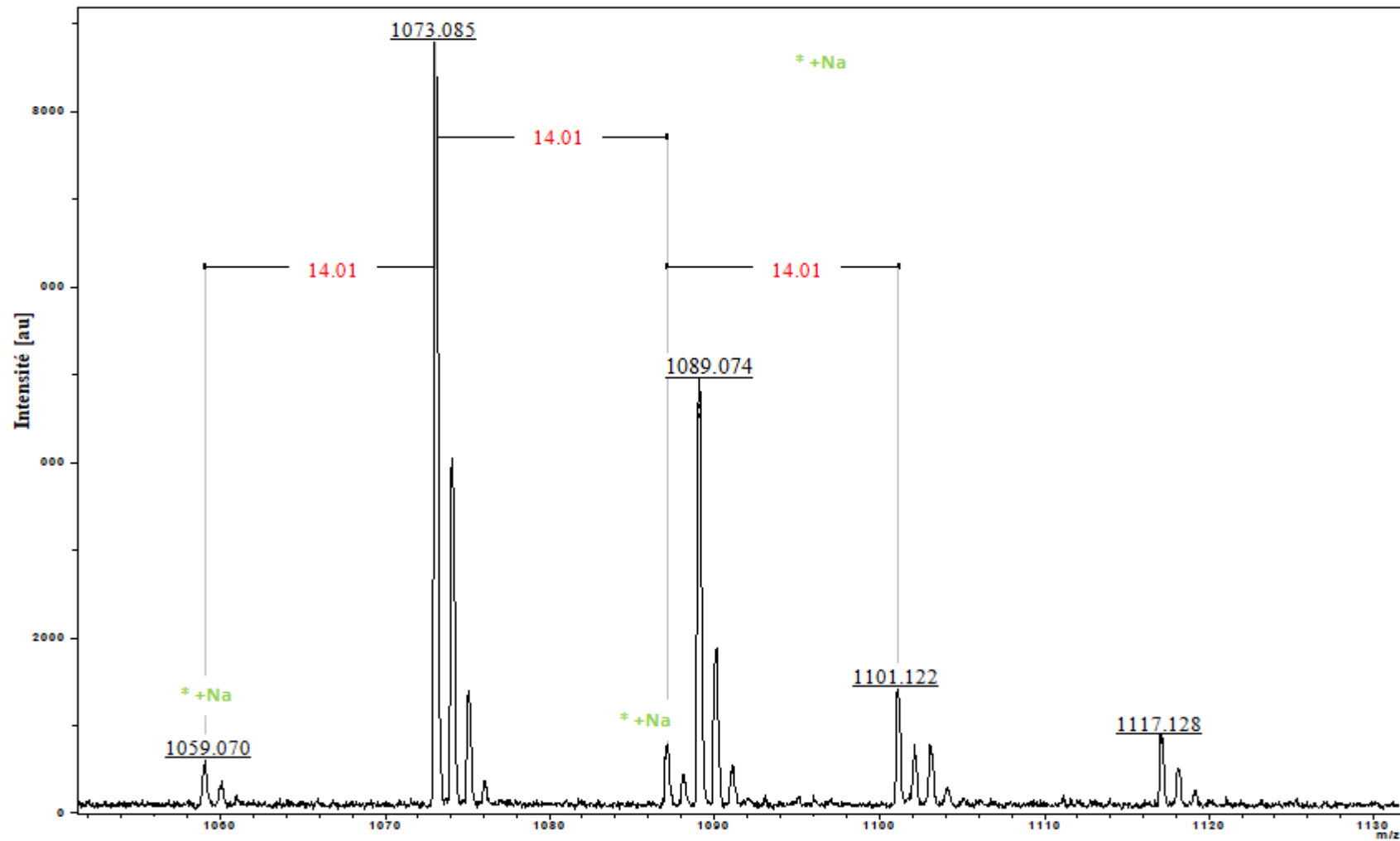


Figure 33. Spectre de masse MALDI TOF obtenu dans la gamme de masse 1000-1130 m/z, des surnageants issus de cultures bactériennes de *Bacillus pumilus* sur milieu Landy.

4.2. Caractérisation des métabolites secondaires par HPLC-MS/MS

La souche *B. pumilus* 35R COPS présente une activité antagoniste différente de celle de la souche 23 COPS. Alors, une stratégie analytique différentielle au niveau des molécules produites par ces 2 souches a été mise en place afin d'identifier plus rapidement les molécules d'intérêt : les molécules communes ne présentant pas d'intérêt contrairement aux molécules spécifiques à une souche.

Les chromatogrammes de type *base peak intensity* (BPI) normalisés à 5×10^6 ions pour une comparaison plus aisée des chromatogrammes BPI sont représentés respectivement dans Figure 34(A, B). Les profils chromatographiques révèlent la présence de nombreux composés comme le montre le nombre de signaux de masse ($\approx$ pics) détectés. Le chromatogramme BPI correspondant au surnageant de culture de *B. subtilis* 23 COPS peut être divisé en trois zones : i) la région 1-20 min correspond à des composés peu hydrophobes et ne montre que quelques pics, ii) la région 20-35 min où 2-3 pics très peu intense apparaissent et iii) la région 35-58 min qui correspond à la zone d'élution des lipopeptides selon Kalinovskaya et *al.*, (2002). Dans ces régions du chromatogramme BPI, 7 signaux de masse ont été détectés et correspondent à différentes isoformes de la surfactine. Ces isoformes sont listées dans le Tableau 19.

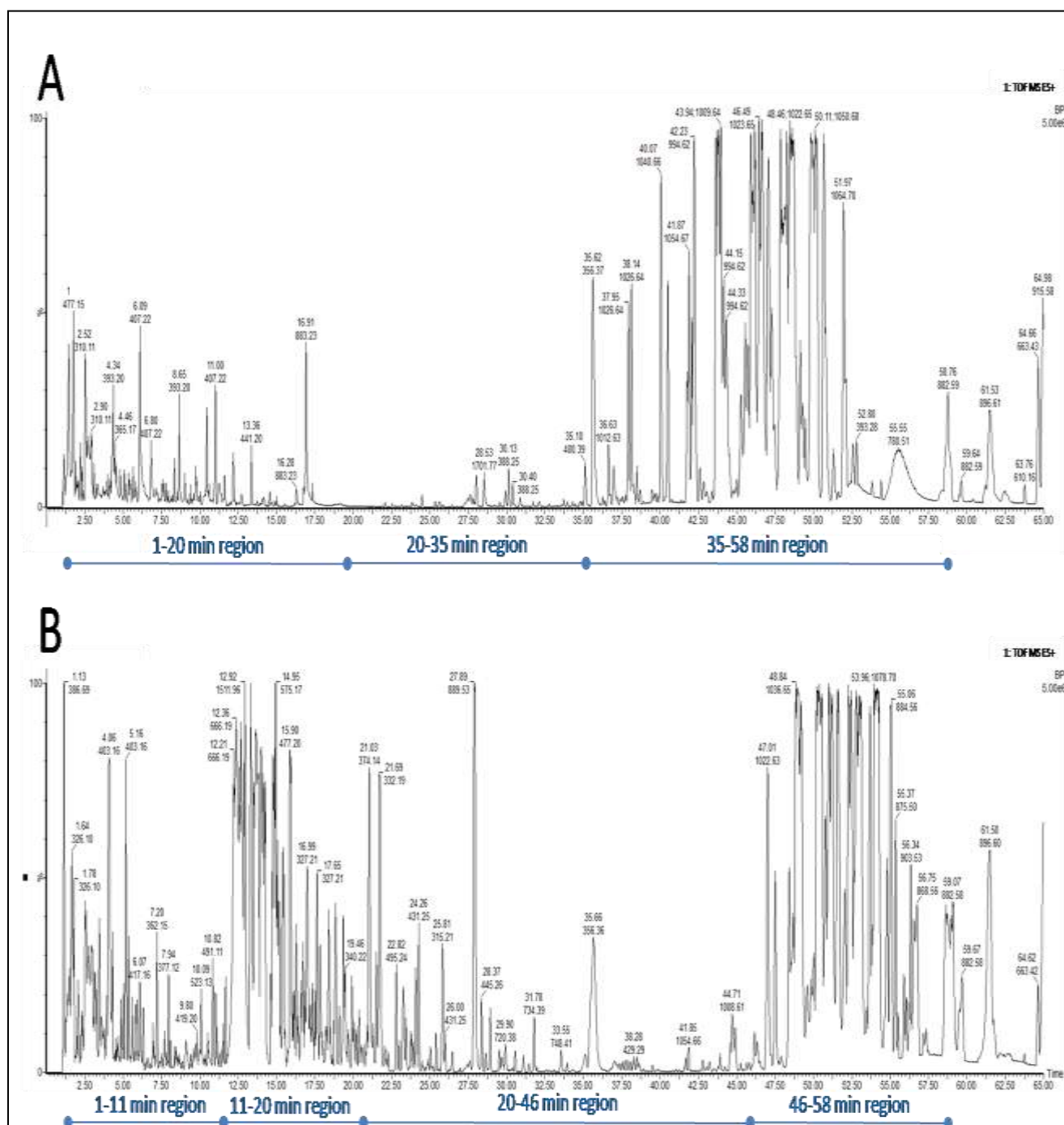


Figure 34. Chromatogramme de type base peak intensity (BPI) des surnageants de culture des souches de *B. subtilis* 23 COPS (A) et *B. pumilus* 35R (B). Les chromatogrammes BPI sont normalisés à 5×10^6 ions pour une comparaison plus aisée des profils chromatographiques. L'élution des molécules retenues sur colonne de C18 Core-shell est réalisée selon un gradient linéaire d'ACN d'environ 1,3% / min (25-95% ACN en 55 min). L'élution est réalisée de manière croissante des molécules les plus hydrophiles vers les plus hydrophobes.

Tableau 19. Les molécules retenues sur colonne de C18 Core-shell est réalisée selon un gradient linéaire d'ACN d'environ 1,3% / min (25-95% ACN en 55 min) du surnageant de culture de la souche *B. pumilus* 35R COPS et *B. subtilis* 23 COPS. L'élution est réalisée de manière croissante des molécules les plus hydrophiles vers les plus hydrophobes.

Nom	m/z	Masse (Da)	Formule moléculaire	<i>B. subtilis</i> 23 COPS	<i>B. pumilus</i> 35R COPS
surfactin C12	994,6165	993,6362	C50H87N7O13	x	
surfactin C13	1008,6331	1007,6518	C51H89N7O13	x	x
surfactin C14	1022,6504	1021,6675	C52H91N7O13	x	x
(Val) surfactin C15	1036,6672	1035,6831	C53H93N7O13	x	x
(Ile) surfactin C15	1050,6830	1049,6988	C54H95N7O13	x	x
surfactin C16	1064,6965	1063,7144	C55H97N7O13	x	x
surfactin C17	1078,7126	1077,7301	C56H99N7O13	x	x

Par cette approche différentielle combinant l'activité antagoniste et l'analyse HPLC-MS/MS des surnageants des cultures, il apparait vraisemblable que l'activité antagoniste de *B. pumilus* 35R COPS soit exclusivement liée aux composés présents dans la région du chromatogramme comprise entre 11-20 min. Le Tableau 20 rassemble les principaux composés détectés par spectrométrie d'absorption UV et de masse dans la région 11-20 min du chromatogramme.

Tableau 20. Liste des amicoumacines caractérisées par spectroscopie UV et spectrométrie de masse de la région 11-20 min du chromatogramme du surnageant de culture de la souche *B. pumilus* 35R COPS.

Nom	m/z ^a	Masse théorique (Da)	Formule Moléculaire	Temps de rétention (min)	UV λ_{max} (nm)
Amicoumacin A	424,2271	423,2006	C20H29N3O7	13,42	247 ;313
Amicoumacin B	425,2271	424,1846	C20H28N2O8	14,17	247;313
PhosphoAmicoumacin A	504,2140	503,1669	C20H30N3O10P	12,86	247;313
PhosphoAmicoumacin B	505,2065	504,1509	C20H30N2O11P	13,19	247;313
Diphosphoamicoumacin B	585,1245	584,1172	C20H34N3O14P2	13,65	247;313
TriphosphoAmicoumacin A	666,1225	665,1152	C20H34N3O16P3	12,21	247;313
TriphosphoAmicoumacin B	667,1065	666,0992	C20H33N2O17P3	12,51	247;313

^a : masse sur la charge

Les structures moléculaires sont déduites des profils d'absorbance UV spécifiques et des schémas de fragmentation en masse obtenus par *collision induced dissociation* (CID) (Figure 35 et Figure 36). Selon le profil d'absorbance UV, les phosphoamicoumacines B ($m/z = 505,2065$, $RT = 13,19$ min) et A ($m/z = 504,2140$; $RT = 12,86$ min) sont les formes moléculaires les plus abondantes. De manière concomitante, les amicoumacines B ($m/z = 425,2271$, $RT = 14,1$ min), A ($m/z = 424,2271$, $RT = 13,42$ min), la diphosphoamicoumacine B ($m/z = 585,1245$ $RT = 13,65$ min), les triphosphoamicoumacines A ($m/z = 666,225$, $RT = 12,21$ min) et B ($m/z = 667,1065$, $RT = 12,51$ min) sont également détectées par analyse HPLC-MS mais leur abondance calculée sur la base des signaux UV est plus faible.

L'élucidation de la structure moléculaire est réalisée sur la base des profils de fragmentation CID représentés sur les (Figure 35 (A-F) et la Figure 36 (E-F)). Comme illustré, le schéma de fragmentation en dessous du m/z 274,08 est strictement identique d'une molécule à l'autre. Combiné avec le profil UV commun à tous les composés, cela indique que toutes les molécules ont le même chromophore (le 3,4-dihydro-8-hydroxyisocoumarine). Les amicoumacines phosphorylées, quant-à-elles, sont facilement identifiées par leur différence de 98 Da, spécifique à la perte d'un groupe acide phosphorique (H_2PO_4). Enfin, pour chaque composé, les fragments d'ions détectés dans les valeurs m/z supérieures témoignent de la perte successive des ions pseudo-moléculaires des groupes NH_3 et H_2O et démontrent donc la présence d'un groupe amide (formes amicoumacines A) et d'un groupe carboxylique (formes amicoumacines B). Ces résultats ont fait l'objet d'une publication parue dans *Frontiers in Microbiology* (Section Aquatic Microbiology) (Annexe 2).

Les lipopeptides (LPs) cycliques sont synthétisés par complexes enzymatiques dénommées synthétases de peptides non-ribosomiques (NRPS, de l'anglais *nonribosomal peptide synthetases*) ou des *polyketide synthases* (PKS). Ces protéines modulaires sont des mégas-enzymes organisées en unités fonctionnelles itératives appelées modules qui catalysent les différentes réactions menant à la formation du polypeptide ou du peptide et à sa transformation en LPs (Finking et Marahiel, 2004). Ces systèmes biosynthétiques conduisent à une hétérogénéité remarquable parmi les LPs qui varient par le type et la séquence des résidus d'acides aminés, la nature de la cyclisation du peptide mais aussi la longueur et la ramification de la chaîne d'acides gras (Ongena et Jacques, 2008). Les LPs sont synthétisés par divers genres de bactéries telles que les *Streptomyces*, les *Pseudomonas* et bien sur les *Bacillus* (Pirri et al., 2009).

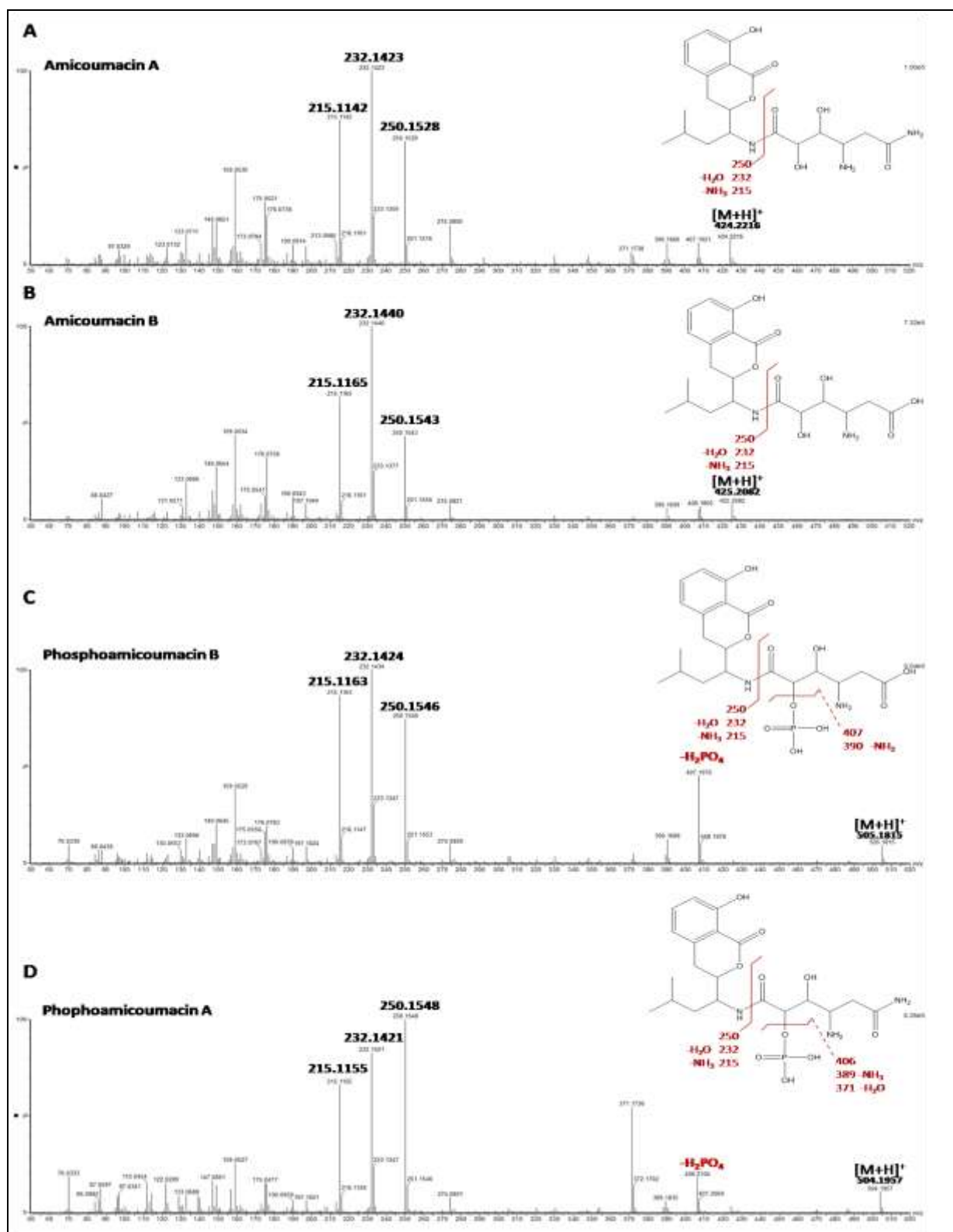


Figure 35. Modèles de fragmentation de masse obtenus par CID des principales formes abondantes d'amicoumacines: (A) amicumacine A, (B) amicumacine B, (C) phosphoamicoumacine A et (D) phosphoamicoumacine B de *B. pumilus* 35R COPS CSF. Les spectres ont été produits en utilisant un spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si (Waters) fonctionnant en mode dépendant des données.

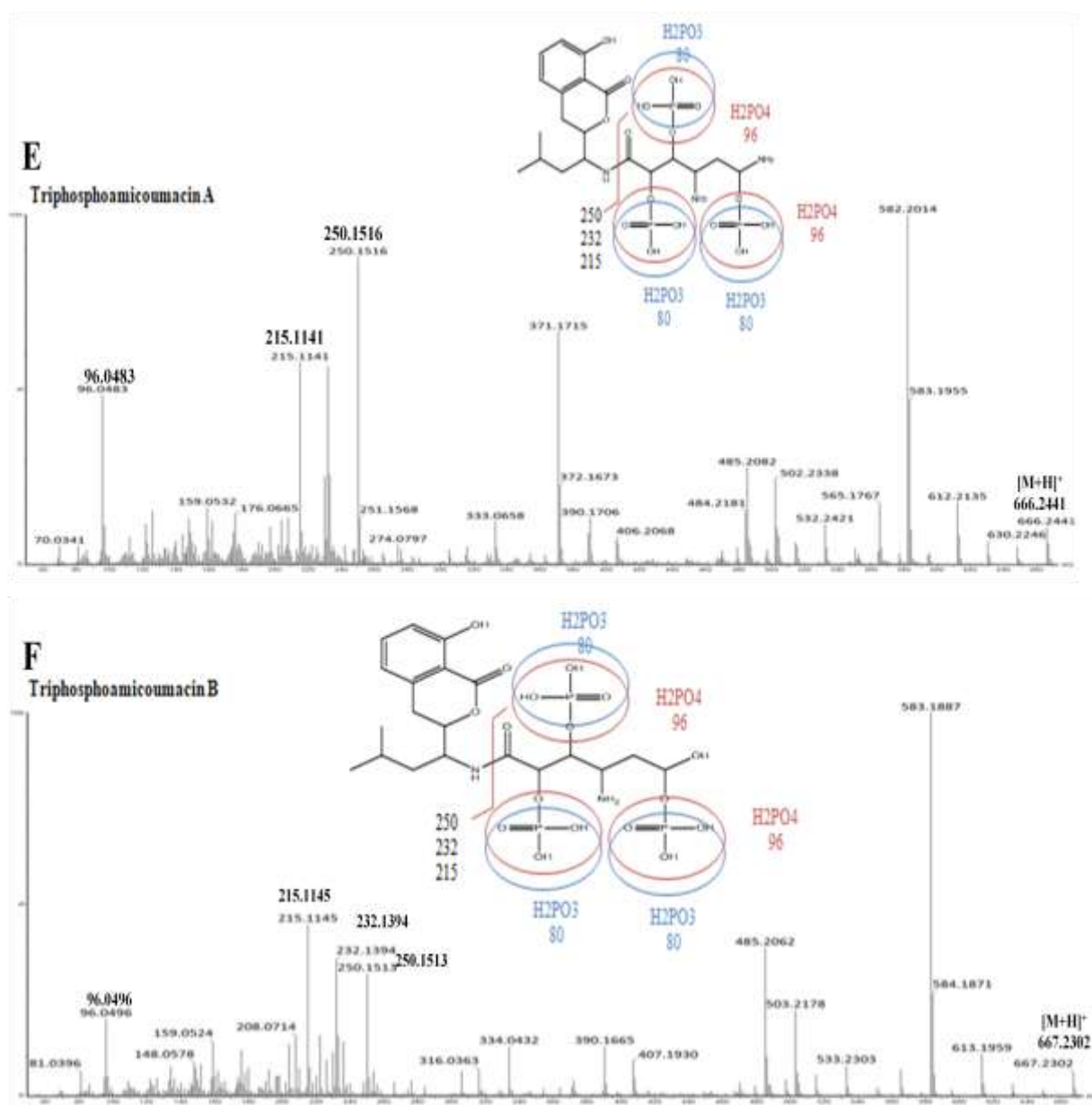


Figure 36. Modèles de fragmentation de masse obtenus par CID des principales formes abondantes d'amicoumacines : (E) triphosphoamicoumacine A et (F) triphosphoamicoumacine B de *B. pumilus* 35R COPS CSF. Les spectres ont été produits en utilisant un spectromètre de masse SYNAPT-G2-Si (Waters) fonctionnant en mode dépendant des données.

4.3. Purification et collecte des fractions d'intérêt par HPLC séparatif

Le fractionnement des molécules de la famille de l'amicoumacine a été réalisé à partir du surnageant de culture de la souche *B. pumilus* 35R COPS par HPLC séparative à l'aide d'une colonne semi-préparative C18 XBridge Prep BEH130 (250 x 10 mm, 5 µm (Waters, Guyancourt, France)). Le fractionnement a conduit à la collecte de cinq fractions notées : F1 à

F5 correspondant respectivement aux régions suivantes : 10 à 11,48 min, 11,50 à 12,60 min, 13,60 à 14,60 min, 21 à 24 min et 26 à 28,30 min (Figure 37 A). La collecte est réalisée selon le profil d'absorbance UV spécifique (Figure 37 B) du chromophore commun : le 3,4-dihydro-8-hydroxyisocoumarine.

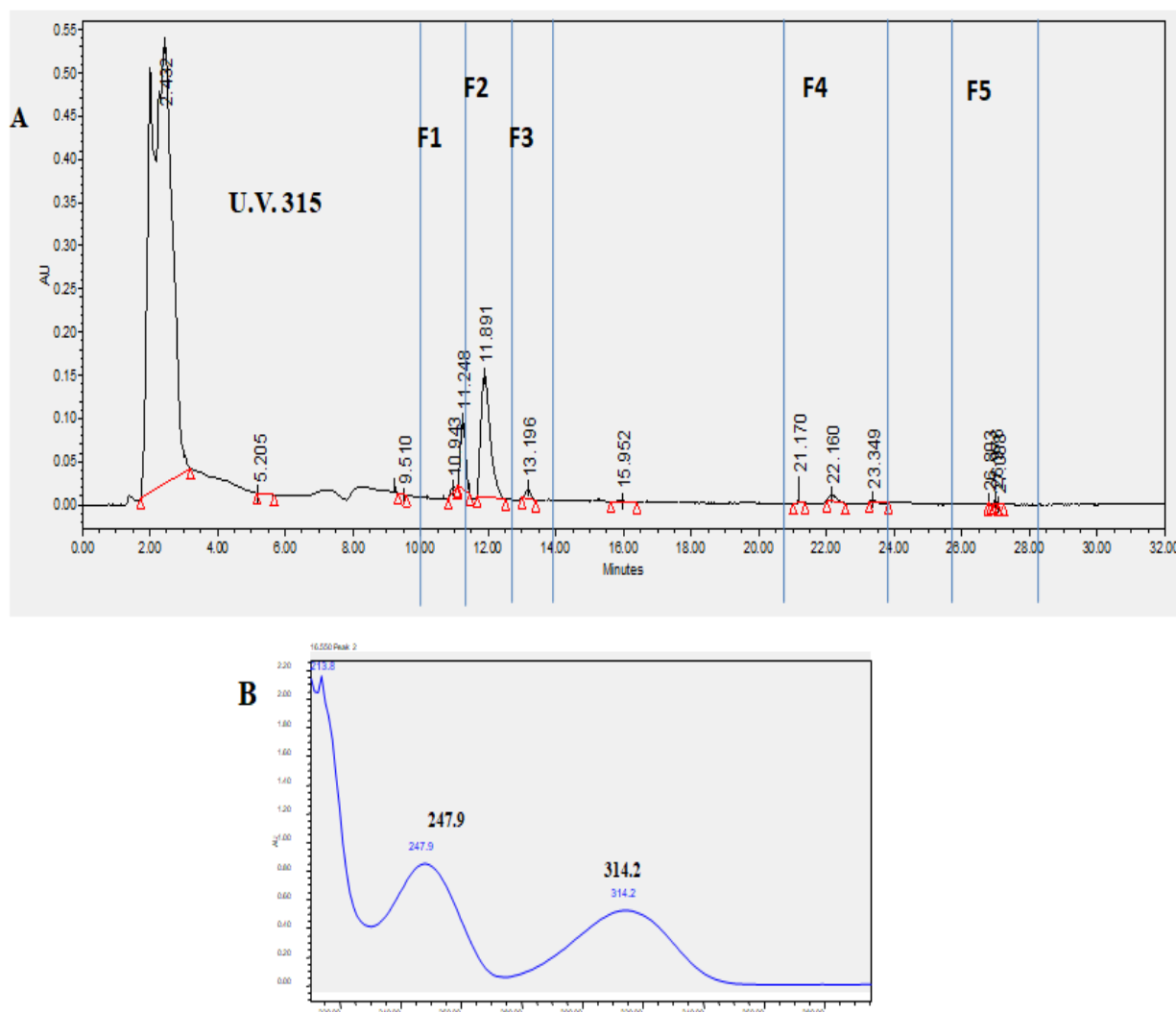


Figure 37. Purification et collecte des fractions par HPLC des métabolites secondaires produites par *B. pumilus* 35R COPS. A : chromatogramme de séparation du surnageant de culture, B : Extraction UV des pics de chaque fraction d'amicoumacine (spectre UV spécifique à l'amicoumacine).

Les analyses MALDI-TOF-MS des fractions collectées apportent la preuve que les fractions F1, F2, F3 et F4 ont des profils de m/z qui renferment les m/z des amicoumacines d'intérêt. Elles présentent respectivement des ions de m/z 504,31 ; 425,23 ; 424,31 et 505,19 Figure 38.

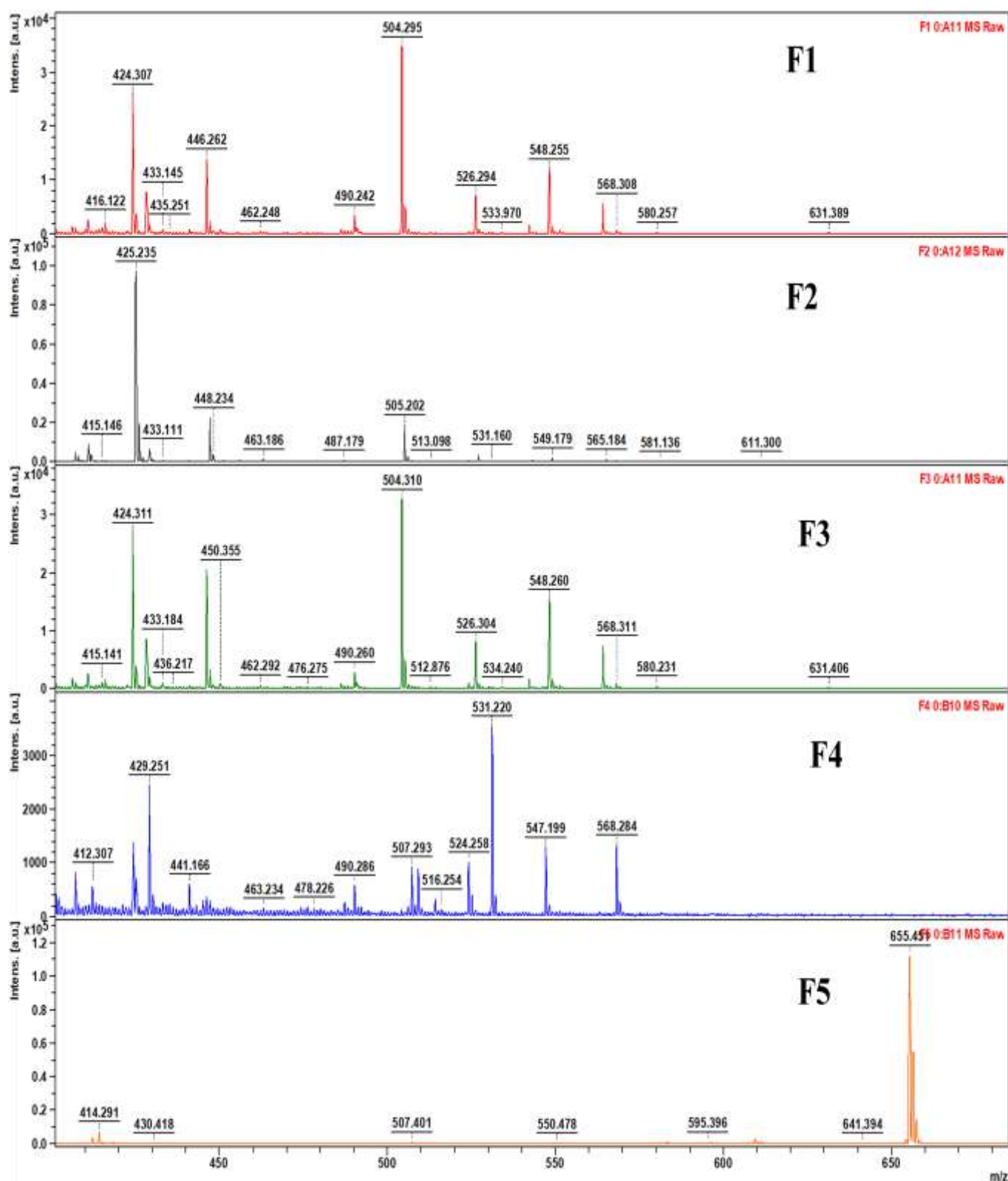


Figure 38. Spectre de masse MALDI-TOF-MS des cinq fractions collectées par HPLC semi-préparative.

4.4. Activité antibactérienne et CMI des fractions collectées d'amicoumacines

Les activités bactériennes des cinq fractions, évaluées par la méthode de diffusion sur les milieux gélosés MH et BHI contre respectivement les *Vibrio* et les *Staphylococcus*, montrent que les fractions F3, F4 et F5 n'ont pas d'effet sur l'ensemble des souches testées, contrairement aux fractions F1 et F2 où les zones d'inhibition sont comprises entre 6 et 18 mm. L'inhibition la plus élevée est observée pour la souche *S. epidermidis* 11 EMB. Ces fractions ont montré également un effet antagoniste restreint sur la souche *V. anguillarum* 1 COPS avec une de zone d'inhibition de 8 et 6, respectivement pour les fractions F1 et F2 (

Tableau 21 et Figure 39). Ces résultats sont en parfaite concordance avec les résultats de l'activité du surnageant de culture sans séparation préalable et viennent donc corroborer les déductions réalisées à partir des résultats de l'approche différentielle.

Tableau 21. Zones d'inhibition (en mm) des activités antibactériennes des fractions collectées, vis-à-vis de certains pathogènes de *Staphylococcus* et *Vibrio*,

Souches cibles	Zone d'inhibition (mm)				
	Fraction 1	Fraction 2	Fraction 3	Fraction 4	Fraction 5
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16	16	-	-	-
<i>S.aureus</i> MRSA 43300 ATCC	15	18	-	-	-
<i>S. aureus</i> MRSA SA1	16	18	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i> 17EMB	16	16	-	-	-
<i>V. anguillarum</i> 1 COPS	8	6	-	-	-
<i>S. condimenti</i> 52EMB	17	17	-	-	-
<i>S. warneri</i> 8 EMB	13	13	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> 11 EMB	18	18	-	-	-
<i>S. hominis</i> 13 EMB	15	16	-	-	-
<i>S. condimenti</i> 25 EMB	14	13	-	-	-
<i>S. warneri</i> 27 EMB	14	13	-	-	-

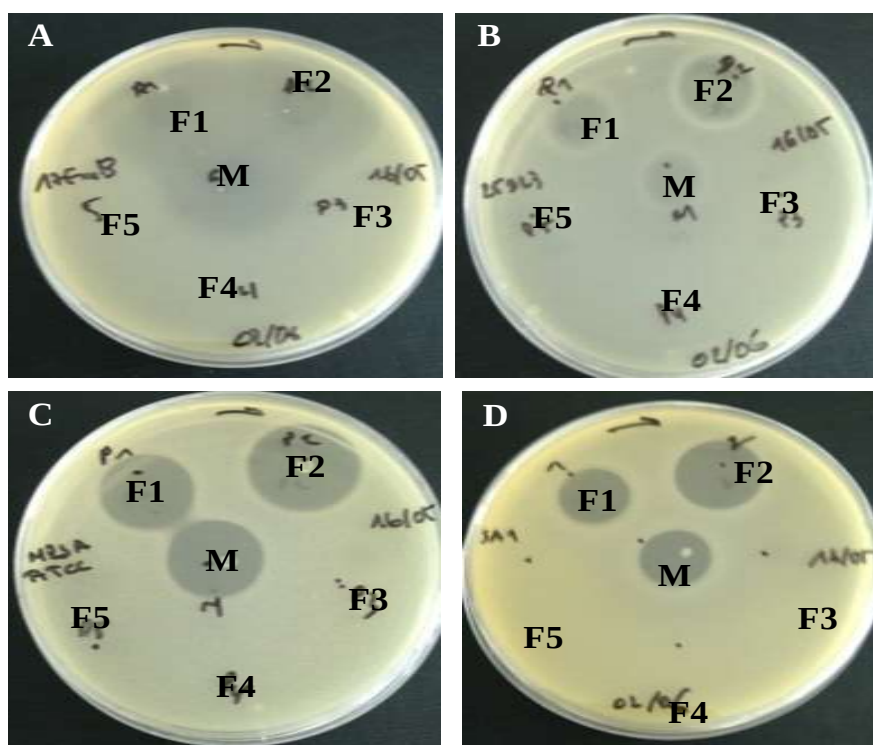


Figure 39 .Photographie témoignant des activités antibactériennes des cinq fractions collectées seules et en mélange (F1, F2, F3, F4, F5, en mélange M) contre (A) *V. alginolyticus* 17EMB, (B) *S. aureus* ATCC25923, (C) *S. aureus* MRSA 43300 ATCC et (D) *S. aureus* MRSA SA1.

Par ailleurs et comme indiqué dans le Tableau 23, les CMI mesurées pour les fractions F1 et F2 montrent clairement la sensibilité importante des souches de *Staphylococcus* (CMI variant de 4 et 8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) comparée à la faible sensibilité des souches de *Vibrio* et plus particulièrement à celle de *V. anguillarum* 1COPS dont les CMI sont de 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivement pour les fractions F1 et F2 (Figure 40).

Tableau 22 . Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des fractions F1 et F2 contre certains pathogènes de *Staphylococcus* et *Vibrio*.

Souches cibles	F1(Amicoumacin A) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	F2(Amicoumacin B) ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>S. aureus</i>	8	8
<i>S. aureus</i> MRSA 43300 ATCC	8	8
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4	4
<i>V. anguillarum</i> 1COPS	64	128
<i>V. alginolyticus</i> 17EMB	32	64

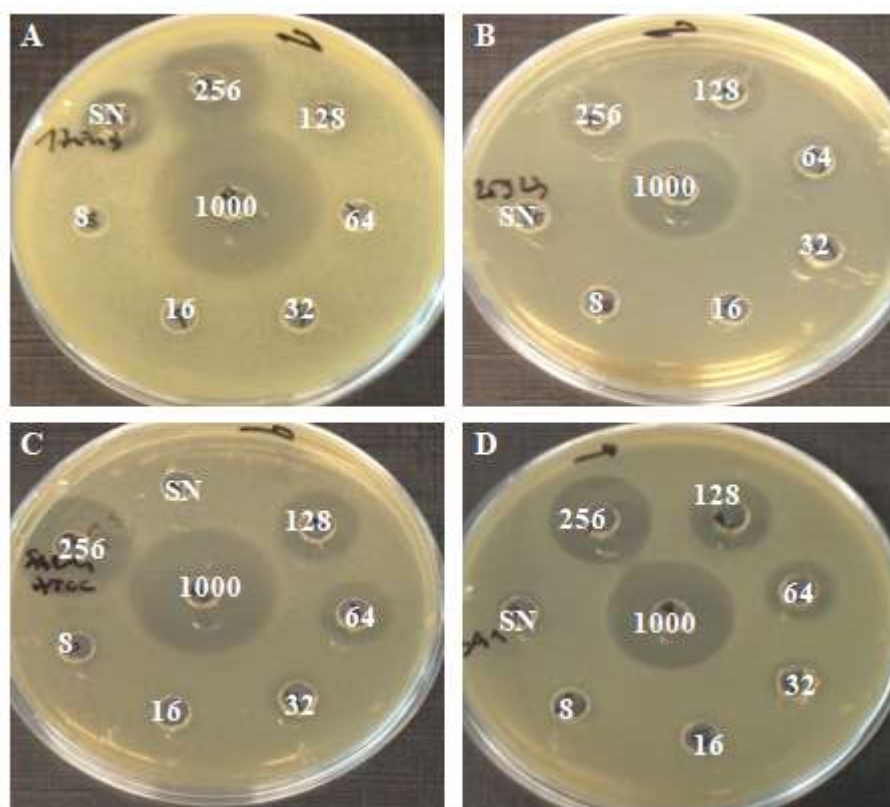


Figure 40. Photographie présentant les zones d'inhibition associées aux CMI_s ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) des fractions F1 et F2 contre (A) *V. alginolyticus* 17EMB, (B) *S. aureus* ATCC25923, (C) *S. aureus* MRSA 43300 ATCC et (D) *S. aureus* SA1.

4.5. Identification *in-silico* des clusters de gènes codant pour les membres de la famille de l'amicoumacine

4.5.1. Description de l'analyse bio-informatique du génome entier de *B. pumilus* 35 R COPS.

Le séquençage de la souche 35R COPS a permis l'assemblage de 43 contig dont 10 d'une taille supérieure à 1000 pb pour un total de 3 671 040 bases séquencées et d'une profondeur allant de 16x à 135x. Le contig le plus long a une taille de 1 797 273 pb. Deux contigs permettent de couvrir 75% des séquences (L75) et témoignent d'un séquençage et d'un assemblage de bonne qualité.

4.5.2. Identification et caractérisation du cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacine.

L'analyse par HPLC-MS a montré que la souche *B. pumilus* 35R COPS produit les molécules d'amicoumacines A et B et les formes phosphorylées d'amicoumacines A et B. Dès lors, nous avons recherché, au sein du génome de *B. pumilus* 35R COPS, la présence des clusters de gènes permettant la synthèse de ces molécules.

Le cluster de gènes de l'amicoumacine a été décrit chez la souche de *B. subtilis* 1779 (Li et al., 2015). Il s'agit d'un cluster hybride PKS-NRPS long d'environ 47,6 kb et organisé en 16 cadre ouvert de lecture (ORF de l'anglais *open reading frame*) nommés *amiA-O* (Figure 41). Ce dernier est composé de 8 modules permettant l'intégration de 3 résidus aminés et 5 résidus malonates. Les gènes *amiA* et *amiJ* codent des modules NRPS. Ils permettent respectivement l'intégration des monomères aminés asparagine et leucine. Le gène *amiB* code une peptidase, tandis que les gènes *amiC* et *amiD* n'ont pas de fonctions décrites connues. Les gènes *amiE*, *amiF*, *amiG* et *amiH* sont des gènes de biosynthèse d'hydroxymalonyl-ACP. Le gène *amiI* code une synthétase hybride PKS-NRPS permettant l'intégration d'un monomère aminé asparagine et les gènes *amiK*, *amiL* et *amiM* codent des PKS. Les gènes *amiN* et *amiO* ne sont pas caractérisés.

La séquence de ce génome n'est malheureusement pas disponible dans la base de données Genbank. Cependant, un cluster similaire de gènes a été décrit chez *Xénorabodus bovienii* (Park et al., 2016) et fait référence à un cluster chez *B. subtilis* inaquosorum KCTC 13429. L'organisation du cluster chez cette dernière espèce est similaire à celle du cluster de la souche *B. subtilis* 1779 et a été utilisée pour caractériser le cluster identifié chez *B. pumilus* 35R COPS.

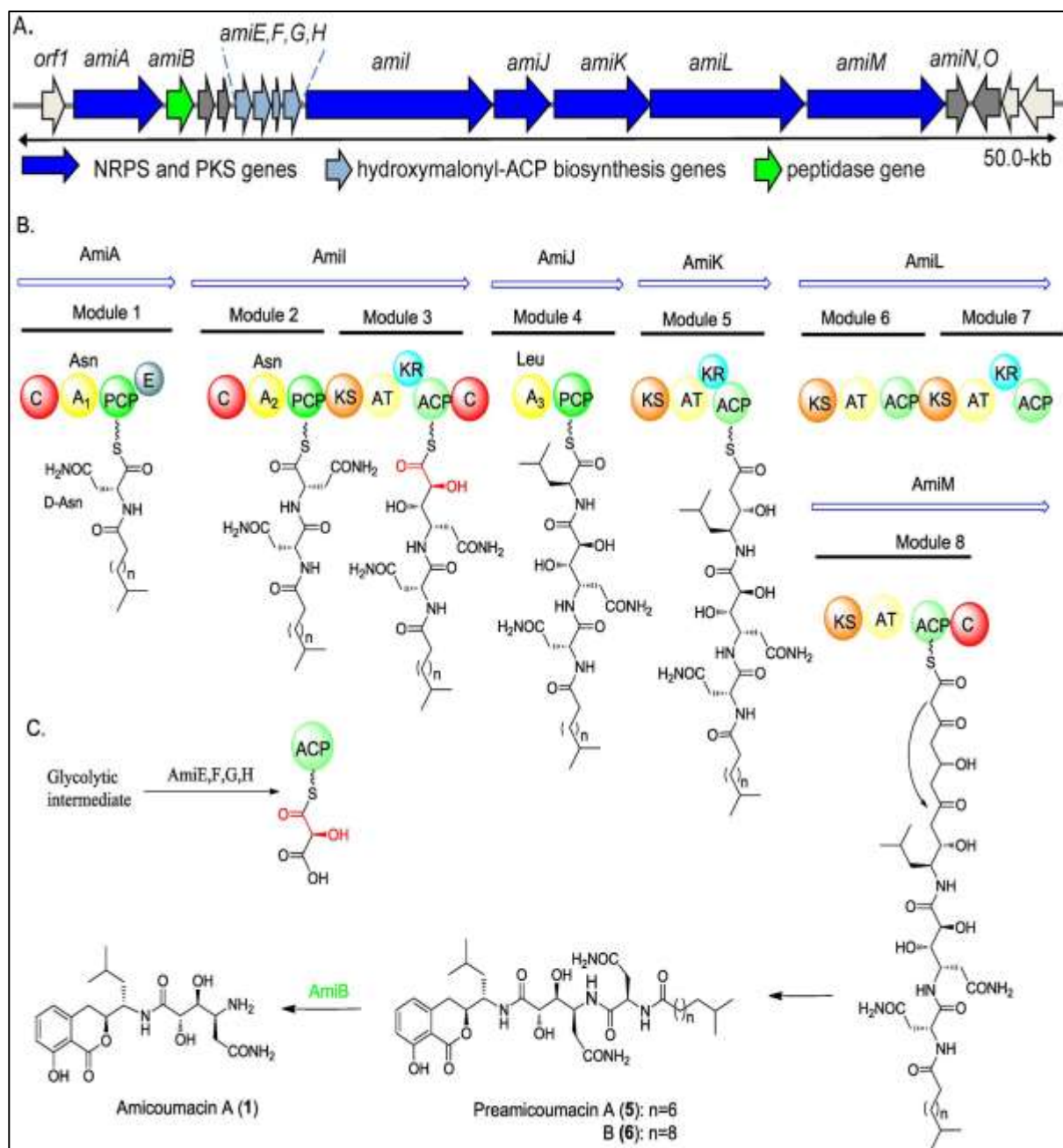
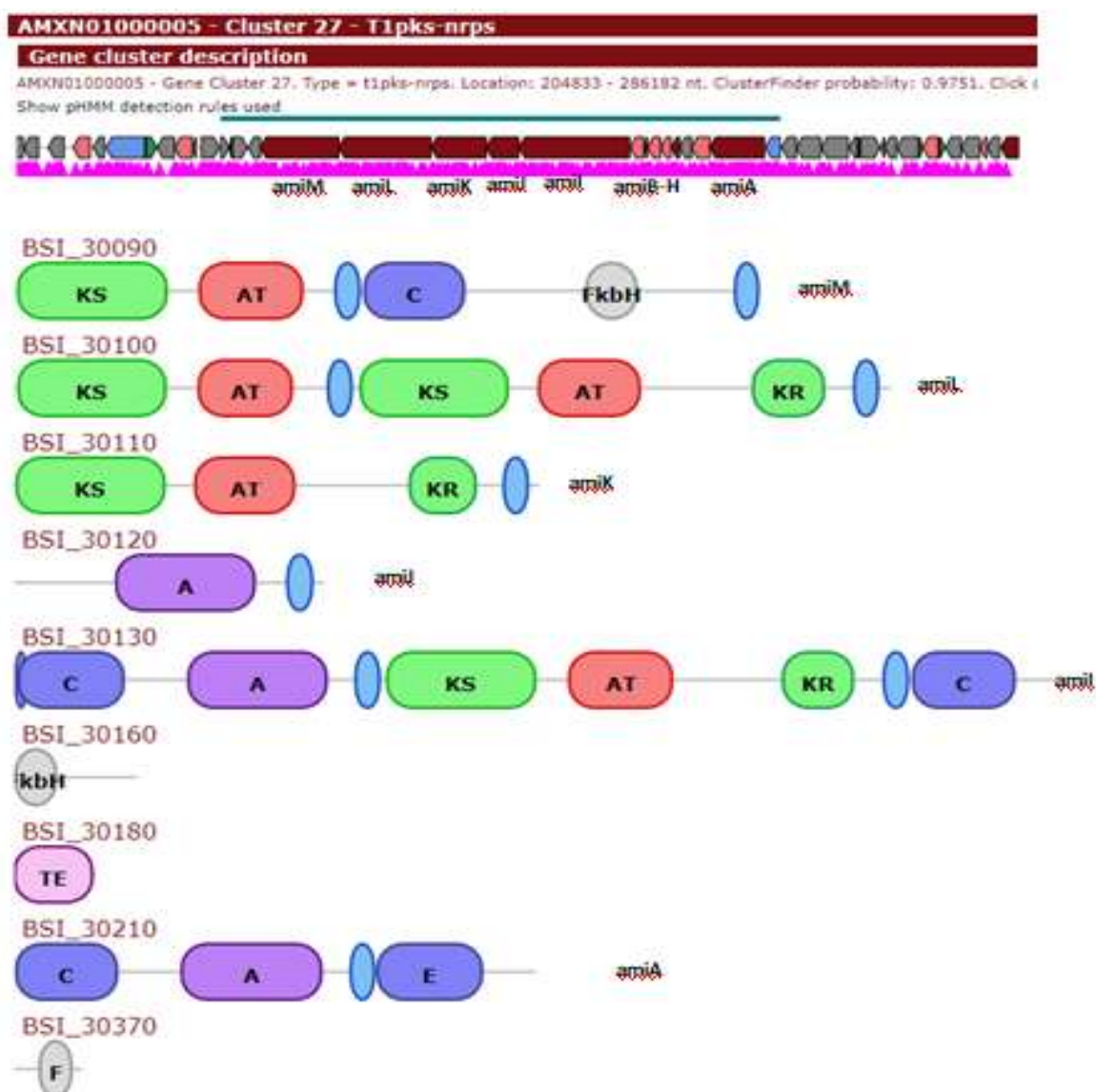


Figure 41. A) Organisation du cluster de gènes codant la synthèse de l'amicoumacine chez *B. subtilis* 1779; (B) la voie de biosynthèse proposée des amicoumacines chez *B. subtilis* 1779; (C) Étapes biosynthétiques proposées conduisant à l'hydroxymalonyl-ACP, qui est une unité d'extension PKS proposée du module 3 (Li et al., 2015). Abréviations de domaine : A, adénylation ; ACP, protéine porteuse d'acyle (de l'anglais acyl-carrier protein); AT, acyltransférase; C, module de condensation; E, épimérase; KR, la cétoréductase; KS, cétosynthase; PCP, protéine porteuse de peptidyl.

L'analyse du contig5 de *B. subtilis inaquosorum* KCTC13429 par le logiciel AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>) permet d'identifier la structure du cluster de gènes responsable de la synthèse de l'amicoumacine décrit par Park *et al.* (2016). la structure de ce gène est représentée dans la Figure 42. Les gènes *amiA*, *amiI*, *amiJ*, *amiK*, *amiL* et *amiM* codent des modules NRPS ou hybride PKS-NRPS. Les modules NRPS permettent l'incorporation de monomères d'asparagine (domaine A *amiA* et *amiI*) et d'acide glutamique (domaine A de *amiJ*). Le gène *amiD* code une thioestérase caractéristique des synthétases de type NRPS. Comme dans la synthétase de l'amicoumacine chez *B. subtilis* 1779, *amiB* code une peptidase de type bêta-lactamase. Enfin les gènes *amiE*, *amiF*, *amiG* et *amiH* codent des enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'hydroxymalonyl-ACP qui est le monomère des polycétones.



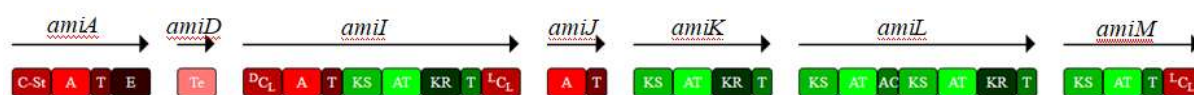


Figure 42. Cluster de gènes codant la synthétase de l’amicoumacine (ou des molécules apparentées) chez *Bacillus subtilis inaquosporum* KCTC13429.

L’analyse AntiSMASH du génome de *B. pumilus* 35R COPS révèle la présence de 2 clusters NRPS et d’un cluster hybride PKS-NRPS. Afin de déterminer la présence d’un cluster codant la synthétase d’amicoumacine, nous nous sommes focalisés sur le cluster hybride PKS-NRPS (cluster 25). Ce cluster est localisé sur le contig4 (long de 305 823 pb). L’algorithme cluster finder prédit le cluster sur 17 ORFs de la souche *B. pumilus* 35R COPS. Cette organisation est compatible avec le cluster de la synthétase d’amicoumacine.

La structure du cluster 25 chez *B. pumilus* 35R COPS comprend 6 protéines codant des modules NRPS ou hybride PKS/NRPS (Figure 43). Les monomères aminés incorporés par les domaines A des modules NRPS sont 2 résidus d’asparagine et un résidu d’acide glutamique.

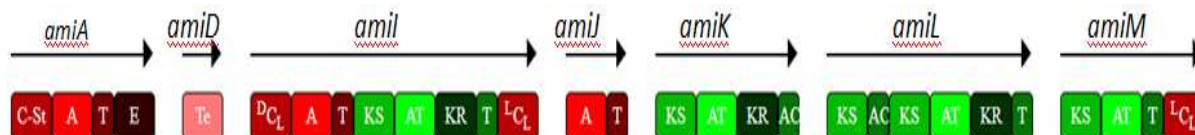


Figure 43. Cluster de gènes codant la synthétase d’amicoumacine (ou molécules apparentées) chez *B. pumilus* 35R COPS.

La protéine ct4_82 de la souche 35R COPS code un module NRPS composé d’un domaine C, d’un domaine A incorporant un résidu d’asparagine, d’un domaine PCP (T) et d’un domaine E. Cette protéine pourrait donc correspondre à *amiA* (Figure 44)

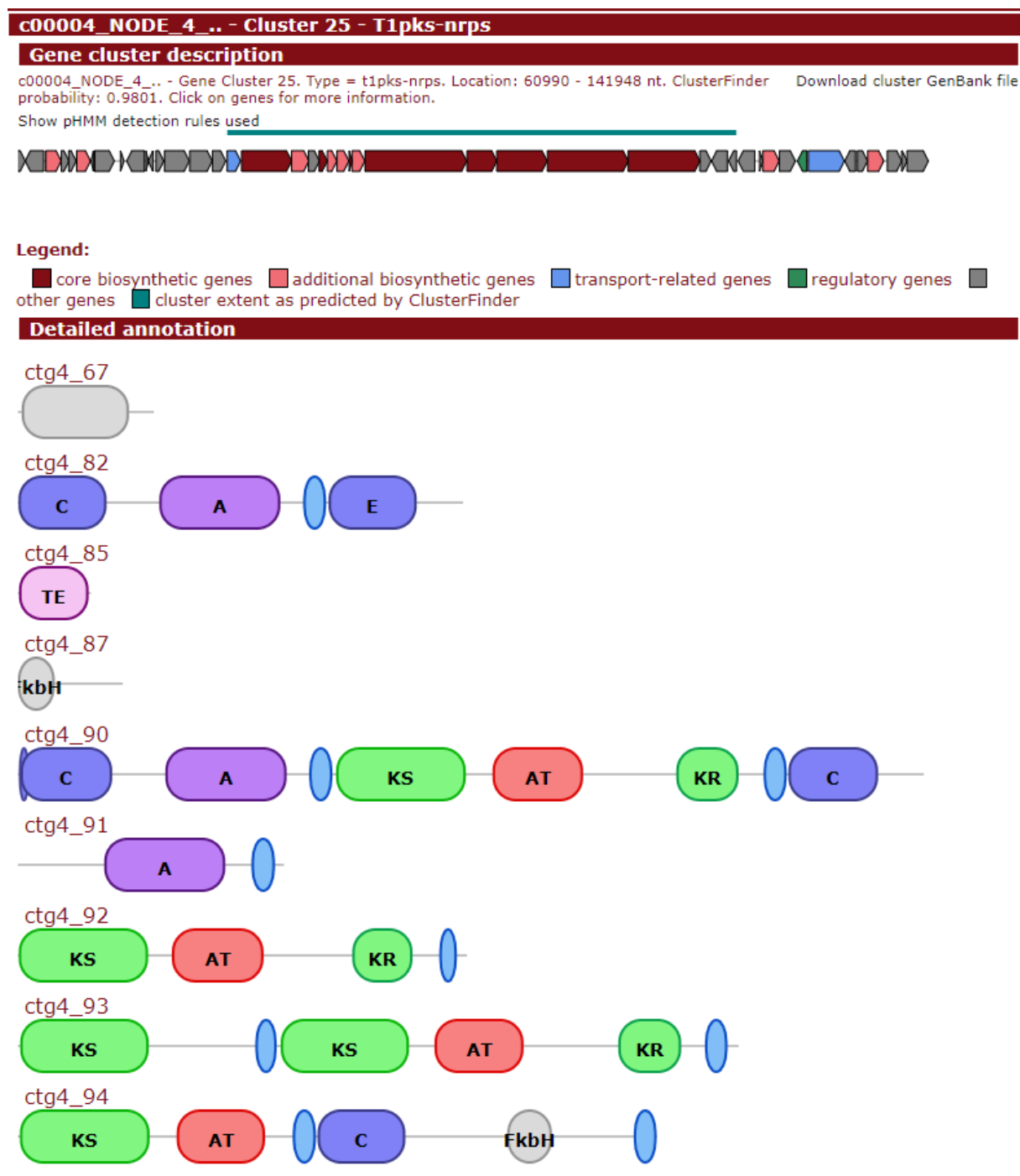


Figure 44. Cluster de gènes codant une synthétase hybride NRPS-PKS chez *B. pumilus* 35R.

Chez la souche 35R COPS, la protéine ct4_85 (équivalent *amiD*) correspond à un domaine NRPS thioesterase. La protéine ct4_90 est analysée par AntiSMASH comme un module PKS composé d'un module C, suivi d'un module A permettant l'intégration d'un résidu d'asparagine, d'un module PCP, d'un module PKS-KS, d'un module PKS-AT puis PKS-KR,

d'un module PCP et pour finir d'un module NRPS-C. Cette organisation est semblable au produit du gène *amiI*. La protéine ct4_93 code une PKS composée d'un module PKS-KS suivi d'un module ACP puis de modules PKS-KS, AT et KR et d'un module PCP. Cette organisation correspond au gène *amiL*. Cependant le gène *amiL* de *B. subtilis* 1779 présente un domaine AT entre le premier domaine KS et le domaine ACP suivant. Il en est de même chez *B. subtilis inaquosporum* KCTC13429.

Notons qu'au niveau de la protéine ct4_93, les domaines KS et ACP ne sont pas contigus. La séquence entre ces deux domaines pourrait contenir un domaine AT variant ou incomplet. Enfin la protéine ct4_94 de la souche *B. pumilus* 35R COPS est organisée en la succession d'un domaine PKS-KS, AT et PCP suivi d'un domaine de condensation NRPS. Cette structuration est similaire au module 8 composant la première partie du produit du gène *amiM* de *B. subtilis* 1779. Cette partie est suivie d'un domaine FkbH (impliqué dans la synthèse de methoxymalonyl-ACP) suivi d'un domaine PCP dont l'organisation est identique chez *B. subtilis inaquosporum* KCTC13429.

La souche *B. pumilus* 35R COPS produit plusieurs formes d'amicoumacines parmi lesquelles des formes phosphoryées. L'analyse des gènes environnant du cluster de la synthétase d'amicoumacine chez la souche *B. pumilus* 35R COPS montre qu'un gène codant une kinase suivi d'un gène codant une phosphatase sont présents directement après *amiM* (Figure 45). Les produits de ces gènes sont annotés par AntiSMASH « Stress réponse kinase (EC 2.7.11.1) » et « Alkaline phosphatase 3 (EC 3.1.3.1) ». Ils sont annotés par RAST, respectivement, « Homosérine kinase (EC 2.7.1.39) » et « Alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) ».



Figure 45. Organisation du cluster de gènes codant la synthétase de l'amicoumacine chez la *B. pumilus* 35R COPS et des gènes environnants

5. Caractérisation des métabolites secondaires de la souche *B. pumilus* 38 COPS

Cette partie fait l'objet d'un article en cours de publication intitulé « Genome analysis and antagonism features of *Bacillus pumilus* ICVB403 isolated from *A. tonsa* copepod eggs » (Annexe 2).

5.1. Activité antagoniste du surnageant de culture de *Bacillus pumilus* 38 COPS

Les surnageants des cultures de *B. pumilus* 38 COPS cultivé dans le bouillon nutritif ou le milieu LB sont dépourvus d'antagonisme. En revanche, le SURNAGEANT DE CULTURE obtenu après 48h et 72h de culture en milieu Landy montre une inhibition importante des souches de *Staphylococcus* à l'exception de *S. warneri* 8EMB qui apparait résistant (Tableau 23).

Tableau 23. Concentrations minimales de l'érythromycine et les combinaisons d'érythromycine avec le surnageant de culture sans cellule de *B. pumilus* 38COPS (milieu de Landy).

Souches cibles	Codes	CMI Erythromycine ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CMI Erythromycine ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) + le surnageant* Landy de <i>B. pumilus</i> 38 COPS
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	32	4
<i>S. hominis</i>	13 EMB	64	4
<i>S. aureus</i>	SA1	32	8
<i>S. aureus</i> MRSA	ATCC 43300	32	8

* : surnageant dilué quatre fois.

5.2. Effets des combinaisons d'érythromycine et de surnageant de culture en milieu de Landy sur les souches de *Staphylococcus*

La CMI du mélange érythromycine seul ou du surnageant de culture seul, issu de culture de *B. pumilus* 38 COPS sur milieu Landy est évaluée à $32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les souches MRSA ATCC43300 et MRSA-S1. En revanche, la valeur de cette CMI chute à $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ pour les deux souches cibles lorsque l'érythromycine est combinée avec du surnageant de culture actif dilué quatre fois (Tableau 23). De même, les associations d'érythromycine et de surnageant de

culture diminuent la sensibilité des souches de *S. epidermidis* 11EMB et de *S. hominis* 13EMB. La CMI de l'érythromycine en association avec le surnageant de culture de *B. pumilus* 38 COPS dilué quatre fois est réduite à seulement 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ au lieu de 32 et 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivement lorsque l'antibiotique testé est mélangé avec le contrôle négatif (Tableau 24).

Tableau 24. Antagonisme du surnageant de culture de culture cellulaire de *B. pumilus* 38 COPS contre des souches de Staphylocoques.

Souches cibles	Codes	Surnageant			
		Bouillon nutritif (48h)	Bouillon LB (48h)	Milieu Landy (48h)	Milieu Landy (72h)
<i>S. warneri</i>	8 EMB	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	-	-	+++	+++
<i>S. hominis</i>	13 EMB	-	-	+++	+++
<i>S. condimentii</i>	25 EMB	-	-	+++	++
<i>S. warneri</i>	27 EMB	-	-	++++	++++
<i>S. aureus</i>	SA1	-	-	++	++
<i>S. aureus</i> MRSA	ATCC 43300	-	-	++++	++++
<i>S.aureus</i> ATCC	25923	-	-	+++	++

5.3. Identification *in-silico* du cluster putatif de gènes codant pour un ou plusieurs composés inhibiteurs

La taille du génome de *B. pumilus* 38 COPS est de 3 666 195 pb, y compris 22 contigs avec un rapport G + C de 42,0 %, 3826 séquences codantes et 73 ARNs. L'analyse bio-informatique, réalisée avec le logiciel en ligne AntiSMASH, du génome de *B. pumilus* 38 COPS a révélé la présence d'un cluster de gènes codant pour une NRPS et d'un gène codant pour une nouvelle bactériocine. L'analyse du groupe de gènes NRPS révèle la présence d'un module d'initiation, des modules de création d'une séquence peptidique spécifique contenant sept résidus d'acides aminés comprenant l'acide glutamique (Glu/E), la leucine (Leu/L), la d-leucine (d-Leu/dL), la valine (Val/V), l'asparagine (Asp/N), la d-leucine (d-Leu/dL) et l'isoleucine (Ile/I) et d'un module de terminaison. L'utilisation d'autres logiciels et bases de données comme NapDos (<http://napdos.ucsd.edu/>) et NORINE (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>) conduisent à la conclusion que ce cluster de gènes synthétise la surfactine A qui est un lipopeptide bien connu. Des

expériences supplémentaires réalisées par spectrométrie de masse (analyse MS et MS/MS) à partir du surnageant de culture actif obtenu par croissance de *B. pumilus* 38 COPS sur milieu Landy confirment la présence d'un lipopeptide de 1088 Da et de séquence en acides aminés suivante : valine (Val/V), leucine (Leu/L) ou l'isoleucine (Ile/I), leucine (Leu/L) ou l'isoleucine (Ile/I), asparagine (Asp/N) et acide glutamique (Glu/E) (données non présentées).

D'autre part, l'analyse AntiSMASH indique également la présence d'un gène putatif codant pour une bactériocine de la famille de la circularine-A/uberolysine. Ce gène de bactériocine circulaire est également présent dans une souche de *B. pumilus* dont la séquence du génome a été déposée sous le numéro ID WP_099726571.1 dans la base de données NCBI GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Comme le montre la figure 1, ces bactériocines ne diffèrent que par un résidu d'acide aminé. En effet, l'alanine (A) est remplacée par une Lysine (K) en position 95 (Figure 46).

```

Query 1  MTETRNEIKLHVLFGALAVGFLMLALFSFSLQMLPVADLAKEFGIPGSVAAVVLNVVEAG 60
Sbjct 1  MTETRNEIKLHVLFGALAVGFLMLALFSFSLQMLPVADLAKEFGIPGSVAAVVLNVVEAG 60

Query 61 GAVTTIVSILTAVGSGGSLIAAAGKETIRQYLKQIKKKGRKAVIAW 108
Sbjct 61 GAVTTIVSILTAVGSGGSLIAAAGKETIRQYLK QIKKKGRKAVIAW 108

```

Figure 46. Alignement des séquences de la protéine putative (selon l'analyse du génome entier AntiSMASH ICVB403 (Query)) avec le gène enregistré dans la base de données NCBI GenBank (Sbjct) d'une bactériocine circulaire provenant de l'isolat de *B. pumilus* 51_5il (ID de séquence : WP_099726571.1).

5.4. La fraction active de *B. pumilus* 38 COPS

Le surnageant actif de culture de *B. pumilus* 38 COPS dilué quatre fois est capable de potentialiser l'activité de l'érythromycine contre les souches de *Staphylococcus* mentionnées ci-dessus. Cette fraction active a été évaluée pour sa cytotoxicité sur les cellules intestinales humaines productrice de mucus HT-29-MTX. Après 4 h de contact, la viabilité des cellules exposées au surnageant de culture n'est pas significativement différente du témoin non traité (Figure 47).

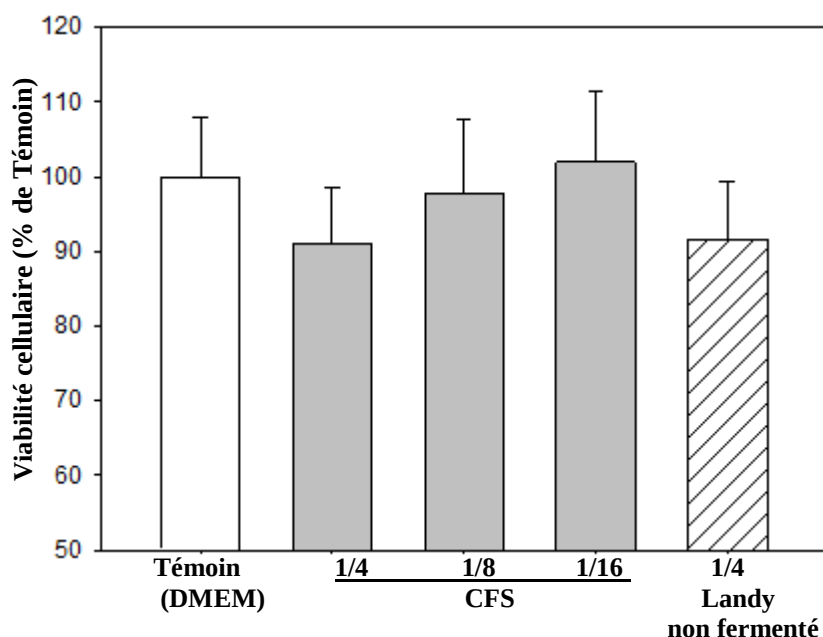


Figure 47 . Viabilité des cellules HT-29-MTX après 4h de contact avec le surnageant de culture exempt de cellules dans du milieu Landy dilué à quatre et huit fois dans du DMEM et du milieu DMEM témoin contenant 1/4 de milieu Landy non fermenté. L'analyse ANOVA à une voie a montré qu'il n'y avait pas de différence statistique entre les groupes ($p = 0,463$).

De plus, cette fraction ne présentait aucune activité hémolytique sur plaques de gélose au sang (Section 3 du chapitre 3).

Bacillus est un genre bactérien important constitué d'un groupe hétérogène d'organismes aérobies ou anaérobies facultatifs, formant des endospores, Gram-positif, en forme de bâtonnet. Le genre *Bacillus* comprend au moins 172 espèces (Liu et al., 2013). Sur la base de leur parenté au niveau des séquences du gène de l'ADNr 16S, les souches de *Bacillus* sont divisées en 5 groupes : *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. circulans* et *B. brevis*. Le groupe *B. subtilis* se compose quant-à-lui de 5 espèces : *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. altitudinis* et *B. aerophilus* partageant plus de 99,5 % de similitude dans leurs séquences d'ADNr 16S (Liu et al., 2013 ; Berkeley et al., 2008).

Dans ce chapitre, nous avons concentré notre attention, pour plusieurs raisons, principalement sur cinq souches appartenant aux espèces de *B. pumilus* (18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS, et 40A COPS) initialement identifiées par MALDI-TOF-MS puis confirmées par analyse de séquence de l'ADNr 16S. Tout d'abord, *B. pumilus* a le potentiel de produire des substances ayant une activité antibactérienne, y compris le premier antibiotique pumilin (Bhate, 1955). À cet égard, il a été récemment rendu compte des capacités de l'isolat marin *B. pumilus*

SBUG 1800 à produire des 2,5-dicétopipérazines (DKP), un certain nombre de pumilacidines et d'enzymes bactériolytiques différentes (Brack *et al.*, 2015). Une autre bactérie marine appelée *B. pumilus* KMM 1364 produit un mélange d'analogues lipopeptidiques de surfactine (Kalinovskaya *et al.*, 2002). En termes de bactériocines, *B. pumilus* WAPB4 produit de la pumilicine 4, bactéricide à la fois des MRSA et des entérocoques résistants à la vancomycine (Aunpad et Na-Bangchang, 2007).

En plus de la production de composés antimicrobiens, les bacilles présentent un intérêt croissant en tant que probiotiques potentiels pour l'aquaculture au vue de l'accumulation de données scientifiques qui prônent les allégations probiotiques de *B. subtilis*, *B. licheniformis* et *B. pumilus* (Nayak, 2010 ; Olmos et Paniagua-Michel, 2014 ; Sreenivasulus *et al.*, 2016). De nombreuses souches de *B. pumilus* ont été décrites pour leurs allégations bénéfiques et leur utilisation possible en aquaculture pour contrôler les maladies bactériennes et diminuer l'utilisation d'antibiotiques (Prieto *et al.*, 2014 ; Sreenivasulu *et al.*, 2016).

La capacité d'antagonisme des cinq souches de *B. pumilus* isolées dans cette étude est suggérée par leur activité antimicrobienne contre plusieurs agents pathogènes (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *L. innocua*, *L. monocytogenes* et *S. aureus*). En particulier, nous montrons que les surnageant de cultures issus des cultures de nos cinq souches de *B. pumilus* inhibent la croissance de diverses souches de *Vibrio*. Ces bactéries sont responsables de la vibriose des poissons qui cause la léthargie, la dégénérescence des branchies, des organes lymphoïdes, du système digestif et des épithéliums menant à une mortalité éventuelle ou rapide (Rasheed, 1989 ; Deane *et al.*, 2001 ; Akaylı et Timur, 2002 ; Haenen *et al.*, 2014).

De plus *B. pumilus* 38 COPS cultivé en milieu Landy (Landy *et al.*, 1948) a la capacité d'inhiber *in vitro* une gamme de souches de *Staphylococcus*, y compris les souches de MRSA et les souches isolées d'eau de mer portant une résistance à l'érythromycine. Une étude récente d'Ismail *et al.* (2016) a rapporté les propriétés inhibitrices de *B. pumilus* P8 contre un grand nombre de souches cibles incluant les *Staphylococcus*.

Dans cette étude, nous signalons que la souche de *B. pumilus* nommée 35R COPS associée aux œufs de copépodes produit deux grandes familles de composés antimicrobiens ; les surfactines et les amicoumacines. Les amicoumacines A, B et C sont une famille de produits structurellement divers qui possèdent un large éventail de propriétés pharmacologiques telles qu'antibactérienne, anti-inflammatoire, antiulcéreuse, gastroprotectrice et anti-*Helicobacter*

pylori (Itoh et al., 1981 ; Hashimoto et al., 2007). Une étude récente a montré que *B. pumilus* H2 isolé à partir de sédiments marins produit une molécule active contre les espèces *Vibrio* (Gao et al., 2017). Cette molécule active a été identifiée comme l'amicoumacine A, indiquant que cette souche de *B. pumilus* a une forte application potentielle dans la prévention ou le contrôle de la vibriose des poissons. Des travaux de 2007 ont montré que la souche *B. pumilus* MU313B isolée à partir d'un échantillon de sol prélevé au Japon produisait des amicoumacines A, B et leurs dérivés 8'-phospho. Ces molécules ont été rapportées pour jouer un rôle crucial dans l'inhibition de croissance des *S. aureus* et des MRSA (Hashimoto et al., 2007).

Outre les effets *in vitro* directs sur les souches de *Staphylococcus*, le surnageant de culture de *B. pumilus* 38 COPS cultivé sur milieu Landy potentialise, à la vue des valeurs de la CMI, l'activité de l'érythromycine. Le staphylocoque est un contaminant important de la population de daurades, et certaines des souches isolées étaient multirésistantes aux antibiotiques comme l'érythromycine (Arslan et Ozdemir, 2017). Cet antagonisme est dû à une production concomitante de composés inhibiteurs sécrétés correspondant aux caractéristiques des lipopeptides et des bactériocines. Il convient de noter que le surnageant de culture actif a été testé pour ses caractéristiques de sécurité et est non hémolytique et non cytotoxique pour la lignée cellulaire intestinale HT29-MTX.

L'analyse bio-informatique *in silico* du génome de *B. pumilus* 38 COPS a identifié, respectivement, un cluster de gènes codant pour la surfactine A et un gène codant pour une nouvelle bactériocine appartenant à la famille de la circularine A/uberolysine bactériocine. Le cadre de lecture ouvert codant pour la bactériocine est presque similaire à celui de la souche de *B. pumilus* 51_5il et référencé WP_099726571.1 dans le GenBank. L'alignement des séquences d'acides aminés a révélé un acide aminé différant entre ces deux bactériocines : le remplacement en position 95 d'une alanine par une lysine.

Les surfactines ont été les premiers lipopeptides étudiés (Arima et al., 1968). Les surfactines sont bien connues pour leurs activités tensioactives et antifongiques (Chen et al., 2008). La surfactine A et ses analogues ont récemment été décrits comme des agents antimicrobiens puissants antagonistes des souches de *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* (Perez et al., 2017). La nouvelle bactériocine produite par *B. pumilus* 38 COPS appartient à une famille particulière de bactériocines circulaires qui comprennent les peptides A/uberolysine circulaires. La circularine A est un peptide antimicrobien circulaire de soixante-neuf acides aminés produit par *Clostridium beijerinckii* ATCC 25752 (Kawai et al., 2004), tandis que l'uberolysine est une

bactériocine cyclique de 7 048 Da produite par *Streptococcus uberis* (Wirawan et al., 2007). Cette dernière famille comprend également l'entérocline AS-48 produite par *Enterococcus faecalis* AS-48 (Gálvez et al., 1986) et la carnocycline A produite par *Carnobacterium maltaromaticum* (Martin-Visscher et al., 2008). Les formes matures de ces bactériocines cycliques sont des peptides circularisés d'environ 70 acides aminés. Les bactériocines cycliques entérocline AS-48, carnocycline A et uberolysine présentent un antagonisme principalement actif contre les bactéries Gram-positives telles que *Listeria monocytogenes* et *S. aureus* (Ananou et al., 2004 ; Martin-Visscher et al., 2008 ; Wiraman et al., 2007).

Conclusion Générale & Perspectives

Les objectifs assignés dans ce travail étaient d'évaluer l'impact d'une accumulation de métaux traces tels le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le nickel (Ni) chez les copépodes calanoïdes *E. affinis* (Poppe, 1880) et d'autre part, en l'étude de la diversité microbienne de la chaîne trophique de la daurade *Sparus aurata* associée à une recherche de souches productrices de molécules antagonistes à haute valeur ajoutée qui pourraient être utilisées dans le secteur de l'aquaculture, comme probiotiques (souches) ou alternatifs aux antibiotiques (molécules antagonistes produites). Deux grandes parties ont été distinguées afin d'accomplir ces objectifs.

Pour la première partie, une population de copépodes calanoïdes *E. affinis*, modèle biologique en écotoxicologie a été exposé pendant six jours à une concentration sub-létale ($\sim 1/3$ de LC_{50}) de trois métaux traces, à savoir le Cd, le Cu et le Ni séparément ou en association. La quantification de ces métaux traces en phase dissoute, a montré que dans le cas du Cd ; testé seul et en mélange avec les deux autres métaux trace (Ni et Cu), une tendance d'accumulation quasi-linéaire a été enregistrée. Cependant, l'accumulation relative à l'exposition des copépodes au Cd seul a été plus élevée, comparativement à celle relative à l'exposition au mélange.

Les données de l'accumulation de cuivre ont révélé une augmentation graduelle des concentrations accumulées au fil du temps que ce soit pour les copépodes exposés à une solution renfermant du Cu seul ou en mélange de Cu, Cd et Ni, pour atteindre un plateau après 72 h d'exposition.

En ce qui concerne la cinétique de l'accumulation du Ni, les profils d'accumulation sont statistiquement différents pour les deux traitements seuls et en mélange. Bien qu'une facilité et une rapidité d'accumulation soient remarquées dans les premiers temps, l'absorption de ce métal essentiel atteint progressivement un plateau au-delà de lequel, aucune accumulation n'a été enregistrée.

L'étude des réponses de la population d'*E. affinis* à l'accumulation de ces métaux après la moitié de la durée d'exposition a montré que l'ensemble du cycle de vie est négativement affecté par un effet plus remarquable sur les femelles par rapport aux mâles. Et que le Cu semble avoir l'effet toxique le plus prononcé qui engendre une mortalité importante comparant au Cd et Ni. De même, cette étude de bioaccumulation renforce la pertinence de l'utilisation du modèle biologique « *E. affinis* » pour le suivi de la contamination métallique disponible dans

les milieux aquatiques et appuie l'intérêt des approches de biosurveillance active pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation.

Ces résultats ont été obtenus grâce à la maîtrise des cultures de copépodes dans de gros volumes, la biologie de leur cycle de vie mais également les apports interdisciplinaires (analyses chimiques, microbiologiques...). Toutefois, l'analyse de la diversité de la flore bactérienne associée à cette expérience n'a pas été poussée comme dans la seconde partie de la thèse. Il serait donc très intéressant de suivre également cette interaction entre la diversité bactérienne et la dynamique de ce copépode en présence de polluants métalliques. De même, il serait très intéressant de comprendre les effets cocktails de polluants ce qui serait plus proche des conditions réelles. Néanmoins, cette étude pilote montre que les effets des 3 métaux traces ne sont pas forcément additifs et que le recours à une exposition grand volume de la population entière du copépode (tous les stades de développement) donne une information intégrée plus proche des conditions réelles.

Dans la deuxième partie, l'évaluation de la diversité microbienne de la chaîne trophique des larves de la daurade *Sparus aurata* par une approche culture-dépendante, suivi ensuite d'une identification par MALDI-TOF-MS a permis l'identification d'une microflore cultivable composée au moins de une levure (*Rhodotorula mucilaginosa*) et 53 espèces de bactéries appartenant à 22 genres différents à savoir *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Halomonas*, *Rhodotorula*, *Shewanella*, *Micrococcus*, *Brevibacillus*, *Morganella*, *Dietzia*, *Sphingopyxis*, *Kocuria*, *Lactobacillus*, *Escherichia*, *Nisseria*, *Rhizobium* et *Ralstonia*.

Cependant, un bon nombre de ces espèces identifiées fait partie de la flore marine. Certaines espèces telles *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *B. cereus*, *P. anguilliseptica*, *Pseudomonas putida*, *S. epidermidis* et *S. hominis* présentent un caractère pathogène soit pour les poissons ou bien pour l'homme ou pour les deux. D'autres sont des espèces à intérêt dans plusieurs domaines qui peuvent être valorisées (tels les *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Shewanella* nommée « Bactéries Réductrices de Métaux Dissimilatrices »).

De même le séquençage du gène codant l'ARN ribosomique 16S de certaines souches appartenant aux genres dominants tels *Vibrio*, *Bacillus* et *Staphylococcus* a conclu une corrélation parfaite avec les identifications MALDI-TOF MS effectuées sur les mêmes souches.

Toutefois, cette diversité a été complétée par une attention plus particulière aux souches de *B. pumilus* isolées des œufs de copépodes d'*A. tonsa*. En effet, les cinq souches de *B. pumilus*, nommées 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS et 40A COPS, présentent de forts antagonismes contre plusieurs pathogènes potentiels du poisson tels *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*.

En outre, l'utilisation de l'approche différentielle HPLC-MS/MS, a montré que *B. pumilus* 35R COPS produit deux classes de composés antimicrobiens de type peptides non-ribosomiaux : des surfactines mais aussi les amicoumacines A et B et les phosphoamicoumacines A et B. La souche *B. pumilus* 38 COPS, quant-à-elle, produit également des membres de la famille des surfactines mais surtout une bactériocine appartenant à la famille de la circularine A/uberolysine. L'analyse, par des outils bio-informatiques (Analyse *in silico*) des génomes de ces souches révèle la présence de clusters de gènes codant pour des lipopeptides tels les surfactines et les amicoumacines mais aussi pour un gène ribosomique codant une bactériocine appartenant à la famille de la circularine A/uberolysine.

Afin de compléter cette approche, des premières analyses du microbiote des petites larves de daurade (individu entier quand la taille est petite, âge <20j) ou du tube digestif (pour les post-larves âgées de plus de 40j) ont été initiées dans le cadre de cette thèse en utilisant l'approche de séquençage métagénomique. Ces perspectives à très court terme vont se réaliser dans le cadre de publications scientifiques impliquant plusieurs équipes et experts. En effet, la combinaison entre l'approche métagénomique et l'approche culture-dépendante (culturomique) couplée à la spectrométrie de masse va nous permettre dans le futur de disposer d'outils puissants et complémentaires pour étudier la diversité de la flore dans l'eau (environnement) et toute la chaîne alimentaire des larves de poissons. Un effort particulier sera porté au microbiote du tube digestif qui peut jouer un rôle très important dans l'augmentation des performances immunitaires et zootechniques des jeunes poissons.

A noter également que l'analyse de la diversité de la flore associée aux œufs de l'espèce de copépode *A. tonsa* a révélé un fort intérêt pour isoler de nouvelles souches à fort potentiel probiotique (18 COPS (ICVB399), 35A COPS (ICVB400) ; 35R COPS (ICVB401) ; 40A COPS (ICVB400) ; 38 COPS (ICVB403).

Cette méthodologie peut être appliquée à d'autres espèces de copépodes mais surtout des stades de développement différents (larves, adultes) pour mieux comprendre la dynamique de la flore microbienne associée aux copépodes. D'autres nouvelles espèces à fort potentiel pourraient être également identifiées.

Références bibliographiques

- Abela, M. (1996).** Occurrence of a new histozoic microsporidian (Protozoa, Microspora) in cultured gilt head sea bream *Sparus aurata* L. *Bull EurAssoc Fish Pathol*, 16, 196-199.
- Actis, L. A., Tolmasky, M. E., Crosa, L. M., &Crosa, J. H. (1995).** Characterization and regulation of the expression of FatB, an iron transport protein encoded by the pJM1 virulence plasmid. *Molecular microbiology*, 17(1), 197-204.
- Al Atya, A. K., Drider-Hadiouche, K., Ravallec, R., Silvain, A., Vachee, A., &Drider, D. (2015).** Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from meconium. *Frontiers in microbiology*, 6, 227.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00227>.
- Alvarez-Pellitero, P., & Sitjà-Bobadilla, A. (1993).** *Ceratomyxa* spp.(Protozoa: Myxosporea) infections in wild and cultured sea bass, *Dicentrarchus labrax*, from the Spanish Mediterranean area. *Journal of fishBiology*, 42(6), 889-901.
- Alvarez-Pellitero, P., ADILLA, A. S. B., Franco-Sierra, A., &Palenzuela, O. (1995).**Protozoan parasites of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., from different culture systems in Spain. *Journal of fishDiseases*, 18(2), 105-115.
- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., &Sitjà-Bobadilla, A. (2008).**Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitology international*, 57(2), 110-120.
- Aly, S. M., Ahmed, Y. A. G., Ghareeb, A. A. A., & Mohamed, M. F. (2008).** Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & shellfish immunology*, 25(1-2), 128-136. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.013.
- Aminov, R. I. (2011).** Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Frontiers in microbiology*, 2, 158.
- Anderson, J. P. E., & Domsch, K. H. (1978).** A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil biology and biochemistry*, 10(3), 215-221.
- Arias, A. H., Souissi, A., Roussin, M., Ouddane, B., &Souissi, S. (2016).** Bioaccumulation of PAHs in marine zooplankton: an experimental study in the copepod *Pseudodiaptomus marinus*. *Environmental Earth Sciences*, 75(8), 691. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-5472-1>.
- Athanassopoulou, F. (2007).** Myxosporean parasites. In: Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe (DIPNET) (eds. R. Raynard, T. Wahli, I. Vatsos, & S. Mortensen), pp. 287–293. VESO Publishers, Oslo, Norway.
- Athanassopoulou, F., Prapas, T., & Rodger, H. (1999).** Diseases of *Puntazzo puntazzo* Cuvier in marine aquaculture systems in Greece. *Journal of Fish Diseases*, 22, 215–218.
- Atli, G., Canli, M., (2011).** Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861-1869.

- Attig, H., Dagnino, A., Negri, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A., Dondero, F & Banni, M. (2010). Uptake and biochemical responses of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to sublethal nickel concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (7), 1712e1719.
- Attig, H., Kamel, N., Sforzini, S., Dagnino, A., Jebali, J., Boussetta, H., Viarengo, A & Banni, M.(2014). Effects of thermal stress and nickel exposure on biomarkers responses in *Mytilus galloprovincialis* (Lam). *Mar. Environ. Res.* 94, 65e71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.12.006>
- Aunpad, R., & Na-Bangchang, K. (2007). Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Current microbiology*, 55(4), 308-313.
- Austin, B. (1988). Chemotherapy of bacterial diseases of salmonids. *Proceedings. Aquaculture International Congress and Exposition, Vancouver, British Columbia*. 595-602.
- Austin, B., & Austin, D. A. (1999). Bacterial fish pathogens. *Diseases in farned and wild fish. 3rd(Revised)*.
- Austin, B., & Newaj-Fyzul, A. (Eds.). (2017). *Diagnosis and Control of Diseases of Fish and Shellfish*. John Wiley & Sons.
- Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Moriñigo, M. A., Romalde, J. L., &Toranzo, A. E. (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*, 25, 70-74.
- Avendaño-Herrera, R., Rodríguez, J., Magariños, B., Romalde, J. L., &Toranzo, A. E. (2004). Intraspecific diversity of the marine fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *Journal of applied microbiology*, 96(4), 871-877.
- Aziz, R. K., Bartels, D., Best, A. A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R. A., ... & Meyer, F. (2008). The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, 9(1), 75.
- Bagatto, G., & Alikhan, M. A. (1987). Zinc, iron, manganese, and magnesium accumulation in crayfish populations near copper-nickel smelters at Sudbury, Ontario, Canada. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 38(6), 1076-1081.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C., & Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International journal of food microbiology*, 87(3), 239-250.
- Balcázar, J. L., & Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current microbiology*, 55(5), 409-412
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., &Muzquiz,

- J. L. (2006).** The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary microbiology*, 114(3-4), 173-186.
- Balebona, M. C., Zorrilla, I., Moriñigo, M. A., & Borrego, J. J. (1998).** Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture*, 166(1-2), 19-35.
- Bănărescu, P. (1964).** *Fauna" Republicii Populare Romine*. Romine.
- Barka, S., Pavillon, J. F., & Amiard, J. C. (2001).** Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 128(4), 479-493.
- Barka, S., Pavillon, J. F., & Amiard-Triquet, C. (2010).** Metal distributions in *Tigriopus brevicornis* (Crustacea, Copepoda) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver, and mercury, and implication for subsequent transfer in the food web. *Environmental toxicology*, 25(4), 350-360. <https://doi.org/10.1002/tox>
- Barnabé G. (1991).** Bases biologique et écologiques de l'aquaculture. Edition : Tec et Doc. P.269-300.
- Basurco, B., Marcotegui, M. A., Rueda, A., et al. (1990).** First report of lymphocystis disease in *Sparus aurata* (Linnaeus) in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 10, 71-73.
- Basurco, B., Lovatelli, A., & García, B. (2011).** Current status of *Sparidae* aquaculture. *Sparidae: biology and aquaculture of Gilthead Sea Bream and other species*, 1-50.
- Bauchot, M. L. & Hureau, J. C (1986).** Sparidae in Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. II. United Nations Educational, Scientific and Cultural Organisation. pp 883-907.
- Bauchot, M. L. (1986).** *Sparidae. Checklist of the freshwater fishes of Africa (CLOFFA)*, 2, 331-332.
- Berasategui, A. A., Biancalana, F., Fricke, A., Fernandez-Severini, M. D., Uibrig, R., Dutto, M. S., ... & Hoffmeyer, M. S. (2017).** The impact of sewage effluents on the fecundity and survival of *Eurytemora americana* in a eutrophic estuary of Argentina. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.034>
- Bergh, Ø. (2008)** Bacterial diseases of fish. In: *Fish Diseases* (eds. J.C. Eiras, H. Segner, T. Wahli, & B.G. Kapoor), pp. 239-277. Science Publishers, Enfield, NH, USA.
- Bergh, Ø., & Jelmert, A. (1996).** Iodophor disinfection of eggs of Atlantic halibut. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(2), 135-145.
- Bergh, Ø., & Jelmert, A. (1996).** Iodophor disinfection of eggs of Atlantic halibut. *Journal of Aquatic Animal Health*, 8(2), 135-145.
- Bernardet, J. F., & Grimont, P. A. (1989).** Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus*

- sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 346-354.
- Berthe, F. C., Michel, C., & Bernardet, J. F. (1995).** Identification of *Pseudomonas anguilliseptica* isolated from several fish species in France. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21(2), 151-155.
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., Brunson, E.L., Ingersoll, C.G., (2005).** Acute and chronic toxicity of lead in water and diet to the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol.Chem.* SETAC 24, 1807–1815.
- Besser, J. M., Mebane, C. A., Mount, D. R., Ivey, C. D., Kunz, J. L., Greer, I. E., ... & Ingersoll, C. G. (2007).** Sensitivity of mottled sculpins (*Cottus bairdi*) and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to acute and chronic toxicity of cadmium, copper, and zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry : An International Journal*, 26(8), 1657-1665.
- Bhate, D. S. (1955).** Pumilin, a new antibiotic from *Bacillus pumilus*. *Nature*, 175(4462), 816.817.
- Blewett, T.A., Glover, C.N., Fehsenfeld, S., Lawrence, M.J., Niogi, S., Goss, G.G & Wood, C.M., (2015).** Making sense of nickel accumulation and sub-lethal toxic effects in saline waters: fate and effects of nickel in the green crab, *Carcinus maenas*. *Aquat. Toxicol.* 164, 23e33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.04.010>
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Zorrilla, I., et al. (1996).** Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains to skin mucus of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Applied Environmental Microbiology*, 62, 3650–3654.
- Bourouni, O. C., El Bour, M., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2012).** Antimicrobial resistance and potential probiotic application of *Enterococcus spp.* in sea bass and sea bream aquaculture. In *Antibiotic Resistant Bacteria-A Continuous Challenge in the New Millennium*. InTech.
- Bovo, G. & Florio, D. (2008).** Viral diseases of cultured fish. In: *Fish Diseases* (eds. J.C. Eiras, H. Segner, T. Wahli, & B.G.Kapoor), pp. 185–238. *Science Publishers, Enfield, NH, USA*.
- Bovo, G. (1995).** "Winter Disease" in reared sea bream: Preliminary observations. In *3rd Natl. Conf. Italian Soc. Fish Path.*, 1995 (Vol. 7, pp. 2-11).
- Bowen, H. J. M. (1979).** *Environmental chemistry of the elements*. Academic Press.
- Brack, C., Mikolasch, A., Schlueter, R., Otto, A., Becher, D., Wegner, U., Albrecht, D., Riedel, K., Schauer, F. (2015).** Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Marine Biotechnology*, 17(3), 290-304.
- Brignon, J. M., Malherbe, L., & Soleille, S. (2005).** *Les substances dansgereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau–Fiches de données technicoéconomiques. Rapport final.* INERIS DRC-MECO-2004-59520.
- Bryan G. W., (1984).** Pollution due to heavy metals and their compounds. *Marine ecology* 5:1290-1431

- Burel, A., Sousa pacheco P, Dunand J, Amir H, Kelder M, Lamige S, Monteil R, Mortamet M, Nguyen C, Sim Y et Tertrais S. (2007).** La pisciculture est-elle une « bonne » alternative à la pêche traditionnelle ?. *Projet de Sciences humaines*, pp 11-13
- Cain, D. J., Luoma, S. N., & Wallace, W. G. (2004).** Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(6), 1463-1473.
- Calderer, A., & Cardona, L. (1993).** Cria intensiva de la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*). *Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnológicos de la Producción*, 389-401.
- Campbell, P.G.C., (1995).** Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model, Tessier A., Turner DR, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, 1995, 45-102. Wiley, New York.
- Carbone, D., & Faggio, C. (2016).** Importance of prebiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 54, 172-178.
- Carey, T. G., & Pritchard, G. I. (1995).** Fish health protection: a strategic role in Canadian fisheries management. *North American Journal of Fisheries Management*, 15(1), 1-13.
- Carnevali, O., Zamponi, M. C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpianesi, C., ... & Cresci, A. (2004).** Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquaculture International*, 12(4-5), 377-386.
- Cataudella, S., Crosetti, D. & Marino, G. (1995).** The sea breams. In: *Production of Aquatic Animals* (eds. C.E. Nash & A.J. Navotny), pp. 289–303. Fishes, Elsevier, Amsterdam.
- Chau, Y. K., & Kulikovsky-Cordeiro, O. T. R. (1995).** Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environmental Reviews*, 3(1), 95-120.
- Chen, M. E., Henry-Ford, D., & Groff, J. M. (1995).** Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *Journal of Aquatic Animal Health*, 7(4), 318-326.
- Cheng, S. H., Kâ, S., Kumar, R., Kuo, C. S., & Hwang, J. S. (2011).** Effects of salinity, food level, and the presence of microcrustacean zooplankters on the population dynamics of rotifer *Brachionus rotundiformis*. *Hydrobiologia*, 666(1), 289-299.
- Chiffolleau J F., Auger D., Boutier B., Rozuel E., Truquet I. (2003).** Dosage de certains métaux dans les sédiments et la matière en suspension par absorption atomique. IFREMER 45p
- Chuah, L. O., Effarizah, M. E., Goni, A. M., & Rusul, G. (2016).** Antibiotic application and emergence of multiple antibiotic resistance (MAR) in global catfish aquaculture. *Current environmental health reports*, 3(2), 118-127.
- Chowdhury, M.J., Bucking, C., Wood, C.M., (2008).** Is nickel an essential metal for aquatic animals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 266–267. doi:10.1897/1551-793(2008)4[266:INAEMF]2.0.CO;2

- Clason, B., Duquesne, S., Liess, M., Schulz, R., & Zauke, G. P. (2003).** Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquatic Toxicology*, 65(2), 117-140.
- Clemens, S. (2001).** Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 212(4), 475-486.
- Code de L'environnement**, Partie législative, Livre IV, Titre III, Chapitre Ier, Section 3, Article L431-6 (Mise à jour le 16/04/15). In : Legifrance [en ligne] [http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=E65E3C228CC198194F4137F0C39991D41.tpdila08v_2?idSectionTA=LEGISCTA000006176651&cidTexte=LEGITEXT000006074220&dateTexte=20150416] (Consulté le 19/07/18)
- Colorni, A., & Diamant, A. (1995).** Splenic and cardiac lymphocystis in the red drum, *Sciaenopsocellatus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 18(5), 467-471.
- Colorni, A., Paperna, I., & Gordin, H. (1981).** Bacterial infections in gilt-head sea bream *Sparus aurata* cultured at Elat. *Aquaculture*, 23(1-4), 257-267.
- Colorni, A., & Padrós, F. (2011).** Diseases and health management. *Sparidae : biology and aquaculture of Gilthead Sea Bream and other species* 321-357
- Colwell, R. R., & Huq, A. (1998).** Global microbial ecology: biogeography and diversity of Vibrios as a model. *Journal of applied microbiology*, 85(S1), 134S-137S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05292.x>
- Conceição, L. E., Yúfera, M., Makridis, P., Morais, S., & Dinis, M. T. (2010).** Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture research*, 41(5), 613-640.
- Craig, G., Paynter, D., Coscia, I., & Mariani, S. (2008).** Settlement of gilthead sea bream *Sparus aurata* L. in a southern Irish Sea coastal habitat. *Journal of Fish Biology* 72: 287–291.
- Cripe, G. M., & Cripe, C. R. (1990).** *Comparative acute sensitivity of selected estuarine and marine crustaceans to toxic substances*. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory.
- Croteau, M. N., & Luoma, S. N. (2007).** Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environmental science & technology*, 41(9), 3140-3145. <https://doi.org/10.1021/es0615122>.
- Cullen, J. T., Lane, T. W., Morel, F. M., & Sherrell, R. M. (1999).** Modulation of cadmium uptake in phytoplankton by seawater CO₂ concentration. *Nature*, 402(6758), 165. doi:10.1038/46469
- Davies, D. S., Grant, J., & Catchpole, M. (2013).** *The drugs don't work: a global threat*. Penguin UK.

- Deane, E.E., Li, J. & Woo, N.Y.S. (2001).** Hormonal status and phagocytic activity in sea bream infected with vibriosis. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 129, 687–693.
- DeForest, D. K., & Schlekat, C. E. (2013).** Species sensitivity distribution evaluation for chronic nickel toxicity to marine organisms. *Integrated environmental assessment and management*, 9(4), 580-589.
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002).** Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical reviews in oncology/hematology*, 42(1), 35-56.
- Devesa, S., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1989).** Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 12(4), 323-333.
- Diamant, A. (1992).** A new pathogenic histozoic Myxidium (*Myxospora*) in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata* L. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12(2), 64-66.
- Diamant, A., Lom, J., & Dyková, I. (1994).** *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 20(2), 137-141.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., (2001).** Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396.
- Doimi, M. (1996).** A new winter disease in sea bream (*Sparus aurata*): a preliminary report. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 16(1), 17-18.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J. F., García, J. A., Cutuli, M. T., Blanco, M., Gibello, A., ... & Domínguez, L. (1999).** Association of *Pseudomonas anguilliseptica* infection with 'winter disease' in sea bream, *Sparus aurata* L. *Journal of fish diseases*, 22(1), 69-71.
- Doménech, A., Fernández-Garayzábal, J. F., Lawson, P., García, J. A., Cutuli, M. T., Blanco, M., ... & Domínguez, L. (1997).** Winter disease outbreak in sea-bream (*Sparus aurata*) associated with *Pseudomonas anguilliseptica* infection. *Aquaculture*, 156(3-4), 317-326.
- Drago, L., Mattina, R., Nicola, L., Rodighiero, V., & De Vecchi, E. (2011).** Macrolide resistance and in vitro selection of resistance to antibiotics in *Lactobacillus* isolates. *The Journal of Microbiology*, 49(4), 651. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0470-1>.
- Duc, L. H., Hong, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., & Cutting, S. M. (2004).** Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2161-2171.
- Dutta, T. K., & Kaviraj, A. (2001).** Acute toxicity of cadmium to fish *Labeo rohita* and copepod *Diaptomus forbesi* pre-exposed to CaO and KMnO₄. *Chemosphere*, 42(8), 955-958.
- Dziallas, C., Grossart, H. P., Tang, K. W., & Nielsen, T. G. (2013).** Distinct communities of

- free-living and copepod-associated microorganisms along a salinity gradient in Godthåbsfjord, West Greenland. *Arctic, antarctic, and alpine research*, 45(4), 471-480. <https://doi.org/10.1657/1938-4246.45.4.471>
- Ekendahl, S., O'Neill, A. H., Thomsson, E., & Pedersen, K. (2003).** Characterisation of yeasts isolated from deep igneous rock aquifers of the Fennoscandian Shield. *Microbial Ecology*, 46(4), 416-428. <https://doi.org/10.1007/s00248-003-2008-5>.
- Eisler, R., (1998).** Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review.
- Eisler, R. (1985).** *Cadmium hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review* (No. 2). Fish and Wildlife Service, US Department of the Interior.
- Ensibi, C., & Yahia, M. N. D. (2017).** Toxicity assessment of cadmium chloride on planktonic copepods *Centropages ponticus* using biochemical markers. *Toxicology reports*, 4, 83-88.
- Ettoumi, B., Raddadi, N., Borin, S., Daffonchio, D., Boudabous, A., & Cherif, A. (2009).** Diversity and phylogeny of culturable spore-forming Bacilli isolated from marine sediments. *Journal of basic microbiology*, 49(S1), S13-S23.
- Evjemo, J. O., & Olsen, Y. (1997).** Lipid and fatty acid content in cultivated live feed organisms compared to marine copepods. In *Live food in aquaculture* (pp. 159-162). Springer, Dordrecht.
- Fakayode, S.O. (2005).** Impact assessment of industrial effluent on water quality of the receiving Alaro River in Ibadan, Nigeria. *AJEAM-RAGEE*, 10 : 1-13.
- FAO 2016.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2016. Contribuer à la sécurité alimentaire et à la nutrition de tous. Rome. 224 pages.
- FAO 2018.** La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2018. Atteindre les objectifs de développement durable. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- FAO 2005-2018.** Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. *Sparus aurata*. Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées. Texte par Colloca, F.; Cerasi, S. Dans: Département des pêches et de l'aquaculture de la FAO [en ligne]. Rome. Mis à jour 8 February 2005. [Cité le 27 June 2018].
- Finiguerra, M. B., Dam, H. G., Avery, D. E., & Burris, Z. (2013).** Sex-specific tolerance to starvation in the copepod *Acartia tonsa*. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 446, 17-21.
- Fioravanti, M. L., Caffara, M., Florio, D., Gustinelli, A., & Marcer, F. (2006).** A parasitological survey of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cultured in Italy. *Veterinary Research Communications*, 30(1), 249-252.
- Fioravanti, M.L., Caffara, M., Florio, D., et al. (2004).** Nuove osservazioni sulle mixosporidiosi marine. Abstract, p. 33. XI Convegno Nazionale della Società Italiana di Patologia Ittica, Finale Ligure (Savona, Italy), ottobre 7-9, 2004.
- Fisher, W, Schneider, M., & Bauchot, M.L, (1987).** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et Mer Noire. Zone de pêche 37, vol. II,

- Vertébrés, FAO et CEE, pp. 1186–1189.
- Florence, T. M., Stauber, J. L., & Ahsanullah, M. (1994).** Toxicity of nickel ores to marine organisms. *Science of the total environment*, 148(2-3), 139-155. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90391-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90391-3).
- Fouz, B., Toranzo, A.E., Milan, M., et al. (2000).** Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 531–535.
- Gallardo, M. A., Sala-Rabanal, M., Ibarz, A., Padrós, F., Blasco, J., Fernández-Borras, J., & Sánchez, J. (2003).** Functional alterations associated with “winter syndrome” in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 223(1-4), 15-27.
- Ganguly, S., & Prasad, A. (2012).** Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in fish biology and fisheries*, 22(1), 11-16.
- Garcia-Rosado, E., Castro, D., Rodriguez, S., Perez-Prieto, S. I., & Borrego, J. J. (1999).** Isolation and characterization of *lymphocystis* virus (FLDV) from gilt-head sea bream (*Sparus aurata*, L.) using a new homologous cell line. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 19, 53–56.
- García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., ... & Borrego, J. J. (2007).** Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology*, 10(3), 193.
- Gatesoupe, F. J. (1999).** The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180(1-2), 147-165.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., & al. (1995)** Small-subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45, 139– 144.
- Ghosal, T. K., & Kaviraj, A. (2002).** Combined effects of cadmium and composted manure to aquatic organisms. *Chemosphere*, 46(7), 1099-1105.
- Gildberg, A., Mikkelsen, H., Sandaker, E., & Ringø, E. (1997).** Probiotic effect of lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Hydrobiologia*, 352(1-3), 279-285.
- Gnanamoorthy, P., Manimaran, K., Ashok Prabu, V., & Selvam, T. (2012).** Cadmium toxicity study of copepod (*Oithona similis*). *Int. J. Cur. Tr. Res*, 1(1), 8-12.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., & Turnbull, J. F. (2000).** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1-3), 259-270.
- Grave, K., Markestad, A., & Bangen, M. (1996).** Comparison in prescribing patterns of antibacterial drugs in salmonid farming in Norway during the periods 1980-1988 and 1989-1994. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 19(3), 184-191.

- Grossart, H. P., Dziallas, C., Leunert, F., & Tang, K. W. (2010).** Bacteria dispersal by hitchhiking on zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), 11959-11964.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O. G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2011).** Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7(7), e1002158.
- Guzzo, A., & DuBow, M. S. (1994).** Identification and characterization of genetically programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 14(4), 369-374.
- Hagler, A. N., & Mendonça-Hagler, L. C. (1981).** Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(1), 173-178.
- Hall Jr, L. W., Ziegenfuss, M. C., Anderson, R. D., & Lewis, B. L. (1995).** The effect of salinity on the acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Marine Pollution Bulletin*, 30(6), 376-384.
- Hall, B. G. (2013).** Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Molecular biology and evolution*, 30(5), 1229-1235.
- Handler, J., Soltani, M., & Percival, S. (1997).** The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases*, 20(3), 159-168.
- Hansen, B., & Bech, G. (1996).** Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. *Journal of plankton research*, 18(2), 257-273.
- Harrison, P. M. & Hoare, R. J. (1980).** Metals in Biochemistry, Chapman and Hall, London.
- Håstein T. (1988).** Disease Control through Management Practices. Congress Proceedings, Aquaculture International Congress & Exposition. Vancouver, British Columbia, Canada, 603-606.
- Håstein T. (1994).** Disease problems, use of drugs, resistance problems and preventive measures in fish farming world wide. *Proceedings of the first International Symposium on Sustainable Fish Farming*, Oslo, Norway, AA. Balkema, Rotterdam, Brookfield, eds. Reinertsen H. & Haaland H., 183-194.
- Hastein, T. (1995).** Disease problems, use of drugs, resistance problems and preventive measures in fish farming world wide. *Sustainable fish farming*, 183.
- Hastein, T., Hjeltne, B., Lillehaug, A., UtneSkare, J., Berntssen, M., & Lundebye, A. K. (2006).** Food safety hazards that occur during the production stage: challenges for fish farming and the fishing industry. *RevSci Tech*, 25(2), 607-25.
- Hiraki, M. (1994).** Populations of Cd-tolerant microorganisms in soils polluted with heavy metals. *Soil science and plant nutrition*, 40(3), 515-524. <https://doi.org/10.1080/00380768.1994.10413329>

- Hiroki, M. (1992).** Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(1), 141-147.
- Hjeltnes, B., & Roberts, R. J. (1993).** *Vibriosis. Bacterial diseases of fish*, 109-121.
- Holzer, A.S., Montero, F.E., Repullés-Albelda, A., et al. (2007).** Morphological characterisation and phylogenetic positioning of a new sanguinicolid blood fluke, a pathogen in Mediterranean *Sparus aurata* L. culture. European Association of Fish Pathologists, 13th International Conference of Fish and Shellfish Diseases. Grado, Italy, September 17–21, 2007, Book.
- Hong, H. A., Duc, L. H., & Cutting, S. M. (2005).** The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 813-835. doi: 10.1016/j.femsre.2004.12.001
- Howard, C. L., & Hacker, C. S. (1990).** Effects of salinity, temperature, and cadmium on cadmium-binding protein in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19(3), 341-347.
- Huang, S.L., Chen, W.C., Shei, M.C., Liao, I., SN Chen S.N., (1999).** Zoological Studies, Studies on epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*Oreochromis spp.*) cultured in Taiwan. *Zoological Studies*, 1999, vol. 38, no 2, p. 178-188.
- Humes A.G. (1994).** How many copepods? *Hydrobiologia*, 292, 1-7.
- Hutchinson, T. H., Williams, T. D., & Eales, G. J. (1994).** Toxicity of cadmium, hexavalent chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe battagliai*). *Marine Environmental Research*, 38(4), 275-290.
- Ibarz, A., Beltrán, M., Fernández-Borràs, J., Gallardo, M. A., Sánchez, J., & Blasco, J. (2007).** Alterations in lipid metabolism and use of energy depots of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at low temperatures. *Aquaculture*, 262(2-4), 470-480.
- ICMSF. (2005).** Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities, 2nd edn. Kluwer Academic Plenum, New York.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014).** Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), 60-72.
- Jakob, L., Bedulina, D. S., Axenov-Gribanov, D. V., Ginzburg, M., Shatilina, Z. M., Lubyaga, Y. A., ... & Sartoris, F. J. (2017).** Uptake Kinetics and Subcellular Compartmentalization Explain Lethal but Not Sublethal Effects of Cadmium in Two Closely Related Amphipod Species. *Environmental Science & Technology*, 51(12), 7208-7218.
- Jansen, E., Michels, M., Van Til, M., & Doelman, P. (1994).** Effects of heavy metals in soil on microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an ecologically relevant parameter. *Biology and Fertility of soils*, 17(3), 177-184.

- Jarp, J., &Karlsen, E. (1997).** Infectious *salmon anaemia* (ISA) risk factors in sea-cultured Atlantic salmon *Salmo salar*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 28(2), 79-86.
- Jarp, J., Tangen, K., Willumsen, F. V., Djupvik, H. O., & Tveit, A. M. (1993).** Risk factors for infection with *Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida* in Norwegian freshwater hatcheries. *Diseases of aquatic organisms*, 17(2), 81-86.
- J.D. Lebrun, O. Geffard, N. Urien, A. François, E. Uher, L.C. Fechner. (2015).** Seasonal ariability and inter-species comparison of metal bioaccumulation in caged gammarids under urban diffuse contamination gradient: Implications for biomonitoring investigations. *Sci. Total Environ.* 511, 501–508. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.078
- Jiang, X. D., Wang, G. Z., Li, S. J., & He, J. F. (2007).** Heavy metal exposure reduces hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. *Journal of Environmental Sciences*, 19(6), 733-737.
- Kadiene, E. U., Bialais, C., Ouddane, B., Hwang, J. S., &Souissi, S. (2017).** Differences in lethal response between male and female calanoid copepods and life cycle traits to cadmium toxicity. *Ecotoxicology*, 26(9), 1227-1239. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1848-6>
- Kahle, J., &Zauke, G. P. (2002).** Bioaccumulation of trace metals in the copepod *Calanoidesacutus* from the Weddell Sea (Antarctica): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *AquaticToxicology*, 59(1-2), 115-135. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(01\)00245-4](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00245-4)
- Kahle, J., &Zauke, G. P. (2003).**Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Orchomene plebs*: evaluation of toxicokinetic models. *Marine environmentalresearch*, 55(5), 359-384. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00288-X](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00288-X)
- Kahle, J., &Zauke, G. P. (2003).**Trace metals in Antarctic copepods from the Weddell Sea (Antarctica). *Chemosphere*, 51(5), 409-417.
- Kalinovskaya, N. I., Kuznetsova, T. A., Ivanova, E. P., Romanenko, L. A., Voinov, V. G., Huth, F., &Laatsch, H. (2002).** Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from ascidian *Halocynthiaaurantium*. *Marine biotechnology*, 4(2), 179-188.
- Kapperud, G., &Jonsson, B. (1978).** Yersinia enterocolitica et bactéries apparentées isolées à partir d'écosystèmes d'eau douce en Norvège. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 8(11), 500-506. [https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(78\)80117-6](https://doi.org/10.1016/S0399-077X(78)80117-6)
- Katemo Manda, B., Colinet, G., André, L., Chocha Manda, A., Marquet, J. P., & Micha, J. C. (2010).** Evaluation de la contamination de la chaîne trophique par les éléments traces (Cu, Co, Zn, Pb, Cd, U, V et As) dans le bassin de la Lufira supérieure (Katanga/RD Congo). *Tropicultura*, 28(4), 246-252.
- Kennish, M. J. (1997).** *Pollution impacts on marine biotic communities* (Vol. 14). CRC Press.
- Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-matbouli, m. A. N. S. O. U. R., desseR,**

- S. S., DEVLIN, R. H., ... & HALLETT, S. L. (2001). Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(4), 395-413.
- Kentouri, M., Divanach, P., & Paris, J. (1981). Préférences alimentaires et comportement de la larve de daurade *Sparus auratus* face à du zooplancton congelé. In *Annales de zootechnie* (Vol. 30, No. 4, pp. 391-410).
- Korsman, J. C., Schipper, A. M., De Hoop, L., Mialet, B., Maris, T., Tackx, M. L., & Hendriks, A. J. (2014). Modeling the impacts of multiple environmental stress factors on estuarine copepod populations. *Environmental science & technology*, 48(10), 5709-5717. <https://doi.org/10.1021/es5004439>
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., & Appel, L. J. (2002). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *circulation*, 106(21), 2747-2757.
- Krumschnabel, G., Manzl, C., Berger, C., & Hofer, B. (2005). Oxidative stress, mitochondrial permeability transition, and cell death in Cu-exposed trout hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 209(1), 62-73.
- Kubilay, A., & Ulukoy, G. (2004). First isolation of *Staphylococcus epidermidis* from cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in Turkey. *Bulletin-european association of fish pathologists.*, 24(3), 137-143.
- Kucuksezgin F., Kontas A., Altay O., Uluturhan E., Darilmaz E., (2006)-Assessment of marine pollution in Izmir Bay: Nutrient, heavy metal and total hydrocarbon concentrations. *Environment International* 32 : 41-51
- Kumar, R., Souissi, S., & Hwang, J. S. (2012). Vulnerability of carp larvae to copepod predation as a function of larval age and body length. *Aquaculture*, 338, 274-283.
- Kushner, I. (1993). Regulation of the acute phase response by cytokines. *Perspectives in biology and medicine*, 36(4), 611-622.
- Kusuda, R. (1972). Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent-I. On the morphological and biochemical properties. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38, 1325-1332.
- Kusuda, R., Yokoyama, J. & Kawai, K. (1986). Bacteriological study on cause of mass mortalities in cultured black sea bream fry. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52, 1745-1751.
- Kvitt, H., Ucko, M., Colorni, A., Batargias, C., Zlotkin, A., & Knibb, W. (2002). *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*: detection by direct amplification of 16S rRNA gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Diseases of aquatic organisms*, 48(3), 187-195.
- Labella, A., Vida, M., Alonso, M.C., et al. (2006). First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured red banded sea bream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *Journal of Fish Diseases*, 29, 175-179.

- Lafabrie, C. (2007).** *Utilisation de Posidonioceanica (L.) Delile comme bio-indicateur de la contamination métallique* (Doctoral dissertation, Université de Corse).
- Lasserre, G. (1976).** Dynamique des populations ichthyologiques lagunaires ; application à *Sparus aurata* L.
- Le Breton, A. & Marques, A. (1995).** Occurrence of a histozoic Myxidium infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15, 210–212.
- Le Deuff, R. M., & Renault, T. (1993).** Lymphocystis outbreaks in farmed sea bream, *Sparus aurata*, first report on French Mediterranean coast. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 13(4), 130-133.
- Lee, C.H., Paek, N.C., Kim, D.S. et al. (2002).** Effects of a *Paecilomyces japonica* - supplemented diet on the chemiluminescent response of phagocytes and growth in juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 208, 51–57.
- Lee, J. G., Roberts, S. B., & Morel, F. M. (1995).** Cadmium: a nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *Limnology and Oceanography*, 40(6), 1056-1063.
- Lewis, D.H., Grumbles, L.C., McConnell, S. and Flowers, A.I. (1970)** Pasteurella -like bacteria from a epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. *Journal of Wildlife Diseases* 6 , 160–162.
- Leroi, F. (2010).** Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology* .27: 698-709.
- Lewis, D.H., Grumbles, L.C., McConnell, S. and Flowers, A.I. (1970).** Pasteurella -like bacteria from a epizootic in menhaden and mullet in Galveston Bay. *Journal of Wildlife Diseases* 6 , 160–162.
- Li, F., & Tan, T. C. (1994).** Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly (4-vinylpyridine)-coated microbial sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 9(6), 445-455.
- Li, J., Zhou, L., & Woo, N. Y. (2003).** Invasion route and pathogenic mechanisms of *Vibrio alginolyticus* to silver sea bream *Sparus sarba*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(4), 302-313.
- Li, Y., Li, Z., Yamanaka, K., Xu, Y., Zhang, W., Vlamakis, H., ... & Qian, P. Y. (2015).** Directed natural product biosynthesis gene cluster capture and expression in the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Scientific reports*, 5, 9383. <https://doi.org/10.1038/srep09383>.
- Lillehaug A. (1996).** Vaccination strategies in seawater cage culture of salmonids. Abstracts International Symposium on *Fish Vaccinology*, Oslo, Norway, 51.
- Lira, V. F., Santos, G. A. P., Derycke, S., Larrazabal, M. E. L., Fonsêca-Genevois, V. G., & Moens, T. (2011).** Effects of barium and cadmium on the population development of the marine nematode *Rhabditis (Pellioiditis) marina*. *Marine environmental research*, 72(4), 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.07.003>

- Liu, Y., Lai, Q., Dong, C., Sun, F., Wang, L., Li, G., & Shao, Z. (2013).** Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PloS one*, 8(11), e80097.
- López-Romalde, S., Magariños, B., Núñez, S., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2003a).** Phenotypic and genetic characterization of *Pseudomonas anguilliseptica* strains isolated from fish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 15(1), 39-47.
- López-Romalde, S., Nuñez, S., Toranzo, A. E., & Romalde, J. L. (2003b).** Black spot seabream (*Pagellus bogaraveo*), a new susceptible host for *Pseudomonas anguilliseptica*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(6), 258-264.
- Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J.E., et al. (1981).** *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damsel fish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 214, 1139–1140.
- Lebrun, J.D., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.H & Gourlay-Francé, C. (2014).** Essential metal contents in indigenous gammarids related to exposure levels at the river basin scale: Metal-dependent models of bioaccumulation and geochemical correlations. *Sci. Total Environ.* 466, 100–108
- Lubzens, E. (1987).** Raising rotifers for use in aquaculture. In *Rotifer Symposium IV* (pp. 245-255). Springer, Dordrecht
- Lund, T., Fjalestad, K., Røed, K.H. & Strømsheim, A. (1992).** Use of immune -parameters for indirect selection of increased disease resistance. (In Norwegian) *Norsk Fiskeoppdrett*, No 11A, 15-16.
- Luoma, S. N. (1983).** Bioavailability of trace metals to aquatic organisms—a review. *Science of the total environment*, 28(1-3), 1-22.
- Luoma, S. N., & Rainbow, P. S. (2005).** Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science & Technology*, 39(7), 1921-1931. <https://doi.org/10.1021/es048947e>
- Luoma, S. N., Ho, Y. B., & Bryan, G. W. (1995).** Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Marine Pollution Bulletin*, 31(1-3), 44-54.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., Luoma, S., others, (2008).** Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press.
- Magariños, B., Couso, N., Noya, M., Merino, P., Toranzo, A. E., & Lamas, J. (2001).** Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 195(1-2), 17-21.
- Magarinos, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J. L., & Toranzo, A. E. (1995).** Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21(2), 103-108.
- Magariños, B., Romalde, J. L., Bandin, I., Fouz, B., & Toranzo, A. E. (1992).** Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish.

- Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3316-3322.
- Mahjoub, M. S., Kumar, R., Souissi, S., Schmitt, F. G., & Hwang, J. S. (2012).** Turbulence effects on the feeding dynamics in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 416, 61-67.
- Manimaran, K., Prabu, V.A., Selvam, T., (2012).** Cadmium toxicity study of copepod (*Oithona similis*) 1, 8–12.
- Martin, J.M., Windom, H.L., (1991).** Present and future roles of ocean margins in regulating marine biogeochemical cycles of trace elements. *Ocean Margin Process. Glob. Change* 45–67.
- Martinez, J. L. (2003).** Recent advances on antibiotic resistance genes. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 10, 13-32.
- Masoero, L., Ercolini, C., Caggiano, M., et al. (1986).** Osservazioni preliminari sulla Linfocisti in una maricoltura intensiva italiana. *Rivista Italiana di Piscicoltura e Ittiopatologia*, 2, 70–74.
- Mathieu-Daude, F., Faye, N., Coste, F., Manier, J. F., Marques, A. D. A. M., & Bouix, G. (1992).** Occurrence of a microsporidiosis in marine cultured gilt-head sea bream from the Languedoc coast: a problem of specificity in the genus *Glugea* (Protozoa, Microspora). *Bull Eur Assoc Fish Pathol*, 12, 67-70.
- McKinnon, A. D., Duggan, S., Nichols, P. D., Rimmer, M. A., Semmens, G., & Robino, B. (2003).** The potential of tropical paracalanid copepods as live feeds in aquaculture. *Aquaculture*, 223(1-4), 89-106.
- McVicar, A. H., & White, P. G. (1979).** Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 2(6), 557-562.
- McVicar, A. H., & White, P. G. (1982).** The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture*, 26(3-4), 213-222.
- Menezes, J. (1987).** Lymphocystis disease: an outbreak in *Sparus aurata* from Ria Formosa, south coast of Portugal. *Aquaculture*, 67, 222-225.
- Meyer, J. S., Ranville, J. F., Pontasch, M., Gorsuch, J. W., & Adams, W. J. (2015).** Acute toxicity of binary and ternary mixtures of Cd, Cu, and Zn to *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(4), 799-808.<https://doi.org/10.1002/etc.2787>
- Miquel, A. (2001).** Le Calcul des Constructions implicite: syntaxe et sémantique. *These de doctorat, Université Paris*, 7.
- Miranda, C. A., Martins, O. B., & Clementino, M. M. (2008).** Species-level identification of *Bacillus* strains isolates from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-tRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(3), 297-304.

- Mladineo, I., Miletić, I., & Bočina, I. (2006).** *Photobacterium damsela* subsp. piscicida outbreak in cage-reared Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Journal of aquatic animal health*, 18(1), 51-54.
- Moate, R.M., Harris, J.E. & McMahon, S. (1992).** Lymphocystis infections in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*) in the Aegean Sea. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 12, 134–136.
- Mohammed, E. H., Wang, G., & Jiang, J. (2010).** The effects of nickel on the reproductive ability of three different marine copepods. *Ecotoxicology*, 19(5), 911-916.
- Mohammed, E. H., Wang, G., Xu, Z., Liu, Z., & Wu, L. (2011).** Physiological response of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* experimentally exposed to cadmium. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation-International Journal of the Bioflux Society (AACL Bioflux)*, 4, 99–107.
- Monbet, P., & Coquery, M. (2013).** Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques (Rapport technique No. INERIS DRC-03-46820-PMo/JL-03.0672). *INERIS, Verneuil en Halatte*.
- Montero, F.E., Cuadrado, M., Padros, F., et al. (2007)** Cryptocaryon irritans and Enteromyxum leei, two threats for the culture of Diplodus puntazzo in the Mediterranean. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 27(6), 242–249.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., Pesce, S., (2010).** The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières -Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657, 123 –141. doi:10.1007/s10750-010-0105-2
- Morel, F.M.M., (1983).** Principles of aquatic chemistry, 1983. Wiley: New York.
- Moriarty, D. J. W. (1998).** Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164(1-4), 351-358. doi: 10.1016/S0044-8486(98) 00199-9.
- Mubiana, V. K., & Blust, R. (2007).** Effects of temperature on scope for growth and accumulation of Cd, Co, Cu and Pb by the marine bivalve *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 63(3), 219-235.
- Mukherjee, A.B., (1998).** Nickel: a review of occurrence, uses, emissions, and concentration in the environment in Finland. *Environ. Rev.* 6, 173–187. doi:10.1139/a99-001
- Muroga, K. (1977).** Pasteurellosis in cultured black sea bream (*Mylio macrocephalus*). *J. Fac. Fish. Anim. Husb. Hiroshima Univ.*, 16, 17-21.
- Muziasari, W. I., Pärnänen, K., Johnson, T. A., Lyra, C., Karkman, A., Stedtfeld, R. D., ... & Virta, M. (2016).** Aquaculture changes the profile of antibiotic resistance and mobile genetic element associated genes in Baltic Sea sediments. *FEMS microbiology ecology*, 92(4).
- Mylonas, C.C., Zohar, Y., Pankhurst, N., & Kagawa, H. (2011).** Reproduction and broodstock management. In: Pavlidis, M.A., and Mylonas, C.C. (eds), *Sparidae: biology*

- and aquaculture of gilthead sea bream and other species, pp. 95–131. Blackwell Publishing, Oxford.
- Nakajima, K., Muroga, K., & Hancock, R. E. (1983).** Comparison of fatty acid, protein, and serological properties distinguishing outer membranes of *Pseudomonas anguilliseptica* strains from those of fish pathogens and other *pseudomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(1), 1-8.
- Nakhlé K F., Cossa D., Khalaf G., Beliaeff B., (2005).** *Brachidontes variabilis* and *Patella* sp. As quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. *Environment Pollution* vol 142, issue1: 73-82
- Nayak, S. K. (2010).** Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish & shellfish immunology*, 29(1), 2-14.
- Neff, J. M. (2002).** Bioaccumulation in Marine Organisms: Effect of contaminants from oil well produced water, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Newman, S. G., & Deupree, R. (1995).** Biotechnology in aquaculture. *Infofish International*, 1(95), 40-60.
- Nieboer, E., & Templeton, D. M. (1994).** Special Issue Nickel Biochemistry, Toxicology, and Ecologic Issues in: *Sci. Total Environ.*, A collection of papers presented at the Fifth International Conference on Nickel Biochemistry. *Toxicology and Ecologic Issues*,(eds), 148.
- NO, L. (1999).** *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish.
- Nor, Y. M. (1987).** Ecotoxicity of copper to aquatic biota: a review. *Environmental research*, 43(1), 274-282.
- O'Neill, J. (2015).** The Review on Antimicrobial Resistance Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. online: [http://amr-review.org/sites/default/files/Antimicrobials %20in%20 agriculture %20 and %20 the %20 environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf](http://amr-review.org/sites/default/files/Antimicrobials%20in%20agriculture%20and%20the%20environment%20-%20Reducing%20unnecessary%20use%20and%20waste.pdf) (accessed on 25 May 2018).
- Ogindo, B. A. (2001).** Heavy metal pollutants and their concentrations in fish (barbus species) in Sosiani River, Kenya. *Discovery and Innovation*, 13(3), 178-183.
- OHNISHI, K., WATANABE, K. I., & Jo, Y. (1982).** Pasteurella infection in young black seabream. *Fish Pathology*, 16(4), 207-210.
- Olmos, J., & Paniagua-Michel, J. (2014).** *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *Microb & Biochem Technol*, 6(7), 361-365.
- OMS-IPCS (1998).** Environmental Health Criteria n°200: copper, World Health Organisation, International Programme on chemical safety. <http://www.inchem.org/fullist.htm>.
- Ostland, V. E., Morrison, D., & Ferguson, H. W. (1999).** *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health*, 11(1), 35-44.

- Ouddane, B. (1990).** *Comportement des éléments majeurs et mineurs dans un milieu soumis à des gradients physico-chimiques marqués: cas de l'estuaire de la Seine* (Doctoral dissertation).
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H. Y., Cohoon, M., ... & Fonstein, M. (2005).** The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic acids research*, 33(17), 5691-5702.
- Paari, A., Kanmani, P., Satishkumar, R., Yuvaraj, N., Pattukumar, V., Agrawal, M., & Arul, V. (2012).** The combined effect of irradiation and antioxidant packaging on shelf life extension of goat fish (*Parupeneus indicus*): Microbial, chemical and EPR spectral assessment. *Journal of Food Processing and Preservation*, 36(2), 152-160.
- Padros, F. & Crespo, S. (1995).** Proliferative epitheliocystis associated with monogenean infection in juvenile seabream (*Sparus aurata*) in the North East of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 15, 42– 44.
- Padrós, F., Tort, L., & Crespo, S. (1996, October).** Winter disease in the gilthead seabream *Sparus aurata*: some evidences of a multifactorial etiology. In *International workshop on "sea bass and sea bream culture: problems and prospects"*. European Aquaculture Society (pp. 305-307).
- Padrós, F., Zarza, C., & Crespo, S. (2001).** Histopathology of cultured sea bream *Sparus aurata* infected with *sanguinicolid* trematodes. *Diseases of aquatic organisms*, 44(1), 47-52.
- Pan, Y. J., Souissi, A., Hwang, J. S., & Souissi, S. (2017).** Artificially cold-induced quiescent egg viability of the tropical copepod *Acartia bilobata* (Copepoda, Calanoida). *Aquaculture Research*, 48(4), 1974-1979. <https://doi.org/10.1111/are.12968>
- Pan, Y.J., Souissi, A., Hwang, J., Souissi, S., (2015).** SHORT COMMUNICATION Artificially cold-induced quiescent egg viability of the tropical copepod *Acartia bilobata* (Copepoda , Calanoida) 1–6. <https://doi.org/10.1111/are.12968>
- Pane, E.F., Richards, J.G., Wood, C.M., (2003).** Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. *Aquat. Toxicol.* 63, 65–82.
- Panigrahi, A., & Azad, I. S. (2007).** Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish physiology and biochemistry*, 33(4), 429-440.
- Paperna, I. (1977).** Epitheliocystis infection in wild and cultured sea bream (*Sparus aurata*, *Sparidae*) and grey mullets (*Liza ramada*, *Mugilidae*). *Aquaculture*, 10(2), 169-176.
- Paperna, I., Ilana Sabnai, H., & Colorni, A. (1982).** An outbreak of lymphocystis in *Sparus aurata* L. in the Gulf of Aqaba, Red Sea. *Journal of Fish Diseases*, 5(5), 433-437.
- Park, H. B., Perez, C. E., Perry, E. K., & Crawford, J. M. (2016).** Activating and attenuating the amicoumacin antibiotics. *Molecules*, 21(7), 824.<https://doi.org/10.3390/molecules21070824>

- Pavel, A. B., & Vasile, C. I. (2012).** PyElph-a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC bioinformatics*, 13(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>
- Pavlaki, M. D., Morgado, R. G., van Gestel, C. A., Calado, R., Soares, A. M., & Loureiro, S. (2017).** Influence of environmental conditions on the toxicokinetics of cadmium in the marine copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 145, 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.008>
- Pavlidis, M. A., & Mylonas, C. C. (Eds.). (2011).** *Sparidae: Biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*. John Wiley & Sons.
- Pavlidis, M., Kokokiris, L., Paspatis, M., Somarakis, S., Kentouri, M., and Divanach, P. (2006).** Gonadal development in hybrids of Mediterranean sparids: *Sparus aurata* (female) x *Pagrus pagrus* (male). *Aquaculture Research* 37: 302–305.
- Payne, M. F., & Rippingale, R. J. (2000).** Rearing West Australian seahorse, *Hippocampus subelongatus*, juveniles on copepod nauplii and enriched Artemia. *Aquaculture*, 188(3-4), 353-361.
- Pazos, F., Santos, Y., Nuñez, S., Toranzo, A.E., (1993).** Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in marine aquaculture of Spain. *FHS/AFS Newsl.* 21, 1 – 2.
- Pedersen, K., & Larsen, L. (1993).** rRNA gene restriction patterns of *Vibrio anguillarum* serogroup O 1. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16(2), 121-126.
- Pedersen, K., Grisez, L., Van Houdt, R., Tiainen, T., Ollevier, F., & Larsen, J. L. (1999).** Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional O-serogroups. *Current microbiology*, 38(3), 183-189.
- Pejler, B. (1995).** Relation to habitat in rotifers. In *Rotifera VII* (pp. 267-278). Springer, Dordrecht.P.
- Pepin, P., & Penney, R. W. (1997).** Patterns of prey size and taxonomic composition in larval fish: are there general size-dependent models?. *Journal of Fish Biology*, 51, 84-100.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., & Balcázar, J. L. (2014).** Probiotics in aquaculture: a current assessment. *Reviews in Aquaculture*, 6(3), 133-146.
- Petering, D. H. (2017).** Reactions of the Zn proteome with Cd²⁺ and other xenobiotics: Trafficking and toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 30, (1), 189-202.
- Phillips, D. J. H. et P. S. Rainbow (1994).** *Biomonitoring of trace aquatic contaminants*, Aldenn Press Ltd, Oxford.
- Planas, M., & Cunha, I. (1999).** Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture*, 177(1-4), 171-190.
- Polo, A., Yúfera, M. & Pascual, E. (1992).** Feeding and growth of gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae in relation to the size of the rotifer strain used as food. *Aquaculture*, 103, 45–54.

- Price, N. M., & Morel, F. M. M. (1990).** Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine diatom. *Nature*, 344(6267), 658.
- Prieto, M. L., O'Sullivan, L., Tan, S. P., McLoughlin, P., Hughes, H., Gutierrez, M., ... & Gardiner, G. E. (2014).** In vitro assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Marine drugs*, 12(5), 2422-2445.
- Raga, J. A. (2007).** *Cryptocaryon irritans* and *Enteromyxum leei*, two threats for the culture of *Diplodus puntazzo* in the Mediterranean. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*, 27(6), 242.
- Rainbow, P. S. (1998).** Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans. In *Metal metabolism in aquatic environments* (pp. 285-319). Springer, Boston, MA.
- Rainbow, P. S. (2007).** Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environment international*, 33(4), 576-582. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2006.05.007>
- Rainbow, P. S., & Luoma, S. N. (2011).** Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates—modelling zinc in crustaceans. *Aquatic toxicology*, 105(3-4), 455-465. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.001>
- Ramade, F. (1992).** Précis d'écotoxicologie. Paris.
- Raynard, R., Wahli, T., Vatsos, I., & Mortensen, S. (2007).** Review of disease interactions and pathogen exchange between farmed and wild finfish and shellfish in Europe. *VESO project*, 1655.
- Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., & Piyatiratitivorakul, S. (2008).** Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lateolabrax niloticus*. *Aquaculture Research*, 39(2), 134-143.
- Rigos, G., & Troisi, G. M. (2005).** Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2), 53-73.
- Rigos, G., Grigorakis, K., Nengas, I., et al. (1998).** Stress-related pathology seems a significant obstacle for the intensive farming of common dentex, *Dentex dentex* (Linnaeus). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 18, 15–18.
- Rivas, C., Bandín, I., Cepeda, C., & Dopazo, C. P. (1994).** Efficacy of chemical disinfectants against turbot aquareovirus. *Applied and environmental microbiology*, 60(6), 2168-2169.
- Roberts, M. H., Warinner, J. E., Tsai, C. F., Wright, D., & Cronin, L. E. (1982).** Comparison of estuarine species sensitivities to three toxicants. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 11(6), 681-692.
- Rødseth O.M. & Knapskog D. (1996).** Vaccination strategies for marine cultures species. Abstracts, International Symposium on *Fish Vaccinology*, Oslo, Norway, 52.
- Roesijadi, G. (1994).** Metal regulation in aquatic animals: Mechanism of uptake, accumulation and release. *Molecular mechanisms in aquatic toxicology*, 387-420.

- Rollin, C., & Quiot, F. (2006).** Eléments traces métalliques-guide méthodologique : recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. *Rapp. d'étude INERIS*.
- Romalde, J. L., Magarinos, B., Lores, F., Osorio, C. R., & Toranzo, A. E. (1999).** Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis. *Journal of microbiological methods*, 38(1-2), 147-154.
- Rønnestad, I., Helland, S., & Lie, Ø. (1998).** Feeding Artemia to larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) results in lower larval vitamin A content compared with feeding copepods. *Aquaculture*, 165(1-2), 159-164.
- Roussel, H., Chauvet, E., & Bonzom, J. M. (2008).** Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(3), 637-644.
- Sakata, T., Matsuura, M. and Shimokawa, Y. (1989)** Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55 , 135–141.
- Sakiti, N. (1996).** Presence en Méditerranée occidentale d'une Mixosporidie histozoïque pathogène dans les élevages du daurade, *Sparus aurata*. *Ann. Sci. Nat. Zool., Paris*, 17, 123-127.
- Sala-Rabanal, M., Sánchez, J., Ibarz, A., Fernández-Borràs, J., Blasco, J., & Gallardo, M. A. (2003).** Effects of low temperatures and fasting on hematology and plasma composition of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish physiology and biochemistry*, 29(2), 105-115.
- Salvesen, I., & Vadstein, O. (1995).** Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquaculture International*, 3(3), 155-171.
- Santos, Y., Pazos, F., Barja, J.L., 1999.** *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. In: Olivier, G. (Ed.), ICES Identification Leaflets for Diseases and Parasites of Fish and Shellfish. No. 55. *International Council for the Exploration of the Sea*. Copenhagen, Denmark, pp. 1 –6.
- Sargent, J. R., McEvoy, L. A., & Bell, J. G. (1997).** Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155(1-4), 117-
- Schaperclaus, W. (1992).** Diseases caused by pathogens. In: Fish Diseases (eds. W. Schaperclaus, H. Kulow, & K. Schreck-enbach), pp. 311–319. AA Balkema Press, Rotterdam.
- Schipp, G. (2006).** The use of calanoid copepods in semi-intensive, tropical marine fish larviculture. *Advances en Nutrición Acuícola VIII. VIII Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, 15-17.
- Schwarzenbach, R. P., Escher, B. I., Fenner, K., Hofstetter, T. B., Johnson, C. A., Von Gunten, U., & Wehrli, B. (2006).** The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science*, 313(5790), 1072-1077.

- Segers, H. (2007).** Global diversity of rotifers (Rotifera) in freshwater. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 49-59). Springer, Dordrecht.
- Simkiss, K., Taylor, M.G., (1995).** Transport of metals across membranes. *Met. Speciat. Bioavailab. Aquat. Syst.* 3, 1–44
- Sitjà-Bobadilla, A. & Alvarez-Pellitero, P. (2001).** *Leptotheca sparidarum* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a parasite from cultured common dentex (*Dentex dentex* L.) and gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) (Teleostei: Sparidae). *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48(6), 627–639.
- Skovgaard, A., Castro-Mejia, J. L., Hansen, L. H., & Nielsen, D. S. (2015).** Host-specific and pH-dependent microbiomes of copepods in an extensive rearing system. *PloS one*, 10(7), e0132516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132516>
- Slettan, A. (1995).** Isolation, characterisation and genetic analysis of simple sequence polymorphism in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Thesis for the degree of Doctor scientiarum. Norwegian College of Veterinary Medicine.
- Smith, J. L., Orugunty, R., & Hillman, J. D. (2007).** Lantibiotic production by *Streptococcus mutans*: their uses in replacement therapy for the prevention of dental caries and as antibiotics for the treatment of various infectious diseases. *Research and applications in bacteriocins*, 95-115.
- Snieszko, S.F. (1964)** . Remarks on some facts of epizootiology of bacterial fish diseases. *Developments in Industrial Microbiology* 5 , 97–100.
- Souissi, A., Souissi, S., & Hansen, B. W. (2016).** Physiological improvement in the copepod *Eurytemora affinis* through thermal and multi-generational selection. *Aquaculture research*, 47(7), 2227-2242. <https://doi.org/10.1111/are.12675>
- Sreenivasulu, P., Suman Joshi, D. S. D., Narendra, K., Venkata Rao, G., & Krishna Satya, A. (2016).** *Bacillus pumilus* as a potential probiotic for shrimp culture. *Int. J. Fish Aquat. Stud*, 4, 107-110.
- Starzecka, A., & Bednarz, T. (1993).** Comparison of development and metabolic activity of algae and bacteria in soils under the influence of short-and long-term contamination with metallurgic industrial dusts. *Algological Studies/Archiv für Hydrobiologie, Supplement Volumes*, 71-88.
- Stelzer C-P, Riss S, Stadler P, (2011).** Genome size evolution at the speciation level: the cryptic species complex *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *BMC Evolutionary Biology*, 11: 90.
- Støttrup J.G. & McEvoy L.A. (2003).** *Live Feeds in Marine Aquaculture* (1st edn). Blackwell Science, Oxford, UK & Malden, MA, USA.
- Støttrup, J. G. (2000).** The elusive copepods: their production and suitability in marine aquaculture. *Aquaculture Research*, 31(8-9), 703-711.

- Sudha, K., Thampuran, N., & Surendran, P. K. (2002).** Prevalence of *Vibrio* species on fish from pelagic and demersal habitats. *Fishery Technology*, 39(2).
- Sugiyama, A. & Kusuda, R. (1981a).** Studies on the characters of *Staphylococcus epidermidis* isolated from diseased fishes. II. Serological properties of the isolates. *Fish Pathology*, 16, 25–33.
- Sukui, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., et al. (2001)** Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 1639–1652.
- Sullivan, B. K., Buskey, E., Miller, D. C., & Ritacco, P. J. (1983).** Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). *Marine Biology*, 77(3), 299–306.
- Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., & Yamamoto, S. (2001).** Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine Cytophaga-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(5), 1639–1652.
- Tabinda, A. B., Hussain, M., Ahmed, I., & Yasar, A. (2010).** Accumulation of toxic and essential trace metals in fish and prawns from Ketu Bunder Thatta District, Sindh. *Pakistan Journal of Zoology*, 42(5).
- Taylor, D., (1981).** A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life, 12, Nickel. Imperial Chemical Industries Limited Brixham, 12, 745–756.
- Taylor, N. G., Verner-Jeffreys, D. W., & Baker-Austin, C. (2011).** Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance?. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(6), 278–284.
- Tercier Waeber, M.-L., Stoll, S., Slavey kova, V., (2012).** Trace metal behavior in surface waters: emphasis on dynamic speciation, sorption processes and bioavailability. *Arch. Sci.* 65, 119–142.
- Thevenot, D., Lestel, L., Tusseau-Vuillemin, M. H., Gonzales, J. L., & Meybeck, M. (2009).** Les métaux dans le bassin de la Seine-Comprendre d'où proviennent et comment circulent les métaux dans un bassin versant fortement exposé aux pressions humaines. [https://doi.org/10.1016/S1240-1307\(97\)86214-0](https://doi.org/10.1016/S1240-1307(97)86214-0)
- Tlili, S., Ovaert, J., Souissi, A., Ouddane, B., & Souissi, S. (2016).** Acute toxicity, uptake and accumulation kinetics of nickel in an invasive copepod species: *Pseudodiaptomus marinus*. *Chemosphere*, 144, 1729–1737. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.10.057>

- Toranzo, A. E., & Barja, J. L. (1990).** A review of the taxonomy and seroepizootiology of *Vibrio anguillarum*, with special reference to aquaculture in the Northwest of Spain. *Diseases of aquatic organisms*, 9(1), 73-82.
- Toranzo, A. E., & Barja, J. L. (1993).** Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 5-36.
- Toranzo, A. E., Magarinos, B., & Romalde, J. L. (2005).** A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 246(1-4), 37-61.
- Torgersen, Y., & Håstein, T. (1995).** Disinfection in aquaculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(2), 419-434.
- Torgersen, Y., & Håstein, T. (1995).** Disinfection in aquaculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 14(2), 419-434.
- Tort, L., Rotllant, J., Liarte, C., Acerete, L., Hernandez, A., Ceulemans, S., ... & Padros, F. (2004).** Effects of temperature decrease on feeding rates, immune indicators and histopathological changes of gilthead sea bream *Sparus aurata* fed with an experimental diet. *Aquaculture*, 229(1-4), 55-65.
- Toudal, K., Riisgard, H., (1987).** Acute and sublethal effects of cadmium on ingestion, egg production and life-cycle development in the copepod *Acartia tonsa* . *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37, 141–146. <https://doi.org/10.3354/meps037141>
- Trüper, H. G., & De'clari, L. (1997).** Taxonomic note: necessary correction of specific epithets formed as substantives (nouns)“in apposition”. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 47(3), 908-909.
- Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2005).** The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetables. *Food chemistry*, 93(4), 713-718.
- Urien, N. (2015).** Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre *Gammarus*: influence des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes (Doctoral dissertation, Université Claude Bernard-Lyon I).
- Vagianou, S., Athanassopoulou, F., Ragias, V., Di Cave, D., Leontides, L., & Golomazou, E. (2004).** Prevalence and pathology of ectoparasites of Mediterranean fish, reared under three different environmental and aquaculture conditions in Greece (In Greek and English). *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 55(3), 203-216.
- Valko, M., Jomova, K., Rhodes, C. J., Kuča, K., & Musílek, K. (2016).** Redox-and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. *Archives of toxicology*, 90(1), 1-37.
- Varvarigos, P. (2001).** Gram positive coccobacteria (*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*) causing systemic disease in intensively farmed fish, Brief review. December. Varvarigose. Athens, Greece.http://www.vetcare.gr/Gram_positive_cocci.htm Athens, Greece.

- Vatsos, I. (2007b).** *Tenacibaculum maritimum (Flexibacter maritimus)*. In: *Review of Disease Interactions and Pathogen Exchange Between Farmed and Wild Finfish and Shellfish in Europe (DIPNET)* (eds. R. Raynard, T. Wahli, I. Vatsos, & S. Mortensen), pp. 260–262.
- Veith G.D., Defoe, D.L., Bergstedt, B.V., (1979).** Measuring and estimating the bioconcentration factor of chemicals in fish. *Journal Fisheries Research Board of Canada*, 36: 1040-1048
- Vera, P. (1991).** First isolation of *Vibrio damsela* from sea bream (*Sparus aurata*). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 11, 112-3.
- Verboost, P.M., Rooij, J.V., Flik, G., Lock, R. a. C., Bonga, S.E.W., (1989).** The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.* 145, 185–197.
- Verschoor, A. J., Hendriks, A. J., Vink, J. P., de Snoo, G. R., & Vijver, M. G. (2012).** Multimetal accumulation in crustaceans in surface water related to body size and water chemistry. *Environmental toxicology and chemistry*, 31(10), 2269-2280.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000).** Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4), 655-671.
- Viarengo, A. (1989).** Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Rev. Aquat. Sci*, 1(2), 295-317.
- Vijayavel, K., Gopalakrishnan, S., Thiagarajan, R., & Thilagam, H. (2009).** Immunotoxic effects of nickel in the mud crab *Scylla serrata*. *Fish & shellfish immunology*, 26(1), 133-139.
- Wakabayashi, H., Hikida, M., & Masumura, K. (1986).** *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(3), 396-398
- Walker KF, (1981).** A synopsis of ecological information on the saline lake rotifer *Brachionus plicatilis* Müller 1786. *Hydrobiologia*, 81: 159-167.
- Wallace, R. L., & Snell, T. W. (1991).** Ecology and classification of North American freshwater invertebrates. *Rotifera*, 187-248.
- Wang, W. S., Chang, Y. C., Shieh, M. T., & Lin, C. C. (1996).** Staphylococcus epidermidis and cestode infection of cultured grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) in Taiwan. *Reports on Fish Disease Research*, 17, 57-63.
- Wang, W. X., & Rainbow, P. S. (2007).** Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry*, 3(6), 395-399.
- Wang, M.H & Wang, G.Z.(2010).** Oxidative damage effects in the copepod *Tigriopus japonicus* Mori experimentally exposed to nickel. *Ecotoxicology* 19, 273e284.
- Wang, X., Liu, J., Tan, Q., Ren, J., Liang, D., Fan, W., 2018.** Development of multi-metal interaction model for *Daphnia magna*: Significance of metallothionein in cellular

- p>redistribution. Ecotoxicol. Environ. Saf. 151, 42–48.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.040>
- Watanabe T., Kitajima C., Fujita S. (1983).** Nutritional values of live organisms used in Japan for mass propagation of fish: a review. *Aquaculture*, 34, 115–143.
- Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2015).** Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in biotechnology*, 33(1), 15–26.
- Winkler, G., Souissi, S., Poux, C., & Castric, V. (2011).** Genetic heterogeneity among *Eurytemora affinis* populations in Western Europe. *Marine Biology*, 158(8), 1841–1856.<https://doi.org/10.1007/s00227-011-1696-5>.
- Woo, N.Y.S., Ling, J.L.M. and Lo, K.M. (1995)** Pathogenic *Vibrio* spp. in the sea bream, *Sparus sarba*. *Journal of Sun Yetsen University Supplement 3* , 192–193.
- Woo, N.Y.S., Ling, J.L.M. and Lo, K.M. (1995).** Pathogenic *Vibrio* spp. in the sea bream, *Sparus sarba*. *Journal of Sun Yetsen University Supplement 3* , 192–193.
- Woo, S., Yum, S., Park, H.S., Lee, T.K., Ryu, J.C. (2009).** Effects of heavy metals on antioxidant and stress-responsive gene expression in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 289–299.
- Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014).** Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome biology*, 15(3), R46.
- Wood, J. M., & Wang, H. K. (1983).** Microbial resistance to heavy metals. *Environmental science & technology*, 17(12), 582A–590A
- Wood, J.M., Wang, H., 1983.** Microbial resistance to heavy metals.
- Yasuda, K., & Taga, N. (1980).** A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer*, 18(53), 62.
- Yasuds, K. et Taga, N.A. (1980).** Mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer*, 18: 53–62.
- Yasuds, K. et Taga, N.A. (1980).** Mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer*, 18: 53–62.
- Yasunaga, N., Hatai, K. & Tsukahara, J. (1983).** *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured red seabream. *Fish Pathology*, 18, 107–110.
- Ye, J., Foo, R. W. T., Lo, K. M., Zeng, J. S., Ling, J. M. L., Woo, N. Y. S., & Xu, H. S. (1997).** Studies on the pathogens of vibriosis in cultured sea bream (*Sparus sarba*) in Hong Kong. *Journal of Marine Science*.
- Zohar, Y., Abraham, M., and Gordin, H. (1978).** The gonadal cycle of the captivity-reared hermaphroditic teleost *Sparus aurata* (L.) during the first two years of life. *Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique* 18: 877–882.

- Zyadah, M. A., & Abdel-Baky, T. E. (2000).** Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(5), 740-747.

Annexes

Annexe 1

▪ Milieux Conway

Composants	Quantité (mg)
NaNO ₃	100
NaH ₂ PO ₄	20
Na ₂ EDTA	45
H ₃ BO ₃	33,6
MnCl ₂ 4H ₂ O	0,36
FeCl ₃ H ₂ O	1,3
ZnCl ₂	0,021
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,02
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,02
6 (NH ₄) Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O,	0,09
chlorhydrate de thiamine (vitamine B1)	0,2
cyanocobalamine (vitamine B12)	0,01
Eau	Qsp 1000mL

▪ Milieu tryptone sel

Composants	Quantité (mg)
Tryptone	1,0
Chlorure de sodium	8,5
Eau distillée	Qsp 1000mL

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,0 ± 0,2. Stérisation à 121°C.

▪ Milieu Luria Bertani (LB)

Composants	Quantité (mg)
Tryptone	10
extrait de levure	5
NaCl	10
Agar	170
Eau distillée	Qsp 1000mL

pH 7,2. Autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

■ Milieu Landy

Composants	Quantité
glucose	20g
acide glutamique	5g
MgSO ₄	0,5mg
extraits de levure	1g
K ₂ HPO ₄	1g
KCl	0,5
CuSO ₄	1,6mg
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1,2mg
MnSO ₄	0,4mg
Eau distillée	Qsp 1000mL

Préparation

Le milieu est tamponné par de l'acide 3-(N-morpholino) –propane sulfonique (MOPS) 0,1 M et le pH est ajusté avec une solution de KOH 3 M stérile.

Les solutions sont ensuite utilisées pour reconstituer le milieu final. Les solutions stock sont les suivantes :

- Une solution de Glucose 20X(400 g L⁻¹) stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes et conservée à 4°C.
 - Une solution d'acide glutamique 20X(100 g L⁻¹) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
 - La solution A contenant de l'extrait de levure 20X (20 g.L⁻¹) et du MgSO₄ 20X (10 g.L⁻¹) est stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.
 - La solution B contenant du K₂HPO₄ 20X (20 g.L⁻¹) et du KCl 20X (10 g.L⁻¹) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
 - La solution C contenant du CuSO₄ 20X (32 mg.L⁻¹) et du Fe₂(SO₄)₃ 20X (24 mg.L⁻¹) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
 - Une solution de l'acide 3- (N-morpholino)–propane sulfonique (MOPS) 20X (420 g.L⁻¹) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
- Souche bactérienne et milieux de culture Une solution de KOH 3 M stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes pour ajuster le pH du milieu à 7. Ainsi pour préparer un litre de milieu il faut mélanger de manière stérile 50 mL de chaque solution concentrée et ajouter 700 mL d'eau distillée stérile.

Annexe 2

Publications acceptées et soumises



Isolation and Characterization of Bacteria Colonizing *Acartia tonsa* Copepod Eggs and Displaying Antagonist Effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus* and Other Pathogenic Strains

Mahammed Zidour¹, Mickaël Chevalier¹, Yanath Belguesmia¹, Benoit Cudennec¹, Thierry Grard¹, Djamel Drider¹, Sami Souissi² and Christophe Flahaut^{1*}

¹ Université d'Artois, INRA, ISA, Université Lille 1, Université du Littoral Côte d'Opale, EA 7394 – ICV – Institut Charles Violette, Lille, France; ² Université Lille 1, CNRS, Université du Littoral Côte d'Opale, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR 8187 LOG, Wimereux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Telephore Simé-Ngando,
Centre National de la Recherche
Scientifique (CNRS), France

Reviewed by:

Douwe Maat,
Royal Netherlands Institute for Sea
Research (NIOO), Netherlands
Ryan Paarl,
University of Copenhagen, Denmark

*Correspondence:

Christophe Flahaut
christophe.flahaut@univ-artois.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Aquatic Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 29 May 2017

Accepted: 20 September 2017

Published: 06 October 2017

Citation:

Zidour M, Chevalier M,
Belguesmia Y, Cudennec B, Grard T,
Drider D, Souissi S and Flahaut C
(2017) Isolation and Characterization
of Bacteria Colonizing *Acartia tonsa*
Copepod Eggs and Displaying
Antagonist Effects against *Vibrio*
anguillarum, *Vibrio alginolyticus*
and Other Pathogenic Strains.
Front. Microbiol. 8:1919.
doi: 10.3389/fmicb.2017.01919

Copepods represent a major source of food for many aquatic species of commercial interest for aquaculture such as mysis shrimp and early stages of fishes. For the purpose of this study, the culturable mesophilic bacterial flora colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs was isolated and identified. A total of 175 isolates were characterized based on their morphological and biochemical traits. The majority of these isolates (70%) were Gram-negative bacteria. Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was used for rapid identification of bacterial isolates. Here, 58% of isolates were successfully identified at the genus level and among them, 54% were identified at the species level. These isolates belong to 12 different genera and 29 species. Five strains, identified as *Bacillus pumilus*, named 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS, and 40A COPS, showed strong antagonisms against several potential fish pathogens including *Vibrio alginolyticus*, *V. anguillarum*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*. Furthermore, using a differential approach, we show that the antimicrobial activity of the 35R COPS strain is linked primarily to the production of antimicrobial compounds of the amicoumacin family, as demonstrated by the specific UV-absorbance and the MS/MS fragmentation patterns of these compounds.

Keywords: *Acartia tonsa*, copepod eggs, MALDI-TOF-MS, *Bacillus pumilus*, antagonism, antibacterial compounds, amicoumacin

Abbreviations: ACN, acetonitrile; BLAST, basic local alignment search tool; BPI, base peak intensity; BTB, bacterial test standard; CFS, cell-free supernatants; CID, collision-induced dissociation; COPS, strain acronym for copepods; ESI, electrospray ionization; GNBL, Gram-negative bacteria; GPR, Gram-positive bacteria; HCCA, α -cyano-4-hydroxycinnamic acid; LOG, Laboratory Oceanography and Geosciences; MALDI-TOF-MS, matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry; MSP, main spectral projection; NCBI, National Center for Biotechnology Information; PCR, polymerase chain reaction; SSB, sterile saline buffer; TFA, trifluoroacetic acid.

INTRODUCTION

In aquatic ecosystems, basal trophic levels are constituted by microscopic organisms called plankton which consist of a plant part, the phytoplankton, represented by unicellular algae and an animal part, the zooplankton. This latter is the main aquatic compartment in terms of biomass and diversity (Mauchline, 1998) especially for the crustaceans subphylum where the copepod subclass represents the majority of these organisms (Humes, 1994). Copepods could be found in a variety of habitats and are adapted to specific types such as fresh or deep water. They have different feeding regimes and can live freely in the water column or in the sediment (Mauchline, 1998) but can also be parasites, such as sea lice, of aquatic organisms (González et al., 2016). Copepods play an important role in the marine ecosystem given its middle trophic position between primary producers (phytoplankton), microbial food webs and higher trophic levels (Roddie et al., 1984). Copepods are also the focus of many ecological studies because of their key position in marine food webs, being important grazers as well as a food source for higher trophic levels (Souissi et al., 2016).

The order of calanoid copepods is largely abundant in marine and brackish environments and therefore plays a major role in aquatic food webs but also in the diet of many commercial fish species which are dependent on calanoid copepods in either their larval or adult forms. The calanoid copepod *Acartia tonsa* is recognized as an emerging biological model, a source of live prey for aquaculture purposes (Drillet et al., 2006) and is widely used for evaluation of marine contaminants (Stancheva et al., 2015). They have a good biochemical composition in terms of essential fatty acids. These characteristics make the microflora of these organisms of prime interest to evaluate infection risks and transmission by food intake.

Aquaculture is beset by infectious diseases which are a major impediment to its development and are one of the most significant causes of economic losses. These infectious diseases are caused by different bacterial and viral pathogens. *Vibrio* species especially *V. harveyi*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* are well characterized as major causes of bacterial infections in fish farms (Carbone and Faggio, 2016). Interestingly, several *Vibrio* species, including pathogenic ones, are also commonly found in a variety of copepods (Colwell and Huq, 1998; Gugliandolo et al., 2008) including *A. tonsa* which hosts various other bacterial genera like *Pseudomonas* and *Flavobacterium* (Roddie et al., 1984). Nonetheless, the microflora of the copepods is poorly documented and the few studies focused on the adult state (Skovgaard et al., 2015). Calanoid copepods from the genus *Acartia* are well studied because they are promising live feeds in marine larviculture (Hansen et al., 2016). Recently, the use of quiescent eggs of copepods and mainly *A. tonsa* is suggested as promising technology to be used in hatcheries due to their immediate response to stimulation signals of induction treatments and rapid hatching after the quiescent phase (Drillet et al., 2006; Hejgaard et al., 2008; Abate et al., 2015). In fact, we did

not find in the literature any study focusing on the pathway of bacteria colonization in copepod eggs. But, some recent studies focusing on late developmental stages of copepods (mainly adults) showed that the colonization pathway could be complicated (Rawlings et al., 2007; Almada and Tarrant, 2016). Moreover, some experimental studies confirmed that some bacterial strains (such as *Escherichia coli*) cannot colonize copepods (Dumontet et al., 1996). However, the pathway of bacterial colonization of copepod eggs was not the central element of our study. In fact, we targeted the eggs of the calanoid species *A. tonsa* as the high potential of using these eggs mostly storage in cold (2–4°C) as quiescent eggs, in aquaculture use is intensively studied. Especially the effect of stocking density on production of *A. tonsa* eggs was studied and the effect of cold storage duration on the hatching success of eggs was reviewed in (Hansen et al., 2016). Other studies focused on the effect of external conditions (elevated temperature, wavelength, light intensity etc.) on the hatching success of freshly produced or cold-stored eggs of *A. tonsa* (Hagemann et al., 2016; Hansen et al., 2016; Franco et al., 2017). In order to achieve the great potential of *A. tonsa* eggs in aquaculture, their microbiome should be studied for two main reasons: (i) in order to screen the presence of pathogens that may introduce any risk in hatchery if no disinfection was used and (ii) to look if some associated strains have positive effect (like probiotic potential) and consequently they have to be maintained with eggs. In fact, some studies already mentioned that encapsulation of probiotic bacteria of genus *Bacillus* through copepods is very efficient in improving survival of fish larvae such as grouper (Sun et al., 2013). However, to our knowledge the isolation of bacteria strains from copepod eggs (or copepods in general) with high probiotic potential has never been done in the past.

As in other areas of animal farming, antibiotics have routinely been administered but there have negative impacts on the environment and human health. This includes the emergence of antibiotic-resistant bacterial strains, the accumulation of residues in edible tissues and the depression of immune systems (Carbone and Faggio, 2016). For these reasons, the use of antibiotic treatment in aquaculture was banished in the European Union and is under stringent regulations in the United States of America and in other countries (Carbone and Faggio, 2016). This strict regulation led to the investigation and the development of alternative strategies to disease control. Among these alternative control regimes, vaccination and the use of anti-microbial agents were initially proposed (Austin and Austin, 1993). Probiotic bacteria also appear as an interesting strategy as they can be a natural protective and/or curative treatment, based on their beneficial properties. Probiotics used in aquaculture belong to a number of phylogenetic lineages, but mainly derive from two bacterial divisions: the proteobacteria (especially gammaproteobacteria) and the Firmicutes, among which numerous members of the genus *Bacillus* have been described (Hong et al., 2005) such as *Bacillus subtilis* (Moriarty, 1998; Balcazar and Rojas-Luna, 2007; Aly et al., 2008) and *B. pumilus* (Duc et al., 2004). Although probiotic propensity is not solely related to molecules

produced by a strain, *B. pumilus* species produce structurally diverse classes of secondary metabolites, such as fengycins, surfactants, glycocholic acid, amicoumacins A and B and lipopeptides A-C and these structurally polyvalent compounds have effective antimicrobial activity against various pathogens (Lebbadi et al., 1994; Berrue et al., 2009; Xu et al., 2014; Mora et al., 2015).

The aim of the present study was to isolate and characterize the culturable mesophilic bacterial flora colonizing *A. tonsa* eggs issued from the copepod species collection of the LOG-Marine Station of Wimereux located on northern coast of France. To fulfill this goal, bacterial isolation was performed using nutritive agar medium at 25°C for 48 to 72 h. Gram staining and catalase test were performed prior to further characterization of the isolates. MALDI-TOF-MS was used as main means of bacterial identification, along with some 16S rDNA molecular identification. The antagonism of strains was tested against selected fish pathogens and molecules responsible for antagonisms were characterized by liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

MATERIALS AND METHODS

Conditions of Copepod Breeding and Copepod Egg Collection

The *A. tonsa* strain used in the present study was obtained from Roskilde University (strain code DFH-ATT) and was raised at the marine station of Wimereux for several generations. Copepods were routinely cultivated in 20-L polycarbonate carboys and then upscaled up to 300-L volume by using transparent tanks as described by (Tlili et al., 2016) excepted that copepods were fed every 2 days with an excess of the alga *Rhodomonas* sp. *A. tonsa* eggs were collected by sieving the culture water using the same procedure as in Pan et al. (2015). Then eggs were rinsed using sterile sea water and stored at 4°C in dark sterile bottles of 15 mL.

Growth Conditions and *Bacillus* Isolation

Copepod eggs were washed three times with sterile distilled water and then mixed for 3 min using a homogenizer Ultra-turrax Ika-T25D model (Imlab, Lille, France) in 9 mL of SSB (1 g tryptone, 8.5 g sodium chloride dissolved in 1 L of distilled water), serially diluted in 0.9% (v/v) SSB from 10^{-1} to 10^{-6} , plated on nutrient agar in Petri dishes (Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) using the spread plate method and incubated at 25°C for 48 h. Morphological characteristics of isolates were determined using visual assessment of bacterial colonies on nutrient agar plates along with microscopic examination according to the standard procedures described in Bergey's manual of systematic bacteriology. Gram staining and the catalase test (catalase production) were carried out. Morphologically different colonies were selected from the agar plates, streaked on fresh nutrient agar plates and incubated at 25°C for 48 h. Finally, bacterial isolates were inoculated into nutrient broth (Merck, Germany) and stored in 30% glycerol at -80°C for further analysis.

Bacteria Identification by MALDI-TOF-MS

Mass Spectrometry (MS) Profile Acquisition from Colony Forming Units

Single bacterial colonies were picked up three times with pipette tips and separately smeared as a thin layer onto a ground steel matrix-assisted-laser-desorption/ionization (MALDI) target according to the manufacturer's instructions (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The on-target deposits were overlaid with 1 µL of 70% formic acid solution, dried at room temperature, overlaid again with 1 µL of matrix solution [10 mg/mL of HCCA dissolved in ACN/water/TFA (50/47.5/2.5; v/v/v)] and dried again (Nacef et al., 2016).

Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry analyses were performed on an Autoflex SpeedTM (Bruker Daltonics) running Flexcontrol 3.4 software. The MALDI-TOF mass spectrometer calibration was performed using the BTS as per Bruker's recommendations. This calibration kit contains a typical protein extract of *E. coli* DH5alpha spiked with two additional pure proteins (RNase A and myoglobin) to cover an overall mass range from 4 to 17 kDa. MALDI-MS profiles were acquired in positive linear mode across the *m/z* range of 2,000–20,000 Da using the manufacturer's automatic method MBT_FC.par. Each MALDI-MS profile was the sum of the ions obtained from 480 laser shots performed randomly on different regions of the same spot.

Bacteria Identification Using Biotyper

Mass spectra were processed using Biotyper software (version 3.0; Bruker Daltonics) running with the Biotyper database version DB-5989, containing 5989 reference MALDI-MS profiles (5298 of bacteria, 626 of yeasts and 65 of filamentous fungi) called MSP. The experimental MALDI-MS profiles obtained from bacteria isolates were matched on the reference MALDI-MS profiles and the matches were restituted by Biotyper along with a Log(score) and an associated color code (green, yellow, and red). Briefly, a Biotyper Log(score) exceeding 2.3 (green color) indicates a highly probable identification at the species level. A Log(score) between 2.0 and 2.3 corresponds to highly probable identification at the genus level (green color) and probable identification at the species level. A Log(score) between 1.7 and 2.0 (yellow color) implies only probable genus identification; while score value lower than 1.7 (red color) means no significant similarity between the unknown profile and any of those of the database.

Molecular Biology Experiments

Genomic DNA Extraction

Pure genomic DNA was extracted from each *Bacillus* strain identified by MALDI-TOF-MS with the Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) and then quantified with a Nanodrop Lite (Biowave II, Biochrom WPA, Cambridge, United Kingdom).

Polymerase Chain Reaction (PCR) -Based Amplification of Bacterial 16S Ribosomal DNA (16S rDNA)

The 16S rDNA of the five strains (18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS, and 40A COPS) were amplified with 16S forward 5'-AGAGTTTGTATCMTGGCTCAG-3' and 16S reverse 5'-GGMTACCTTGTACGAYTTC-3' primers (Drago et al., 2011) using the following PCR program: 94°C/5 min, 29 cycles at 94°C/1 min, 55°C/1 min and 72°C/1 min and finally 72°C/5 min (Al Atya et al., 2015). Amplified products were purified using a PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and sequenced by Eurofins Genomics (Munich, Germany). Nucleotide sequences were subjected to homology search using the nucleotide BLAST software of the NCBI. Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences by maximum likelihood analysis method was performed using MEGA 7 according to Hall (Hall, 2013).

Antagonism Assay

Antibacterial activity was assessed against the GNB and GPB listed in Table 1, using two methods: the spot inoculation on agar test and the well-known agar diffusion test slightly modified by Al Atya et al. (2015). The pathogenic bacteria used in this study were handled in a laboratory of microbiological safety level L2 to avoid contamination and to comply with the hygiene and safety of the laboratory according to the safe conditions of use of pathogens.

Assessment of Antimicrobial Activity Based on Spot Inoculation on Agar

The antimicrobial activities of *B. pumilus* strains named 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS, and 40A COPS and 9 strains of *B. subtilis* named 181 COPS, 21 COPS, 23 COPS, 24 COPS, 30 COPS, 351 COPS, 401 COPS, 41 COPS, 58 COPS isolated from copepod eggs were determined in triplicates by spot inoculation on agar using 5 µL of *B. pumilus* and *B. subtilis* cultures (collected after 48 h of incubation at 25°C) on Mueller Hinton agar plates pre-inoculated with 150 µL of pathogenic strains listed in Table 1. Thereafter, plates were incubated at 25°C for 48 h and the antibacterial activity was determined by measuring the inhibition zone diameters around the spot of *B. pumilus* and *B. subtilis* cultures.

Assessment of the Antimicrobial Activity Based on the Agar Diffusion Test

The CFS used for antibacterial activity measurement were obtained by centrifugation (10,000 × g, 10 min, 4°C) from fresh cultures of *B. pumilus* and *B. subtilis* grown at 25°C for 24–48 h in nutrient broth. Wells were made within solid Mueller Hinton agar plates, pre-inoculated with 150 µL of pathogenic strains (Table 1) and filled with 50 µL of each *B. pumilus* and *B. subtilis* CFS. Agar plates were left at room temperature, in sterile conditions, for 1 h before incubation for 24–48 h at 25°C. Each assay was performed in triplicate. Following incubation, antibacterial activity was assessed by measuring the inhibition zones around the well containing the CFS. The diameter of each zone inhibition was measured in millimeters.

TABLE 1 | Antimicrobial activities of cell free supernatant (CFS) from *Bacillus pumilus* by well agar diffusion method.

Bacteria	Target bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>					<i>Bacillus subtilis</i>								
		18 COPS	38 COPS	35R COPS	40A COPS	35A COPS	181 COPS	21 COPS	23 COPS	24 COPS	30 COPS	351 COPS	401 COPS	411 COPS	58 COPS
Gram-negative	<i>Vibrio anguillarum</i> (1 COPS)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Vibrio anguillarum</i> CIP 103336	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Vibrio anguillarum</i> (17 BME)	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Kocuria photophila</i> CIP 5546	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Listeria innocua</i> ATCC 51742	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> 157	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> 158	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> 161	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Listeria monocytogenes</i> 162	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33862	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) S1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) S2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Gram-positive	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(+), no inhibition; ++, 4–5 mm inhibition zone; (+++), 6–8 mm inhibition zone; (+++), 10–15 mm inhibition zone.

Characterization of Molecules Responsible for the Antibacterial Activity

The CFS samples from *B. pumilus* and *B. subtilis* cultures were separated by reversed-phase chromatography using an ACQUITY-bio-compatible HPLC-system (Waters, Manchester, United Kingdom) equipped with a Phenomenex C18 Kenetex core-shell column (ID 3.0 mm × 150 mm, 2.6 μm, 100 Å). The C18-retained molecule elution was carried out using a linear gradient of ACN containing 0.1% FA (25–95% ACN over 55 min) and a flow rate of 500 μL/min. The HPLC eluent was directly electrosprayed from the column end at an applied voltage of 3 kV, using a desolvation gas (N₂) flow of 500 L/h, a nebulizer gas flow of 6.5 bar and desolvation temperatures of 150 and 300°C, respectively. The chromatography system was coupled to a SYNAPT-G2-Si mass spectrometer (Waters) operating in data-dependent mode. The full MS survey scans were acquired at a 20,000 (FWHM) resolving power, over the mass range of 300–3,000 m/z. Precursors observed with an intensity over 1,000 counts were selected for ion trap CID fragmentation with an isolation window of 3 amu and subjected to a collision energy ramping from 10 to 20 V for low mass and 40 to 120 V for high mass. The MS/MS spectra were recorded on the 50 to 3000 m/z range. A maximum injection time of 100 ms was used for CID MS² spectra that were acquired over the same mass range. The method was set to analyze the five most intense ions from the survey scan. Peaks were analyzed using Mass Lynx software (ver.4.1; Waters). Structures were drawn using ChemDraw Ultra (Version 12.0.2.1076, Cambridge, MA, United States).

RESULTS

Isolates and High-Throughput Identification of Bacteria

Bacterial Isolates

Morphological characterization of the *A. tonsa* egg isolates obtained on nutrient agar revealed that, out of a total of 175 strains, 69% are bacilli forms, 19% cocci and 11% coccobacilli. Concomitantly, 30% of isolates are Gram-positive strains and 70% are Gram-negative strains while 27% of the strains appeared to be catalase positive and 73% catalase negative.

High-Throughput Identification by MALDI-TOF

Out of the 175 isolates obtained from the copepod eggs, 73 isolates (42%) could not be identified by MALDI-TOF-MS, probably due to the absence of reference mass spectra related to these species in the Bruker database. In contrast, 102 (58%) isolates were identified, of which 54% with certainty at the genus and species levels and 46% only at the genus level. The results of MALDI-TOF-MS-based identifications showed a great diversity of bacterial strains belonging to twelve different genera including Gram-positive and Gram-negative (Figure 1), with *Vibrio*, *Staphylococcus* and *Bacillus* as the dominant genera. Amongst the 29 species found, (i) 8 belong to the genus *Vibrio*, notably *V. anguillarum* (19 strains), *V. pomeroyi* (6 strains), *V. cyclitrophicus* (4 strains), *V. alginolyticus* (1 strain),

V. scophthalmi (2 strains), *V. gigantis* (1 strain) and *V. changaii* (1 strain); (ii) 4 species belong to the genus *Staphylococcus* including *S. hominis* (10 strains), *S. epidermidis* (6 strains), *S. cohnii* (1 strain), and *S. capitis* (1 strain); (iii) 5 species belong to the genus *Bacillus* with the species *B. subtilis* (9 strains), *B. pumilus* (5 strains), *B. licheniformis* (3 strains), *B. cereus* (3 strains), and *B. mojavensis* (3 strains), and (iv) 3 species of the genus *Pseudomonas* such as *P. putida* (9 strains), *P. stutzeri* (2 strains), and *P. anguilliseptica* (3 strains). In addition to these dominant genera, other genera such as *E. coli*, *Shewanella algae*, *Shewanella putrefaciens*, *Micrococcus luteus*, *Rhizobium radiobacter*, and *Neisseria flavescens* were also unambiguously identified by MALDI-MS profiling.

Some of these bacteria are pathogenic to both fishes and humans (e.g., *Vibrio* spp.), some are harmless to fishes but pathogenic to humans (e.g., *Listeria*, *Staphylococcus*, and *Vibrio*) while some can be potential probiotics both for fishes and humans (e.g., *Bacillus*). Interestingly, in growing condition close to that of rearing fish (25°C), the dominant genera isolated from the eggs of copepod *A. tonsa* are *Vibrio* and *Bacillus*. Therefore, 14 strains of *Bacillus* genus, including 5 strains of *B. pumilus* named 18 COPS, 35A COPS, 35R COPS, 38 COPS, 40A COPS, and 9 strains of *B. subtilis* named 181 COPS, 21 COPS, 23 COPS, 24 COPS, 30 COPS, 351 COPS, 401 COPS, 41 COPS, and 58 COPS were tested against some fish pathogens to evaluate their antagonistic activities.

Antagonistic Activities of Isolated *Bacillus* Strains

The antagonistic activities were assessed in triplicates using two methods: the on-site inoculation agar test and the agar diffusion assay, for which the antagonistic activity was quantified using the size of the growth inhibition zone (in mm) around the spot or the well. The spot inoculation agar test revealed that only the *B. pumilus* strains displayed antagonistic activities against *Vibrio*, *Kocuria*, *Listeria*, and *Staphylococcus* (data not shown), demonstrating that the cells and CFS are both responsible for such antagonistic activities. To identify if the antimicrobial activity was due to a secreted molecule, the antimicrobial activity of CFS from *B. pumilus* and *B. subtilis* was assessed by the agar well diffusion method and the results are gathered in the Table 1.

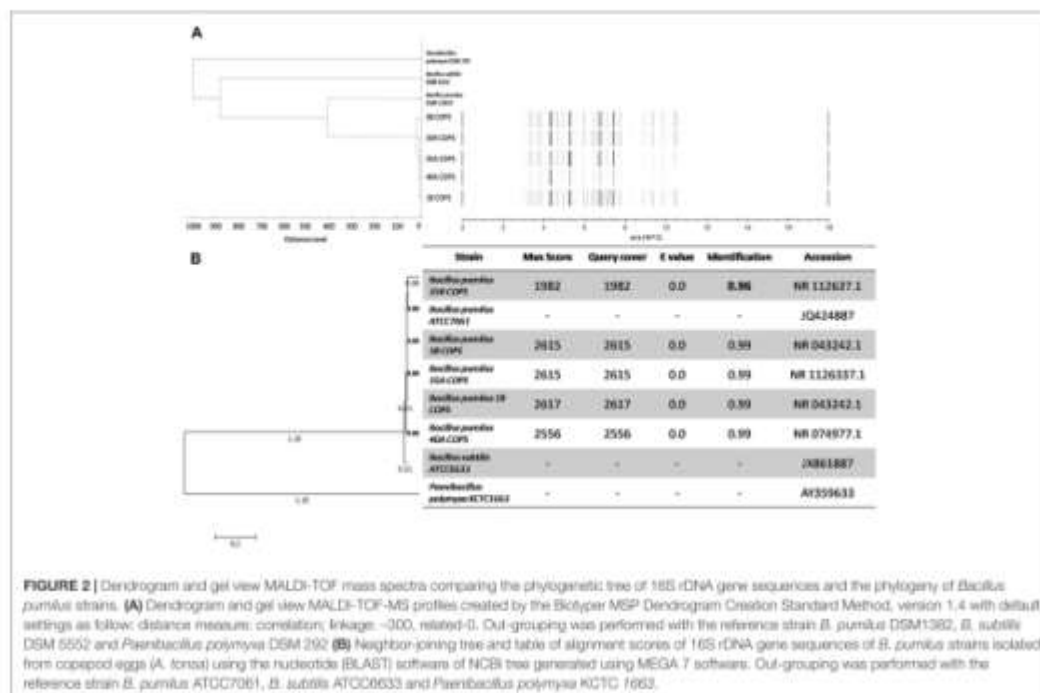
As expected, the CFS of *B. subtilis* strains had no activity against our range of pathogens including strains of *Vibrio*, *Listeria*, and *Staphylococcus*. On the other hand, the CFS of *B. pumilus* strains displayed activities against these pathogens. More precisely, the highest antagonistic activity for the five tested *B. pumilus* strains was observed against *V. alginolyticus* CIP103336 and *V. alginolyticus* 17EMB (previously isolated by ourself from seawater), for which obtained inhibition zones ranged between 10 to 15 mm in size, except for *B. pumilus* 40A COPS which displayed weaker activity against *V. alginolyticus* CIP103336. A similar antagonistic activity pattern was observed against *Listeria innocua* ATCC 51742 and *L. monocytogenes* 157 with wide inhibition zone (10–15 mm). Interestingly, these antagonisms appeared to be strain specific, as no inhibition zone was observed for the other *L. monocytogenes* strains tested



grouped alone. Furthermore, the 4 strains 18 COPS, 35A COPS, 38 COPS, and 40A COPS seem to form one distinct group, and appear affiliated with the reference strain *B. pumilus* ATCC7061. Interestingly this group clustered on the same branch from which the 35R COPS strain derived, this strain forming an isolated ramification. The identification score of 96% for 35R COPS strain suggests that it could be new strain that is not in the NCBI database. This finding prompted us to characterize the secondary metabolites produced by this isolate.

Characterization of Antibacterial Activities

The medium culture (blank data not shown), the CFS issued from the *B. pumilus* 35R and *B. subtilis* 23 COPS strains were subjected to a reverse-phase HPLC-MS/MS analysis on an Acquity-Synapt G2-Si device (Waters). The C18-retained molecules were eluted using a linear ACN gradient of around 1.3%/min (25–95% ACN in 55 min). The BPI-chromatograms (normalized to 5×10^6 ions for a better BPI-chromatogram comparison) are depicted in **Figures 3A,B**, respectively. As expected, the resolution of the C18 core-shell column revealed the presence of many compounds as demonstrated by the number of peaks. The BPI-chromatogram from *B. subtilis* 23 COPS CFS can be divided into 3 zones: (i) the 1–20 min region corresponds to less hydrophobic compounds and shows only a few peaks, (ii) the 20–35 min region where no mass signals are detected and (iii) the 35–58 min regions which corresponds to the elution of lipopeptides (Kalinovskaya et al., 2002) and during which around seven mass signals corresponding to surfactin isoforms are detected (see Supplementary Table S1 for details). The BPI-chromatogram from *B. pumilus* (35R COPS) CFS can be divided into four zones: (i) the 1–11 min region which is similar in terms of mass signals to the same region issued from the 23 COPS CFS BPI-chromatogram, (ii) the 11–20 min region



characterized by a very high intensity (5×10^{15}) of mass signals and which is not present in the 23 COPS CFS BPI-chromatogram, (iii) the 20–46 min region where only a few mass signals are detected and (iv) the 46–58 min region, which also corresponds to the elution zone of lipopeptides, demonstrates that the heavy surfactin isoforms (Supplementary Table S1) produced by the 35R COPS strain are more abundant than in the 23 COPS CFS. Therefore, through this differential approach combining antagonism activity and the HPLC-MS/MS analysis of CFS, we conclude that the antagonism activity of the CFS of *B. pumilus* 35R COPS is mandatory due to compounds in the 11–20 min region of the BPI-chromatogram.

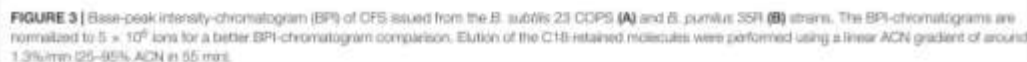
Table 2 gathers the main compounds detected by UV-absorbance and mass spectrometry from the 11–20 min region of the BPI-chromatogram. Molecular structures were deduced based on specific UV-absorbance profiles and mass fragmentation patterns (**Figure 4**) obtained by CID. According to the UV-absorbance profile, phosphoamicoumacin B ($m/z = 505.2065$; RT = 13.19 min) and A ($m/z = 504.2140$; RT = 12.86 min) are the most abundant molecular forms. Concomitantly, amicoumacin B ($m/z = 425.2271$; RT = 14.1 min) and A ($m/z = 424.2271$; RT = 13.42 min) are also detected in mass spectrometry but their UV-signal calculated abundance is lower.

Molecular structure elucidation was performed using the CID-fragmentation patterns shown in **Figures 4A–D**.

As illustrated, the fragmentation pattern below the m/z 274.08 is strictly identical from one molecule to another and, combined with the UV-profile common to all compounds, this indicates that all molecules have the same chromophore (3, 4-dihydro-8-hydroxyisocoumarin). The phosphorylated amicoumacins are easily identified by the 98 Da-mass difference, specific to the loss of a phosphoric acid group (H_2PO_4). Finally, for each compound, the ion fragments detected in the higher m/z values testify to the successive loss, from the pseudo molecular ions, of NH_3 and H_2O groups and therefore demonstrate the presence of an amide group (amicoumacin A forms) and a carboxylic group (amicoumacin B forms).

DISCUSSION

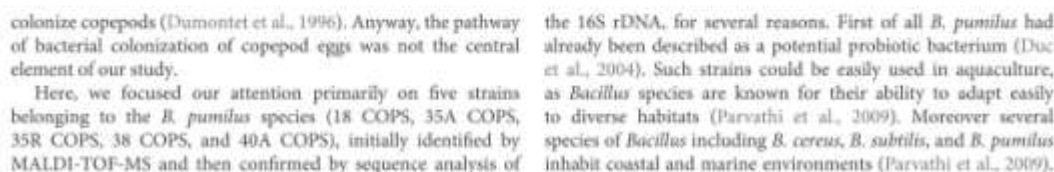
In this study, using mesophilic culture conditions, 175 bacterial strains were isolated from strains colonizing *A. tonsa* eggs, among which large majority (70%) of these isolates were GNB and a quarter were catalase positive. MALDI-TOF-MS analysis allowed rapid and reliable identification of most of these isolates, at least at the genus level and often at the species level. *In fine* although the real numerical relevance can be different compared to a 16S rDNA sequencing that can be directly performed on copepod eggs, a great diversity of bacterial genera was found, including *Staphylococcus*, *Kocuria*, and *Pseudomonas* strains.



eggs could be an elegant way for transporting strains of interest. However, a recent study, based on a dual analysis (denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and pyrosequencing) targeting the bacterial 16S rRNA gene, unveiled that the microbiota of copepods is dominated by Alphaproteobacteria and Gammaproteobacteria and showed the presence, in lower abundance of Actinobacteria, Verrucomicrobia, Firmicutes, and Bacteroidetes (Skovgaard et al., 2015). The identification of the exact pathway of colonization can be developed in future studies by using appropriate experimental protocol. In fact, we did not find in the literature any study focusing on the pathway of bacteria colonization in copepod eggs. But, some recent studies focusing on late developmental stages of copepods (mainly adults) showed that the colonization pathway could be complicated (Dumontet et al., 1996; Rawlings et al., 2007; Almada and Tarrant, 2016). Moreover, some experimental studies confirmed that some bacterial strains (such as *E. coli*) cannot

Name	m/z ^a	Mass (Da)	Molecular formula	Retention time (min)	UV λ _{max} (nm)
Amicoumab A	424.2271	423.2006	C ₁₂₂ H ₁₂₆ N ₁₂ O ₁₇	13.42	247; 313
Amicoumab B	425.2271	424.1846	C ₁₂₂ H ₁₂₆ N ₁₂ O ₁₆	14.17	247; 313
Phosphoramidomab A	504.2140	503.1669	C ₁₂₀ H ₁₂₂ N ₁₂ O ₁₇ P	12.86	247; 313
Phosphoramidomab B	505.2065	504.1509	C ₁₂₁ H ₁₂₂ N ₁₂ O ₁₇ P	13.19	247; 313

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org



Finally, *B. pumilus* has also been reported to be the second most predominant *Bacillus* species in space crafts (Nicholson et al., 2000).

The antagonism capability of the five strains of *B. pumilus* isolated in this study was suggested by their antimicrobial activity against several pathogens (*V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *L. innocua*, *L. monocytogenes*, and *S. aureus*). Interestingly, the probiotic propensity of *B. pumilus* strains have been already reported. A recent study showed that *B. pumilus* H2 isolated from marine sediment, used as probiotic for juvenile shrimp, has strong potential for the prevention or treatment of fish vibriosis in the aquaculture industry (Gao et al., 2017). Previously, Leyton et al. (2012) have shown that *B. pumilus*, issued from a marine strain of the collection of the Laboratorio de Ecología Microbiana of the Universidad de Antofagasta, produces metabolites that significantly inhibit the growth of the pathogen *V. parahaemolyticus*. Another example, a *B. pumilus* strain, isolated from the mid-gut of healthy black tiger shrimp, weakly inhibits the growth of *V. parahaemolyticus* in cross-streaking assays on solid medium but strongly inhibits those of the marine bacterial pathogens *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, and *V. harveyi*, and was thought-out commercial potential as a probiotic (Hill et al., 2009).

Through this study, we illustrate that the CFS collected from the culture of our five *B. pumilus* strains inhibit the growth of various *Vibrio* strains. These bacteria are responsible for fish vibriosis which causes lethargy, degeneration of the gills, lymphoid organ, digestive system and epitheliums leading to eventual or rapid mortality (Rashied, 1989; Deane et al., 2001; Akaylı and Timur, 2002; Haenen et al., 2014). To limit the dissemination of resistant bacteria, the use of antibiotics to fight bacterial diseases in aquaculture farms is now banished or strictly regulated in developed countries (Carbone and Faggio, 2016). Therefore, the use of antagonistic bacteria to limit the development of vibriosis appears as a promising strategy (Carbone and Faggio, 2016), and *Bacillus* seems to be a good candidate for this purpose. Bacteria belonging to this genus display several advantages including an environmental ubiquity, a persistence and stability in the harsh conditions of the gastrointestinal ecosystem since *Bacillus* spores can tolerate such environment and are able to germinate and proliferate within the intestine (Tam et al., 2006). Moreover Prieto et al. (2014) have recently recommended that probiotics should be isolated from the gastrointestinal tract to give them the best chance of surviving in and colonizing the intestine.

The mode of action of probiotics in *in vivo* conditions remains unclear with a number of potentially synergistic or complementary mechanisms proposed, including immunostimulation (Díaz-Rosales et al., 2006; Scharek et al., 2007), inhibition or competition with potential pathogens (Vine et al., 2004; Balcázar and Rojas-Luna, 2007; Decamp et al., 2008) or simply maintenance of healthy and diverse intestinal microbiota. In our case the five isolated strains of *B. pumilus* display antagonism which could be associated with the production of two major families of antimicrobial compounds, the fengycins and the surfactins

(Lebbadi et al., 1994; Xu et al., 2014; Mora et al., 2015). The presence of the genes coding for these two lipopeptides was established and could be considered as one of the main mechanisms implicated in the antagonistic effects on the pathogens tested. HPLC-MS/MS analyses performed on the most active CFS from by *B. pumilus* and the inactive CFS from *B. subtilis* isolated in this study reveals that no molecule of the fengycin family is produced by both strains. Concomitantly, the population of surfactin molecules is not so different between each strain and, as demonstrated by HPLC-MS/MS data, only *B. pumilus* produces heavier surfactin isoforms. Similarly, Berrue et al. (2009) have isolated a *B. pumilus* strain (SP21) from a sediment sample collected in the Bahamas and reported its antagonism against *S. aureus* ATCC 10832, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 14210 and *Candida albicans* ATCC 14053. As characterized by spectroscopic methods including 2D-NMR and MS, this strain SP21 produces 5 surfactin analogs, the glycocholic acid, the amicoumacins A and B in addition to 3 liposamides A-C.

Some strains of the *Bacillus* genus produce natural compounds displaying antagonistic activities against many bacterial, fungal pathogens and are often used as agents for the treatment and/or prevention of different plant and animal infections (Ougera and Jacques, 2008; Lee and Kim, 2011). Their antimicrobial activities are mainly attributed to the production of antibiotic peptide derivatives of the lipopeptide family (Berrue et al., 2009). *B. pumilus* strains have been reported as producing another antimicrobial peptides called pumilucidins which are active against a wide range of microorganisms (Naruse et al., 1990). In this study, we reported that two major families of antimicrobial compounds are produced by the *B. pumilus* strain named 35R COPS associated to copepod eggs: the surfactin and the amicoumacin families.

The amicoumacins A, B, and C are a family of structurally diverse products that possess a broad range of pharmacological properties such as antibacterial, anti-inflammatory, antiulcer, gastroprotective, and anti-*Helicobacter pylori* (Itoh et al., 1981; Hashimoto et al., 2007). A recent study has shown that *B. pumilus* H2 isolated from marine sediment produces an active molecule against *Vibrio* species (Gao et al., 2017). This active molecule was identified as the amicoumacin A, indicating that this *B. pumilus* strain has a strong potential application in the prevention or control of fish vibriosis. In 2007, the MU313B *B. pumilus* strain isolated from a soil sample collected in Japan was shown to produce amicoumacins A, B and their 8'-phospho derivatives. These molecules have been reported to play a crucial role in the anti-*S. aureus* and anti-MRSA activities (Hashimoto et al., 2007). The potential probiotic traits of the *B. pumilus* 35R COPS strain associated to copepod eggs should be investigated further and confirmed by *in vivo* study to establish their efficacy in live animals.

CONCLUSION

Copepods are a natural, economical, equilibrated and safe food source for the growth of fish larvae in larviculture. Moreover, through their microbiote (acquired or innate), copepods appear

as a natural way of probiotics administration for the fish larvae. Here, from copepod eggs (isolation site) and using the modern, fast, accurate MALDI-TOF-profiling approach, we reported the bacterial identification of 102 (58%) over 175 isolates obtained according to mesophilic culture conditions. Thirty-four strains belong to *Vibrio* genus, 18 to *Staphylococcus* genus, 14 to *Pseudomonas* genus, 25 to *Bacillus* genus. Among the latter, *B. pumilus* and *B. subtilis* strains were subjected to two antagonism tests. The CFS of *B. pumilus* displayed an antagonistic activity against certain species of the *Vibrio*, *Kocuria*, *Listeria*, and *Staphylococcus* genera in contrast to those of *B. subtilis*. These differences in antimicrobial activities have been used for a rapid discrimination of the compounds responsible for the antagonism. Therefore, their CFS compounds were resolved and compared through a differential HPLC-ESI-MS/MS approach. Using this approach, the surfactin family molecules found in each CFS have been rapidly excluded as candidate and compounds found exclusively in the *B. pumilus* CFS, eluted in the 11–20 min region, were characterized using their specific UV-absorbance profiles and their MS/MS fragmentation patterns. Hence, the antagonism activity of *B. pumilus* CFS was indirectly shown to be due to members of the amicoumacin family: the amicoumacin A, the amicoumacin B, the phosphoamicoumacin A and the phosphoamicoumacin B. The potential probiotic propensity of the 35R COPS strain stays still clearly to establish in the future initially through the determination of its *in vitro* survival in gastric and intestinal environments, the determination of hydrophobicity percentage but also other added values and the search of the genes coding for the members of the amicoumacin family.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CF and SS co-designed the study and participated in its initiation and coordination, together with TG, BC and DD. MZ, MC, and YB carried out the bacteria culture, the molecular biology experiments and the antagonism research. Chromatography and

mass spectrometry experiments were performed by MC and MZ. All authors participated in the result interpretations and helped draft the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

FUNDING

This work was supported by the Hauts-de-France region funding through the ALIBIOTECH research program. The MALDI-TOF MS profiling and HPLC-MS experiments were performed on the REALCAT platform funded by a French governmental subvention administrated by the French National Research Agency (ANR) within the frame of the 'Future Investments' program (ANR-11-EQPX-0037). The Hauts-de-France Region and the FEDER, the Ecole Centrale de Lille and the Centrale Initiatives Foundation are also warmly acknowledged for their financial contributions to the acquisition of REALCAT platform equipments. This work is a contribution to the project CPER 2014-2020 MARCO funded by the French government and the region Hauts-de-France.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Yen-Ju Pan, Edouard Husson, and Emilien Déposé as well as all past members of LOG COPEFISH team (SS) for their involvement in maintaining continuous and mass cultures of copepods. We are also indebted to Corinne Boistel for her technical assistance and Dr. Delphine Caly for the critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01919/full#supplementary-material>

REFERENCES

- Abate, T. G., Nielsen, R., Nielsen, M., Drillet, G., Jepsen, P. M., and Hansen, B. W. (2013). Economic feasibility of copepod production for commercial use: result from a prototype production facility. *Aquaculture* 436, 72–79. doi: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.012
- Akaylı, T., and Timur, G. (2002). Vibriosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in farms in the Aegean sea coast of Turkey. *Turk. J. Fish. Aquat. Sci.* 2, 89–91.
- Al Atiy, A. K., Drider-Hadiouche, K., Rasallec, R., Silvain, A., Vachue, A., and Drider, D. (2015). Probiotic potential of *Enterococcus faecalis* strains isolated from Meconium. *Front. Microbiol.* 6:227. doi: 10.3389/fmicb.2015.00227
- Almada, A. A., and Tarrant, A. M. (2016). Vibrio elicits targeted transcriptional responses from copepod hosts. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92, 1–11. doi: 10.1093/femsec/fiw072
- Aly, S. M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., and Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 128–136. doi: 10.1016/j.fsi.2008.03.013
- Austin, B., and Austin, D. A. (1993). "Control," in *Bacterial Fish Pathogens: Diagnosis of Farmed and Wild Fish*, ed. S. Schuster (Chichester: Springer), 693–706.
- Balcázar, J. L., and Rojas-Luna, T. (2007). Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against *Vibrio* species confers protection against Vibriosis in Juvenile Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Curr. Microbiol.* 55, 409–412. doi: 10.1007/s00284-007-9000-0
- Berrue, F., Ibrahim, A., Boland, P., and Kerr, R. G. (2009). Newly isolated marine *Bacillus pumilus* (SP21): a source of novel lipopeptides and other antimicrobial agents. *Pure Appl. Chem.* 81, 1027–1031. doi: 10.1351/PAC-CON-08-09-25
- Carbono, D., and Faggio, C. (2016). Importance of probiotics in aquaculture as immunostimulants. Effects on immune system of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 54, 173–178. doi: 10.1016/j.fsi.2016.04.011
- Colewell, R. R., and Huq, A. (1998). Global microbial ecology: biogeography and diversity of vibrios as a model. *J. Appl. Microbiol.* 85, 1345–1375. doi: 10.1111/j.1365-2672.1998.tb05292.x
- Deane, E. E., Li, J., and Woo, N. Y. (2001). Hormonal status and phagocytic activity in sea bream infected with vibriosis. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 129, 687–693. doi: 10.1016/S1096-4859(01)00369-4
- Decamp, O., Moriarty, D. J. W., and Lavens, P. (2008). Probiotics for shrimp larviculture: review of field data from Asia and Latin America. *Aquac. Res.* 39, 334–338. doi: 10.1111/j.1365-2109.2007.01664.x

- Díaz-Rosales, P., Salinas, L., Rodríguez, A., Cuesta, A., Chabrillón, M., Balebona, M. C., et al. (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 482–492. doi: 10.1016/j.fsi.2005.06.007
- Drago, L., Mattina, R., Nicola, L., Rodighiero, V., and De Vecchi, E. (2011). Macrolide resistance and in vitro selection of resistance to antibiotics in lactobacillus isolates. *J. Microbiol.* 49, 851–856. doi: 10.1007/s12275-011-0470-1
- Drillet, G., Jørgensen, N. O. G., Sørensen, T. F., Rasmussen, H., and Hansen, B. W. (2008). Biochemical and clinical observations supporting the use of copepods as live feed organisms in marine larviculture. *Aquac. Res.* 37, 756–772. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.01489.x
- Duc, L. H., Hing, H. A., Barbosa, T. M., Henriques, A. O., and Catting, S. M. (2004). Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2161–2171. doi: 10.1128/AEM.70.4.2161-2171.2004
- Dumontet, S., Krovacek, K., Baloda, S. R., Grottioli, R., Pasquale, V., and Vannucci, S. (1996). Ecological relationship between aeromonas and vibrio spp. and planktonic copepods in the coastal marine environment in Southern Italy. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 243–254. doi: 10.1016/0147-9571(96)00012-4
- Franco, S. C., Augustin, C. B., Geffen, A. J., and Teresa Dinis, M. (2017). Growth, egg production and hatching success of *Acartia tonsa* cultured at high densities. *Aquaculture* 460, 569–578. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.10.044
- Gao, X. Y., Liu, Y., Mian, L. L., Li, E. W., Hou, T. T., Liu, Z. P., et al. (2017). Mechanism of anti-vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance. *AMB Express* 7:23. doi: 10.1186/s13568-017-0323-3
- Gatrouche, F. J., and Lébel, R. (1996). Flore digestive des poissons : approche environnementale. *Cah. Etud. Rech. Francophones Agric.* 7, 29–35.
- González, C. T., Castro, R., Muñoz, G., and López, Z. (2016). Sea lice (*Siphonostomatulidae*: Caligidae) diversity on littoral fishes from the south-eastern pacific coast determined from morphology and molecular analysis, with description of a new species (*Lapeoutherinus Confusum*). *Piscicult. Int.* 65, 685–695. doi: 10.1007/s10499-016-0800-6
- Gagliardini, C., Irera, G. P., Lentini, V., and Maugeri, T. L. (2008). Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arrobacter* Spp. Associated with Copepods in the Straits of Messina (Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 56, 600–606. doi: 10.1016/j.marpolbul.2007.12.001
- Hansen, O. L., Fouz, B., Amaro, C., Isers, M. M., Mikkelsen, H., Zencic, S., et al. (2014). *Vibrios* in aquaculture. *Eur. Assoc. Fish Pathol. Bull.* 34, 156–148.
- Hagemann, A., Oie, G., Eymeno, J. O., and Olsen, V. (2016). Effects of light and short-term temperature elevation on the 48-h hatching success of cold-stored *Acartia tonsa* dana eggs. *Aquac. Int.* 24, 57–68. doi: 10.1007/s10499-015-9908-5
- Hall, B. G. (2013). Building phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 30, 1229–1235. doi: 10.1093/molbev/mst012
- Hansen, B., and Berch, G. (1996). Bacteria associated with a marine planktonic copepod in culture. I. Bacterial genera in seawater, body surface, intestines and fecal pellets and succession during fecal pellet degradation. *J. Plankton Res.* 18, 257–273. doi: 10.1093/plankt/18.2.257
- Hansen, B. W., Buttino, I., Cunha, M. E., and Drillet, G. (2016). Embryonic cold storage capability from seven strains of *Acartia* Spp. Isolated in Different Geographical Areas. *Aquaculture* 457, 131–139. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.02.024
- Hoshimoto, M., Taguchi, T., Nishida, S., Ueno, K., Kozumi, K., Aburada, M., et al. (2007). Isolation of 8-Phosphate ester derivatives of amicoumacins: structure-activity relationship of hydroxy amino acid moiety. *Matrix* 60, 752–756. doi: 10.1038/ja.2007.99
- Hill, J. E., Balzano, I. C. F., and Barnes, A. C. (2009). Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from Penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J. Fish Dis.* 32, 1007–1016. doi: 10.1111/j.1365-2761.2009.01084.x
- Højgaard, J. K., Jepsen, P. M., and Hansen, B. W. (2008). Salinity-induced quiescence in eggs of the calanoid copepod *Acartia tonsa* (dana): a simple method for egg storage. *Aquac. Res.* 39, 828–836. doi: 10.1111/j.1365-2109.2008.01936.x
- Hong, H. A., Duc, L. H., and Catting, S. M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 813–833. doi: 10.1016/j.femrev.2004.12.001
- Humes, A. G. (1996). *How Many Copepods? In Ecology and Morphology of Copepods*. Dordrecht: Springer, 1–7. doi: 10.1007/978-94-017-1347-4_1
- Itoh, J., Shomura, T., Omoto, S., Miyado, S., Yuda, Y., Shibata, U., et al. (1981). Isolation, physicochemical properties and biological activities of amicoumacins produced by *Bacillus pumilus*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1255–1259.
- Kalinovskaya, N. L., Kuznetsova, T. A., Ivanova, E. P., Rumanenka, L. A., Voinov, V. G., Huth, F., et al. (2002). Characterization of surfactin-like cyclic depsipeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from Ascidian *Halecyrobia aurantium*. *Mar. Biotechnol.* 4, 179–188. doi: 10.1007/s10126-001-0084-4
- Lebbadi, M., Gálvez, A., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., and Valdivia, E. (1994). Fungicin M4: a narrow spectrum peptide antibiotic from *Bacillus licheniformis* M-4. *J. Appl. Bacteriol.* 77, 49–53. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03043.x
- Lee, H., and Kim, H.-Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the Genus *Bacillus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 229–235.
- Leyton, Y., Borques, J., Darias, J., Cueti, M., Díaz-Marrero, A. R., and Riquelme, C. (2012). Diketopiperazines produced by an *Bacillus* species inhibits *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Aquac. Res. Dev.* 3, 144.
- Mauchline, J. (1998). *The Biology of Calanoid Copepods*. Cambridge, MA: Academic Press.
- Mora, I., Cabrefiga, J., and Montesinos, E. (2015). Cyclic lipopeptide biosynthetic genes and products, and inhibitory activity of plant-associated *Bacillus* against phytopathogenic bacteria. *Int. J. Vitro Vitro. PLOS ONE* 10:e0127738. doi: 10.1371/journal.pone.0127738
- Mozafari, D. J. W. (1998). Control of luminous *Vibrio* Species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164, 351–358. doi: 10.1016/S0044-8486(98)00199-9
- Nacef, M., Chevalier, M., Choffet, S., Drider, D., and Flahaut, C. (2016). MALDI-TOF mass spectrometry for the identification of lactic acid bacteria isolated from a French cheese: the maroilles. *Int. J. Food Microbiol.* 247, 2–8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.07.005
- Naruse, N., Tsumyo, O., Kobaru, S., Kamei, H., Miyaki, T., Konishi, M., et al. (1990). Pumilacidin, a complex of new antiviral antibiotics, production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J. Antibiotics* 43, 267–280. doi: 10.7164/antibiotics.43.267
- Nicholson, W. L., Murakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., and Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 548–572. doi: 10.1128/MMBR.64.3.548-572.2000
- Ongena, M., and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. doi: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Pan, Y.-J., Sotouhi, A., Hwang, I.-S., and Sotouhi, S. (2015). Short Communication artificially cold-induced quiescent egg viability of the tropical copepod *Acartia tonsa* (Copepoda, Calanoida). *Aquac. Res.* 2015, 1–6.
- Parvathi, A., Krishna, K., Jose, J., and Nair, S. (2009). Biochemical and molecular characterization of *Bacillus pumilus* isolated from coastal environment in Cochin, India. *Proc. J. Microbiol.* 40, 269–275. doi: 10.1590/S1517-838220090002000012
- Prieto, M. L., O'Sullivan, L., Tan, S. P., McLoughlin, P., Hughes, H., Gutierrez, M., et al. (2014). In vitro assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Mar. Drugs* 12, 2422–2445. doi: 10.3390/md12052422
- Rasheed, V. (1989). *Vibriosis outbreak among cultured seabream (Acanthopagrus luri)* broodstock in Kuwait. *Aquaculture* 76, 189–197. doi: 10.1016/0044-8486(89)90072-0
- Rawlings, T. K., Ruiz, G. M., and Colwell, R. R. (2007). Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 7926–7933. doi: 10.1128/AEM.01238-07
- Roddie, B. D., Leskey, R. J. G., and Berry, A. J. (1984). Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Pope) (Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the Forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 79, 191–211. doi: 10.1016/0022-0981(84)90219-3
- Scharek, L., Altherr, B. J., Tölke, C., and Schmidt, M. F. G. (2007). Influence of the probiotic *Bacillus cereus* Var. Toyoi on the Intestinal Immunity of Piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120, 136–147. doi: 10.1016/j.vetimm.2007.07.015
- Skovgaard, A., Castro-Mejía, J. L., Hansen, L., and Nielsen, D. S. (2015). Host-specific and pH-dependent microbiomes of copepods in an extensive rearing system. *J. Aquac. Res. Dev.* PLOS ONE 10:e0132516. doi: 10.1371/journal.pone.0132516

- Souissi, A., Souissi, S., and Hansen, B. W. (2016). Physiological improvement in the copepod *Eurytemora affinis* through thermal and multi-generational selection. *Aquac. Res.* 47, 2227–2242. doi: 10.1111/are.12675
- Stancheva, S., Souissi, A., Ibrahim, A., Barrio, A., Spriet, C., Souissi, S., et al. (2015). Lipid nanocapsules as a new delivery system in copepod toxicity studies and optical imaging. *Colloids Surf. B* 135, 441–447. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.07.082
- Sun, Y. Z., Yang, H. L., Huang, K. F., Ye, J. D., and Zhang, C. X. (2013). Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in Copepod to grouper *Epinephelus zonioides* Larvae. *Aquaculture* 382–393, 44–50. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.01.037
- Tam, N. K. M., Uyen, N. Q., Hong, H. A., Duc, L. H., Hoa, T. T., Serra, C. R., et al. (2006). The intestinal life cycle of *Bacillus subtilis* and close relatives. *J. Bacteriol.* 188, 2692–2700. doi: 10.1128/JB.188.7.2692-2700.2006
- Tlili, S., Ovaert, J., Souissi, A., Ouddane, B., and Souissi, S. (2016). Acute toxicity, uptake and accumulation kinetics of nickel in an invasive copepod species *Pseudodiaptomus marinus*. *Chemosphere* 144, 1729–1737. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.057
- Vine, N. G., Laukes, W. D., Kaiser, H., Daya, S., Ruttner, J., and Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J. Fish Dis.* 27, 319–326. doi: 10.1111/j.1365-2761.2004.00542.x
- Xu, H. M., Rong, Y. J., Zhao, M. X., Song, B., and Chi, Z. M. (2014). Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 127–136. doi: 10.1007/s00253-013-5291-1

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Zidou, Chevalier, Belguemina, Cadenec, Grand, Deider, Souissi and Flahaut. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Genome Sequencing and Analysis of *Bacillus pumilus* ICB403 Isolated from *Acartia tonsa* Copepod Eggs Revealed Surfactin and Bacteriocin Production: Insights on Anti-*Staphylococcus* Activity

Mahammed Zidour¹ · Yanath Belguesmia¹ · Benoit Cudennec¹ · Thierry Grard¹ · Christophe Flahaut¹ · Sami Souissi² · Djamel Drider¹

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Here we show that *Bacillus pumilus* ICB403 recently isolated from copepod eggs is able to produce, after 48–72 h of growth in Landy medium, extracellular inhibitory compounds, which are active against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) ATCC 43300, MRSA-S1, *Staphylococcus epidermidis* 11EMB, *Staphylococcus warneri* 27EMB, and *Staphylococcus hominis* 13EMB. Moreover, these extracellular inhibitory compound(s) were able to potentiate erythromycin against the aforementioned staphylococci. The minimum inhibitory concentration (MIC) of erythromycin was reduced from 32 µg/mL to 8 µg/mL for MRSA ATCC 43300 and MRSA SA-1 strains, and from 32–64 µg/mL to 4 µg/mL for *S. epidermidis* 11EMB and *S. hominis* 13EMB strains.

The genome sequencing and analysis of *B. pumilus* ICB403 unveiled 3,666,195 nucleotides contained in 22 contigs with a G + C ratio of 42.0%, 3,826 coding sequences, and 73 RNAs. In silico analysis guided identification of two putative genes coding for synthesis of surfactin A, a lipopeptide with 7 amino acids, and for a circular bacteriocin belonging to the circularin A/uberolysin family, respectively.

Keywords Copepods · *Bacillus pumilus* · Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* · Antagonism · Bacteriocin · Surfactin

Introduction

Fish and other seafood products are consumed worldwide [1, 2]. In addition to possible presence of histamines and biotoxins [3, 4], these food products can contain potentially pathogenic bacteria and viruses as reported in different studies [5–8].

The last decade has seen studies on the gastrointestinal microbiota of mammals on the rise. These studies augmented our knowledge on the microbiota and their relationship with health and diseases. To this regard, the fish intestinal microbiota may contain 10^7 to 10^{11} bacteria/g of intestinal content [9], and the main phyla encountered are proteobacteria, bacteroidetes, actinobacteria, firmicutes, and *Fusobacterium* [10]. Nonetheless, several factors including host, environmental, and microbial factors can affect the fish's GI tract content [10]. An earlier report established the impact of temperature, water salinity, inorganic and organic pollutants, human and animal waste, and natural occurrence of bacteria in the water on fish GI tract [11].

Staphylococci are known as important opportunistic human pathogens and, therefore, recognized as vectors of a large variety of diseases for humans and animals [12]. *Staphylococcus aureus* and MRSA were shown as prevalent microorganisms in fish and fish products contributing in this way to global spread of bacterial resistance to antibiotics [13–15].

Aquaculture that is defined as “underwater agriculture” is the fastest growing and thriving food-production industry in the world but this sector is plagued by diseases of bacterial,

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12602-018-9461-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Yanath Belguesmia
 Yanath.Belguesmia@polytech-lille.fr

✉ Djamel Drider
 Djamel.Drider@univ-lille.fr

¹ Université de Lille, INRA, ISA, Université d'Artois, Université du Littoral-Côte d'Opale, EA 7394 – ICB-Institut Charles Viollette, Lille, France

² Université de Lille, CNRS, Université du Littoral Côte d'Opale, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, UMR 8187 LOG, Wimereux, France

Published online: 18 September 2018

Springer

viral, fungal and parasitological origins [16]. Feeding infected fish with antibiotic-medicated food has become a general practice [17, 18]. The results on the use of antibiotics are conflicting and this practice has been considered as ineffective because affected fish may remain off feed. The intake of antibiotics in fish was estimated to be relatively low, with only 20–30% of antibiotics ingested [19]. The overuse of antibiotics contributed to wild spread of bacterial resistance causing therefore serious challenges to health. It is now admitted that eradication of antibiotic-resistant bacteria remains difficult and only few new antibiotics are in the pipeline mainly for the treatment of infections caused by Gram-negative bacilli [20]. Alternatives to antibiotics that give similar or enhanced protection to aquatic animals are urgently needed. Antimicrobial peptides (AMPs) are among the therapeutic options currently considered to replace or potentiate the fading antibiotics. AMPs are produced by all living cells as innate molecules [21]. Those produced by Gram-negative and Gram-positive bacteria have gained recognition as promising alternatives to antibiotics. Conversely to antibiotics, AMPs underpinned narrow spectra and are active at low concentration, which help reducing and even avoiding development of bacterial resistance [22].

Bacilli from marine organisms were reported to secrete a broad range of antimicrobials including polypeptides, macrolactones, fatty acids, polyketides, isocoumarins, lipopeptides biosurfactants, and different types of AMPs [23, 24]. Abriouel et al. [23] reported that bacilli as *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* and *B. pumilus* are may also produce bacteriocins. These are ribosomally synthesized AMPs produced by both Gram-positive and Gram-negative bacteria [22]. Bacteriocins mainly those produced by lactic acid bacteria (LAB) are considered as potential alternative to antibiotics [25, 26].

In this study, we investigated the inhibitory activity of *B. pumilus* ICVB403; a strain recently isolated from *Acartia tonsa* copepod eggs [27]. This strain resulted to be active against *S. aureus* ATCC 25923, MRSA ATCC 43300, MRSA-S1, *S. epidermidis* 11EMB, *S. warneri* 27EMB, and *S. hominis* 13EMB. Notably, *S. epidermidis* 11EMB, *S. warneri* 27EMB, and *S. hominis* 13EMB were isolated from seawater during this study.

On the other hand, the proteinaceous nature of extracellular inhibitory compounds was determined by the analysis of their sensitivity to proteolytic enzymes. Also, the *in silico* analysis of the whole genome of *B. pumilus* ICVB403 has driven to identification of two putative genes coding for AMPs. The first one resembles to surfactin A; a well-known lipopeptide with 7 amino-acids, and the second one codes for a circular bacteriocin belonging to the circularin A/uberolysin family. This study provides first evidence highlighting the capabilities of *B. pumilus* ICVB403 to produce two categories of AMPs with anti-*Staphylococcus* activity; opening for therapeutic options.

Material and Methods

Bacteria Isolation from Seawater and Their Molecular Identification

Strains belonging to *Staphylococcus* genus were isolated from treated seawater collected at the Wimereux marine station (North of France). These samples were serially diluted in 0.9% (v/v) of sodium saline buffer from 10^{-1} to 10^{-6} and plated on nutrient agar plates and incubated at 25 °C for 48 h. Colonies grown under these conditions were characterized macroscopically and microscopically. Afterwards, the strains matching with *Staphylococcus* morphological and biochemical traits, including Gram-positive staining and catalase-testing were identified by mass spectrometry approach by MALDI-TOF analysis (Bruker Daltonics) (Bremen, Germany), as well as 16S rDNA sequencing [27, 28].

Genomic DNA Extraction

Pure total DNA was extracted from *Bacillus pumilus* ICVB403 and staphylococci strains with the Wizard® Genomic DNA Purification Kit using the supplier's instructions (Promega, Madison, WI, USA). Total DNA was quantified with a Nanodrop Lite (Biowave II, Biochrom WPA) (Cambridge, UK) as recently reported [27].

Molecular Identification of *Staphylococcus* Strains Isolated from Seawater

The 16S rDNA of *Staphylococcus* strains were amplified with 16S forward 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' and 16S reverse 5'-GGMTACCTTGTACGAYTTC-3' primers [28], and the following PCR program: 94 °C/5 min, 29 cycles at 94 °C/1 min, 55 °C/1 min and 72 °C/1 min; and finally 72 °C/5 min. The resulting PCR products were purified using a Qiagen PCR purification kit (Hilden, Germany), and then sequenced at Eurofins (Hamburg, Germany). The sequences were blasted using BLASTn software of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Antibiotics Sensitivity of *Staphylococcus* Strains from Seawater

The MIC of antibiotics tested on the *Staphylococcus* strains used as target strains were evaluated according to the standard dilution method on the Mueller Hinton (MH) agar medium according to EUCAST recommendations [29]. A series of dilutions was prepared to obtain a decreasing concentration ranging from 64 mg/L to 0.03 mg/L for each antibiotic (amoxicillin, imipenem, gentamicin, amikacin, erythromycin, azithromycin, gamithromycin, ciprofloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, vancomycin, tetracycline, chloramphenicol,

and rifampin) (Bio-Mérieux, France). Notably, erythromycin used for assessment of AMPs-antibiotic synergism, was purchased from Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany). The resulting melted MH agar was poured into Petri plates. The dishes were inoculated by the steer device with the bacterial suspension of each strain grown overnight in the MH broth. The inoculated plates were incubated for 24 h at 37 °C. MIC is defined as the lowest concentration of an antibiotic inhibiting the visible growth of a microorganism after a night of incubation.

***Bacillus pumilus* ICVB403 Growth Conditions and Production of Inhibitory Compound(s)**

B. pumilus ICVB403 was grown in 500 mL flasks containing Luria Bertani (LB) broth from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), nutrient broth from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany), or in Landy medium prepared before use, by mixing 50 mL of each of the following components purchased from Sigma Aldrich Company (Darmstadt, Germany): solution A (yeast extract 20 g/L; MgSO₄ 10 g/L), solution B (K₂HPO₄ 20 g/L; KCl 20 g/L), glucose (400 g/L), MOPS (420 g/L), glutamic acid (100 g/L), and solution C (CuSO₄ 32 mg/L; MnSO₄ 25 mg/L; FeSO₄ 8 mg/L). The resulting mixture was adjusted to pH 7 by addition of potassium hydroxyl (3 mM KOH) and completed to a final volume of 1 L with sterile distilled water. Incubation was performed at 30 °C with agitation (160 rpm) for 48–72 h until to reach the stationary phase. The cell-free culture supernatants (CFCS) obtained by centrifugation (10,000g, 15 min, 4 °C) were filtered using 0.22 µm filter (Millex GV; Millipore Corp) (Belford, MA, USA) before any use.

Assessment of Antimicrobial Activity Based on the Agar Diffusion Test

The CFCS used for assessing the antibacterial activity was obtained from fresh cultures of *B. pumilus* ICVB403. Wells were made in solid brain heart infusion (BHI) agar plates (0.9% w/v), then they were pre-inoculated with 150 µL of staphylococci target strain and filled with 50 µL of *B. pumilus* ICVB403 CFCS. Agar plates were left at room temperature, in sterile conditions, for 1 h before incubation for 24–48 h at 37 °C. Each assay was performed in triplicate. Antibacterial activity was evaluated as means of the diameters of inhibition zones around the well containing the CFCS.

Checkerboard Assay

Combined effect of the erythromycin and the active CFCS, which was obtained after growth of *B. pumilus* ICVB403 in Landy medium for 48–72 h, was determined with use of checkerboard assay methodology. The concentrations of

erythromycin ranged from 1 to 256 µg/mL, whereas the active CFCS was tested upon dilutions in BHI broth. The dilutions of CFCS were ranking from 1/2 to 1/16 ratio. Unfermented Landy medium (without growth of *B. pumilus* ICVB403) was used as negative control and therefore combined to erythromycin in the same proportions as the active CFCS. Ninety-six wells plates were inoculated with target strains (MRSA ATCC 43300, MRSA SA-1, *S. epidermidis* 11EMB, and *S. hominis* 13EMB) at 10⁶ CFU/mL, in a final volume of 200 µL per well, and incubated for overnight period at 37 °C. The MIC was considered as the lowest erythromycin concentration inhibiting the visible growth of the target strain after incubation at 37 °C for 24 h, mixed or not with the different dilutions of CFCS.

Cytotoxicity of Active Culture-Free Cell Supernatant from *Bacillus pumilus* ICVB403

The cytotoxicity assay was performed using HT-29 cells purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany) cultivated on 96-well tissue culture plates for 48–72 h, at 37 °C, in atmosphere containing 5% CO₂, until the formation of a continuous confluent cell culture on the bottom of each well. The active CFCS obtained after growth in Landy medium was tested at different dilutions 1/4 to 1/8 ratio in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medium without antibiotics and serum and were added to the corresponding HT-29 cells in the wells. Control DMEM medium containing diluted 1/4 unfermented Landy medium was also tested. Then the plate containing HT-29 cells and samples was incubated for 24 h at 37 °C, in atmosphere containing 5% CO₂. CCK-8 assay (Dojindo Molecular Technologies (Dojindo, Japan) based on the reduction of tetrazolium salt by active mitochondria was used to assess cell viability of the treated HT-29 cells. One hundred fifty microliters of DMEM containing 7.5 µL of CCK-8 reagent were added in each well and cells were incubated for 2 h. Plates were then read at 450 nm in a microplate reader spectrophotometer Xenius, Safas (Monaco). Results were expressed in % of basal growth observed with non-treated cells.

***Bacillus pumilus* ICVB403 Genome Sequencing and In silico Analysis**

The whole genome draft sequence of *B. pumilus* ICVB403 was analyzed using RAST, an online based tool, to predict open reading frames (ORFs) and annotate the genes (<http://rast.nmpdr.org>) [30]. The obtained data were analyzed using SEED database [31].

AntiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/#/start>) online software analysis was performed to unveil the presence of putative genes encoding NRPS (non-ribosomal peptides synthesis) and bacteriocins [32].

PCR Amplification and Sequencing of Putative Gene Coding for Bacteriocin

The putative bacteriocin gene identified by in silico from the whole genome analysis of *B. pumilus* ICVB403 was amplified by PCR method using specific primers forward 5'-TTAC CAAGCAATAACGGC-3' and reverse 5'-TGAC AGAAACAAGAAACGAA-3' and the following PCR program: 94 °C/3 min, 35 cycles at 94 °C/1 min, 55 °C/30 s and 72 °C/45 s, and finally 72 °C/10 min.

The resulting PCR products were purified using a Qiagen PCR purification kit (Hilden, Germany), and then sequenced at Eurofins (Hamburg, Germany). The sequences were blasted using BLASTn software of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Results

Staphylococcus Strains from Seawater Are Diverse

Staphylococcus strains isolated from seawater were identified using MALDI-TOF-MS analysis. Results showed that 8EMB and 27EMB isolates correspond to *S. warneri*, while 11EMB, 13 EMB, and 25EMB correspond to *S. epidermidis*, *S. hominis*, and *S. condimenti*, respectively. Remarkably, high Log (confidence score) ≥ 2.1 to 2.35 were observed for all strains (Supplementary material 1). The identification of *Staphylococcus* strains was confirmed by sequencing their 16S rDNA. Results showed scores comprised between 1982 and 2617, *e*-values of 0 and identification scores of 100% (Supplementary material 2).

Sensitivity of Staphylococcus Strains Isolated from Seawater to Antibiotics Is Strain-Dependent

Interpretation of antibiotics sensitivity was performed according to the EUCAST recommendations [29]. Thus, all *Staphylococcus* strains isolated from seawater showed resistance to amoxicillin and imipenem and sensitivity to gentamicin, amikacin, ciprofloxacin, moxifloxacin, levofloxacin, and chloramphenicol. Notably, *S. epidermidis* 11EMB strain and *S. hominis* 13EMB were resistant to erythromycin and other antibiotics such as tetracycline (Table 1), these two strains were then used for the checkerboard assay (Table 1).

Assessment of Antagonistic Activity of *Bacillus pumilus* ICVB403 Cell-Free Culture Supernatant

The cell-free culture supernatant (CFCS) of *B. pumilus* ICVB403 when grown in LB and nutrient broth media were devoid of antagonism. By contrast, the CFCS obtained after 48 h and 72 h of culture in Landy medium showed prominent

inhibition of staphylococcal strains except for *S. warneri* 8EMB which appeared insensitive (Table 2).

Erythromycin and Inhibitory Compound(s) Combinations Are Effective on *Staphylococcus* Strains

The MIC of erythromycin in combination with CFCS from unfermented Landy medium was evaluated to 32 µg/mL for MRSA ATCC43300 and MRSA-S1. By contrast, the MIC value was reduced to 8 µg/mL for both target strains when erythromycin was combined with active CFCS diluted four folds (Table 3). Similarly, combinations of erythromycin with CFCS diminished sensitivity of *S. epidermidis* 11EMB and *S. hominis* 13EMB strains. MIC of erythromycin was reduced to 4 µg/mL when the antibiotic was tested in combination with CFCS from *B. pumilus* ICVB403 diluted fourfold instead of 32 and 64 µg/mL respectively when the antibiotic was tested mixed with the negative control. (Table 2).

In silico Identification of Putative Genes Coding for Inhibitory Compound(s)

The size of the genome of *B. pumilus* ICVB403 was of 3,666,195 bp, including 22 contigs with a 42.0% G + C ratio, 3826 coding sequences, and 73 RNAs. Analysis of *B. pumilus* ICVB403 genome with AntiSMASH online software unveiled the presence of two putative genes coding for non-ribosomal peptides synthesis (NRPS), and for a bacteriocin. The analysis of NRPS genes revealed specifically sequence with seven amino-acids residues including glutamic acid (Glu/E), leucine (Leu/L), d-leucine (d-Leu/d-L), valine (Val/V), asparagine (Asp/N), d-leucine(d-Leu/L), and isoleucine (Ile/I), with initiating and terminator modules. To strengthen this analysis, further software and database as NapDos (<http://napdos.ucsd.edu/>) and Norine (<http://bioinfo.lifl.fr/norine/>) concluded to synthesis of surfactin A, which is a well-known lipopeptide. Additional experiments performed by mass spectrometry on the active CFCS obtained from the Landy medium upon growth of *B. pumilus* ICVB403 underpinned the presence of three lipopeptides of 1074, 1088, and 1102 Da belonging to surfactin family (Data not shown).

Furthermore, analysis with AntiSMASH software indicated as well the presence of putative gene coding for a bacteriocin from circularin-A/uberolysin family. This circular bacteriocin gene was also present in a strain of *B. pumilus* which genome sequence was deposited under the ID WP_099726571.1 number at the NCBI GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). These bacteriocins differ only in one amino-acid residue. Indeed, the alanine/A was changed to Lysine/K at the position 95 (Supplementary material 3). *Bacillus* strain, which genome sequence was deposited under the ID WP_034661404.1 at the NCBI GenBank database, contains a gene coding for a circular bacteriocin

Table 1 Sensitivity of *Staphylococcus* strains from seawater to different antibiotics

Strain	Code	Antibiotic									
		Amoxicillin	Imipenem	Gentamycin	Amikacin	Erythromycin	Azithromycin	Clarithromycin			
<i>S. warneri</i>	8 EMB	R	R	S	S	R	R				
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	R	R	S	S	R	S				
<i>S. hominis</i>	13 EMB	R	R	S	S	R	R				
<i>S. condimenti</i>	25 EMB	R	R	S	S	S	S				
<i>S. warneri</i>	27 EMB	R	R	S	S	R	R				

Strain	Antibiotic										
		Ciprofloxacin	Moxifloxacin	Levofloxacin	Vancomycin	Tetracycline	Chloramphenicol	Rifampin			
<i>S. warneri</i>	S	S	S	S	S	R	S	S			
<i>S. epidermidis</i>	S	S	S	S	S	R	S	R			
<i>S. hominis</i>	S	S	S	S	S	R	S	S			
<i>S. condimenti</i>	S	S	S	S	S	S	S	S			
<i>S. warneri</i>	S	S	S	S	R	R	S	S			

According to EUCAST 2018 antibiotic standards breakpoint table for *Staphylococcus* sp (<http://www.eucast.org>)

S sensitive phenotype, R resistant phenotype

Table 2 Antagonism of cell free culture supernatant from *Bacillus pumilus* ICVB403 towards different *Staphylococcus* strains

Target strains	Code	Nutrient broth supernatant (48 h)	Luria broth (Lb) supernatant (48 h)	Landy medium supernatant (48 h)	Landy medium supernatant (72 h)
<i>S. warneri</i>	8 EMB	–	–	–	–
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	–	–	+++	+++
<i>S. hominis</i>	13 EMB	–	–	+++	+++
<i>S. condiment</i>	25 EMB	–	–	+++	++
<i>S. warneri</i>	27 EMB	–	–	++++	++++
<i>S. aureus</i>	SA1	–	–	++	++
<i>S. aureus</i> SARM	ATCC 43300	–	–	++++	++++
<i>S. aureus</i> ATCC	25923	–	–	+++	++

Diameter of inhibition in mm: 0 (–); 0–1 (+); 1–3 (++); 3–6 (+++); 6–9 (++++); >9 (+++++)

from circularin-A/uberolysin family, with 100% sequence homology with the gene identified in *B. pumilus* ICVB403 genome during this study. Notably, the sequence of *B. pumilus* ICVB403 bacteriocin gene was confirmed by PCR upon design of specific primers.

The Active Fraction of *Bacillus pumilus* ICVB403 Is Devoid of Adverse Effects

The active CFCS from *B. pumilus* ICVB403 diluted four folds was able to potentiate the activity of erythromycin against the aforementioned *Staphylococcus* strains. This active fraction was assessed for its cytotoxicity on the human HT-29 adenocarcinoma cells. After 4 h of contact, the survival percentage of the cells exposed to the CFCS was estimated 100%, comparatively to the untreated control (Fig. 1). Moreover, this fraction did not exhibit any hemolytic activity on blood agar plates (data not shown).

Discussion

Taxonomically, *B. pumilus* belongs to the *B. subtilis* group [33], which contains the 5 following species: *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. alitudinis*, and *B. aerophilus*.

All these species are sharing similarity over 99.5% in their 16 rDNA sequences [34]. Besides terrestrial environments, *B. pumilus* are frequently isolated from marine environments [35, 36]. An earlier report unveiled the ability of *B. pumilus* strains to produce substances with antibacterial activity, including the first antibiotic pumilin [37]. The ability of the marine isolate *B. pumilus* SBUG 1800 was recently reported to produce 2,5-diketopiperazines (DKPs), a number of different pumilacids and bacteriolytic enzymes [38]. Another marine bacterium designated *B. pumilus* KMM 1364 produces a mixture of lipopeptide surfactin analogs [39]. In terms of bacteriocins, *B. pumilus* WAPB4 produces pumilicin 4, which is bactericidal to both MRSA and vancomycin-resistant enterococci [40]. Recent study from Ismail et al. [41] reported the inhibitory properties of *B. pumilus* P8 against a large number of target strains including staphylococci, and the anti-*Staphylococcus* activity was ascribed to secreted compounds which displayed sensitivity to heat but not to proteases treatments. Besides production of antimicrobial compounds, interests for bacilli are increasing as potential probiotics for aquaculture. The accumulation of scientific data advocated the probiotic claims of *B. subtilis*, *B. licheniformis*, and *B. pumilus* isolates [9, 42, 43].

Table 3 Combination of erythromycin with ICVB403 cell-free culture supernatant (CFCS)

Target strains	Code	Erythromycin MIC (μg/mL)	Erythromycin MIC (μg/mL) + <i>B. pumilus</i> ICVB403 Landy supernatant
<i>S. epidermidis</i>	11 EMB	32	4
<i>S. hominis</i>	13 EMB	64	4
<i>S. aureus</i>	SA1	32	8
<i>S. aureus</i> SARM	ATCC 43300	32	8

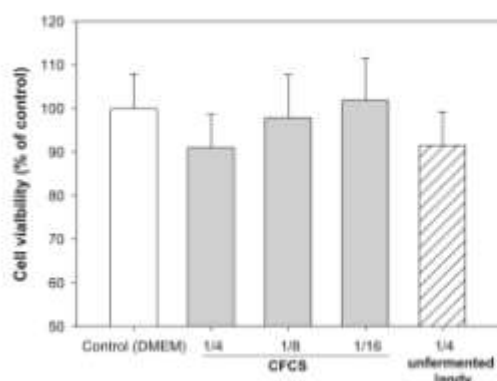


Fig. 1 Zidour et al. 2018 viability of HT-29-MTX after 4 h of contact with the cell-free culture supernatant in Landy medium diluted four, eight, and sixteen folds in DMEM and control DMEM medium containing 1/4 of unfertilized Landy medium. The one way ANOVA analysis showed that there is no statistical difference between groups ($p = 0.463$)

Many *B. pumilus* strains were described for their beneficial claims and possible use in aquaculture to control bacterial diseases and diminish antibiotic use [43, 44].

The data from this study sheds light on the potential of marine *B. pumilus* ICVB403 to produce on Landy medium [45] safe and potent extracellular inhibitory compounds characterized as lipopeptides and bacteriocin. The lipopeptides presumably produced by this strain were characterized by mass spectrometry analysis, while the bacteriocin production was evidenced by different tests including sensitivity to proteinase K, lipase, stability at different pHs, and temperature ranges.

The *in silico* genome analysis of *B. pumilus* ICVB403 guided identification of two putative genes coding for surfactin A, a lipopeptide containing seven amino-acids, and a bacteriocin belonging to circularin A/uberolysin bacteriocin family, respectively. The open reading frame coding for bacteriocin is almost similar to that from *B. pumilus* 51_5il strain and referenced WP_099726571.1 in the GenBank. The analysis of the amino acid sequences revealed one amino acid different between these two bacteriocins, consisting in the replacement of lysine/K, by alanine/A at the position 95. The *B. pumilus* ICVB403 genome analysis revealed a gene encoding surfactin lipopeptide. Nevertheless, the mass spectrometry analysis data obtained from CFCS were different from that expected for surfactin. Indeed, three lipopeptides with different masses were obtained from CFCS analysis. They certainly correspond to surfactin isoforms, which production is largely described [46–48]. These isoforms undergo amino

acid substitution under environmental constraints, as medium amino acids composition [47].

Surfactin family is one of the main studied lipopeptides group [49]. Surfactin is well known for its surfactant and antifungal activities [50]. Surfactin and its analogues were recently described as potent antimicrobial agents with antagonism against *S. aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* strains [51, 52].

The bacteriocin belongs to a particular family of circular bacteriocins, which include circularin A/uberolysin peptides. Circularin A is a circular antimicrobial peptide of 69 amino acids produced by *Clostridium beijerinckii* ATCC25752 [53], whereas uberolysin is a cyclic bacteriocin produced of 7048 Da produced by *Streptococcus uberis* [54]. This last family includes as well the well-known enterocin AS-48 produced by *Enterococcus faecalis* AS-48 [55], and carnocyclin A produced by *Carnobacterium maltaromaticum* [56]. The mature forms of these cyclic bacteriocins are circularized peptides of about 70 amino acids. The cyclic bacteriocins enterocin AS-48, carnocyclin A, and uberolysin displayed antagonism mainly active against Gram-positive bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *S. aureus* [54, 56, 57].

Here we addressed the anti-staphylococcal properties of *B. pumilus* ICVB403, a strain from marine origin recently isolated in our laboratory [27]. Besides direct *in vitro* effects on *Staphylococcus* strains, the CFCS from *B. pumilus* ICVB403 grown on Landy medium was able to potentiate the erythromycin activity. *Staphylococcus* is a substantial contaminant of gilthead population, and some of the strains isolated were multi-resistant for antibiotics such as erythromycin [58].

In the light of the data obtained, future investigations will be focusing on the mechanism of action and molecular characterization of these antimicrobial peptides, mainly bacteriocin in order to decrypt its activity against *Staphylococcus* strains. Then, the effectiveness of these molecules will be considered for long-term project.

Conclusion

In conclusion, this study shed light on the inhibitory activity of *B. pumilus* ICVB403 towards several *Staphylococcus* strains. Genome scanning underpinned the presence of two ORFs coding for surfactin A and a circular bacteriocin belonging to circularin A/uberolysin family. Potential uses of AMPs are among other alternatives currently considered to face antibiotic spread and tackle bacterial resistance around the world [59]. Purification and characterization of this bacteriocin will be our next goal.

Acknowledgements We would like to thank Dr. Mathieu Duban and Dr. Gabrielle Chataignère for their helpful assistance in the genome analysis and mass spectrometry analysis. We thank past and present members of the group of LOG COPEFISH team (SS) for their involvement in maintaining several cultures of copepods and algae and the Communauté d'Agglomération du Boulonnais (CAB) for supporting the implementation of a copepod-rearing pilot project (agreement Lille University-CAB).

Funding information This work is partly supported by CPER/FEDER Alibiotech grant (2016-2020) from la Région des Hauts-de-France. This work is a contribution to the project CPER 2014-2020 MARCO funded by the French government and the region Hauts-de-France.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval All authors of this paper have read and approved the final version submitted. The contents of this manuscript have not been copyrighted or published previously. No procedures performed in these studies have been conducted in human participants and/or animals.

References

- Huss HH (2004) Fresh fish quality and quality changes. In: FAO Fisheries Technical Paper No. 348. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, pp 103–109
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) (2016) La situation mondiale des pêches et aquaculture.
- Biji KB, Ravishankar CN, Venkateswarlu R, Mohan CO, Gopal TK (2016) Biogenic amines in seafood: a review. *J Food Sci Technol* 53(5):2210–2218
- Rambla-Alegre M, Miles CO, de la Iglesia P, Fernandez-Tejedor M, Jacobs S, Sioen I, Verbeke W, Samdal JA, Sandvik M, Barbosa V, Tediosi A, Madorran E, Granby K, Kotterman M, Calis T, Diogene J (2018) Occurrence of cyclic imines in European commercial seafood and consumers risk assessment. *Environ Res* 161:392–398
- Davis AR, Robinson B (2003) Incidence of food borne pathogens on European fish. *Food Control* 12:67–71
- Hosseini H, Misaghi A (2004) Incidence of *Vibrio* spp. in seafood caught of south coast of Iran. *Food Control* 8:91–98
- Chintagari S, Hazard N, Edwards G, Jadeja R, James M (2017) Risks associated with fish and seafood. *Microbiol Spectr* 5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PFS-0013-2016>
- Elbushiri S, Purveen S, Schwarz J, Rippen T, Jahncke M, DePaola A (2018) Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: a review. *Food Microbiol* 70:85–93
- Nayak SK (2010) Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol* 29:2–14
- Wang AR, Ran C, Ringo E, Zhou ZG (2017) Progress in fish gastrointestinal microbiota research. *Rev Aquacul* 2017:626–640. <https://doi.org/10.1111/raq.12191>
- Feldhusen F (2004) The role of seafood in bacterial food borne diseases. *Microbes Infect* 2:1651–1660
- Edwards AM, Massey RC, Clarke SR (2012) Molecular mechanisms of *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization. *Mol Oral Microbiol* 27:1–10
- Alyah MA, Zamri-Saad M, Siti-Zahrah A (2010) First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Microbiol* 144:502–504
- Soliman MK, Ellakany HF, Gafar AY, Elbially AK, Zaki MS, Younes AM (2014) Epidemiology and antimicrobial activity of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during an outbreak in Egypt. *Life Sci J* 11(10):1245–1252
- Arfathery N, Mirshafiey A, Abedinehtab TP, Zeinolabedinizamani M (2015) Study of the prevalence of *Staphylococcus aureus* in marine and farmed shrimps in Iran aiming the future development of a prophylactic vaccine. *Procedia Vaccinol* 9:44–49
- Pridgen J, Klesius PH (2012) Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews* 2012(048)
- Rigos G, Troisi GM (2005) Antibacterial agents in Mediterranean finfish farming: a synopsis of drug pharmacokinetics in important euryhaline fish species and possible environmental implications. *Rev Fish Biol Fisher* 15(1–2):53–73
- Roda RM, Ibrahim RE, Ahmed ENG, El-Bouhy ZM (2013) Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Egypt J Aquat Res* 39(4): 241–248
- Cham KV, Thakuria D, Kumar S (2018) Antimicrobial peptides of buffalo and their role in host defenses. *Veterinary world* 11:192–200
- Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF (2000) The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191:259–270
- Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Gossens H, Pittet D (2012) Ready for a world without antibiotics? The penicillins antibiotic resistance call to action. *Antimicrob Resist Infect Control* 14:1–11
- Drider D, Rebuffat S (2011) Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications. Springer Editions NY-USA 2011, 451pp
- Abriouel H, Franz CM, Omar NB, Gálvez A (2011) Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiol Rev* 35: 201–232
- Mondol MAM, Shin HJ, Islam MT (2013) Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Mar Drugs* 11(8):2846–2872
- Naghmouchi K, Belguesmia Y, Baah J, Teather R, Drider D (2011) Antibacterial activity of class I and IIa bacteriocins combined with polymyxin E against resistant variants of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Res Microbiol* 162(2):99–107
- Naghmouchi K, Baah J, Hober D, Jouy E, Rubrecht C, Sané F, Drider D (2013) Synergistic effect between colistin and bacteriocins in controlling Gram-negative pathogens and their potential to reduce antibiotic toxicity in mammalian epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 57(6):2719–2725
- Zidour M, Chevalier M, Belguesmia Y, Cudennee B, Grand T, Drider D, Souissi S, Flahaut C (2017) Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa* copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio anguillarum* and other pathogenic strains. *Front Microbiol* 8:1919
- Drigo L, Mattina R, Nicola L, Rodighiero V, De Vecchi E (2011) Macrolide resistance and *in vitro* selection of resistance to antibiotics in *Lactobacillus* isolates. *J Microbiol* 49:651–656. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0470-1>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2018) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 8.0, 2018. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeLongh M, Disz T, Edwards RA, Formosa K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeck RA, McNeil LK, Paarmann D,

- Paccian T, Parello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O (2008) The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75
31. Overbeek R, Begley T, Butler RM, Choudhuri JV, Chuang HY, Cohoon M, de Crécy-Lagard V, Diaz N, Disz T, Edwards R, Fonstein M, Frank ED, Gerdes S, Glass EM, Goesmann A, Hanson A, Iwata-Reuyl D, Jensen R, Janshidi N, Krause L, Kubal M, Larsen N, Linka B, McHardy AC, Meyer F, Neuweger H, Olsen G, Olson R, Osterman A, Portnoy V, Pusch GD, Rodionov DA, Rückert C, Steiner J, Stevens R, Thiele I, Vassieva O, Ye Y, Zagnitko O, Vonstein V (2005) The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res* 33:5691–5702
 32. Weber T, Blin K, Daddala S, Krug D, Kim HU, Braccoleri R, Braccoleri R, Lee SY, Fischbach MA, Müller R, Wohlleben W, Breitling R, Takano E, Medema MH (2015) antiSMASH 3.0—a comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res* 43(W1):W237–W243
 33. Berkeley R, Heyndrickx M, Logan N, De Vos P (2008) Applications and systematics of *Bacillus* and relatives. Wiley-Blackwell, Hoboken 133 pp
 34. Liu Y, Lai Q, Dong C, Sun F, Wang L, Li G, Shao Z (2013) Phylogenetic diversity of the *Bacillus pumilus* group and the marine ecotype revealed by multilocus sequence analysis. *PLoS One* 8:e80097
 35. Miranda CA, Martins OB, Clementino MM (2008) Species-level identification of *Bacillus* strains isolated from marine sediments by conventional biochemical, 16S rRNA gene sequencing and inter-rRNA gene sequence lengths analysis. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93:297–304
 36. Etoumi B, Raddadi N, Borin S, Daffonchio D, Boudabous A, Cherif A (2009) Diversity and phylogeny of culturable spore-forming bacilli isolated from marine sediments. *J Basic Microbiol* 49(Suppl 1):S13
 37. Bhat DS (1955) Pumilin, a new antibiotic from *Bacillus pumilus*. *Nature* 175(4462):816–817
 38. Bruck C, Mikolasek A, Schlueter R, Otto A, Becher D, Wegner U, Albrecht D, Riedel K, Schauer F (2015) Antibacterial metabolites and bacteriolytic enzymes produced by *Bacillus pumilus* during bacteriolysis of *Arthrobacter citreus*. *Mar Biotechnol* (NY) 17: 290–304
 39. Kalinovskaya NI, Kuznetsova TA, Ivanova EP, Romanenko LA, Voinov VG, Huth F, Laatsch H (2002) Characterization of surfactin-like cyclic decapeptides synthesized by *Bacillus pumilus* from ascidian *Haloscyndia aurantium*. *Mar Biotechnol* (NY) 4: 179–188
 40. Aunpad R, Na-Bangchang K (2007) Pumilicin 4, a novel bacteriocin with anti-MRSA and anti-VRE activity produced by newly isolated bacteria *Bacillus pumilus* strain WAPB4. *Curr Microbiol* 55:308–313
 41. Ismail-Ben Ali A, El Bour M, Ktari L, Bolhuis H, Ahmed M, Boudabous A, Stal LJ (2012) *Jania rubens* associated bacteria, molecular identification and antimicrobial activity. *J Appl Phycol* 24:525–534
 42. Olmos J, Paniagua-Michel J (2014) *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture. *J Microb Biochem Technol* 6:361–365
 43. Sreenivasulu P, Suman Joshi DSD, Narendra K, Venkata Rao G, Krishna Satya A (2016) *Bacillus pumilus* as a potential probiotic for shrimp culture. *Int J Fish Aquat Stud* 4:107–110
 44. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, Gutierrez M, Lane JA, Hickey RM, Lawlor PG, Gardiner GE (2014) *In vitro* assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Mar Drugs* 12:2422–2445
 45. Landy M, Warren GH, Roseman SB, Golio LG (1948) Bacillomycin, an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proc Soc Exp Biol Med* 67:539–541
 46. Naruse N, Taniyama O, Kohara S, Kamei H, Miyaki T, Konishi M, Oki T (1990) Pumilicidin, a complex of new antiviral antibiotics. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity. *J Antibiot (Tokyo)* 43:267–280
 47. Grangemard J, Peypoux F, Wallach J, Das BC, Labbé H, Caille A, Genest M, Maget-Dana R, Ptak M, Bonmatin JM (1997) Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new ionolactyl-rich surfactins. *J Pept Sci* 3:145–154
 48. Jennil N, Manasa A, Rabanal F, Ben Ayed H, Hmidet N, Nouri M (2017) Structural characterization and identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* DCS1 strain. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 1060:374–386
 49. Arima K, Kakinuma A, Tamura G (1968) Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun* 31:488–494
 50. Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, Yu ZL (2008) Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Lett Appl Microbiol* 47:180–186
 51. Ndlovu T, Rautenbach M, Vosloo JA, Khun S, Khun W (2017) Characterisation and antimicrobial activity of biosurfactant extracts produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a wastewater treatment plant. *AMB Express* 7:108
 52. Perez KJ, Viura J, dos S, Lopes FC, Pereira JQ, dos Santos DM, Oliveira JS, Velho RV, Crispim SM, Nicolli JR, Brandelli A, Nardi RMD (2017) *Bacillus* spp. isolated from Pupa as a source of biosurfactants and antimicrobial lipopeptides. *Front Microbiol* 8:61
 53. Kawai Y, Kempertman R, Kok J, Saito T (2004) The circular bacteriocins gassericin A and circularin A. *Curr Protein Pept Sci* 5:393–398
 54. Wirawan RE, Swanson KM, Kleffmann T, Jack RW, Tagg JR (2007) Uberolysin: a novel cyclic bacteriocin produced by *Streptococcus uberis*. *Microbiology* 153:1619–1630
 55. Gálvez A, Maqueda M, Valdivia E, Quesada A, Montoya E (1986) Characterization and partial purification of a broad spectrum antibiotic AS-48 produced by *Streptococcus faecalis*. *Can J Microbiol* 32:765–771
 56. Martín-Viñader LA, van Belkum MJ, Garneau-Tsodikova S, Whittall RM, Zheng J, McMullen LM, Vederas JC (2008) Isolation and characterization of carmacyclin A, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. *Appl Environ Microbiol* 74:4756–4763
 57. Ananou S, Valdivia E, Martínez Bueno M, Gálvez A, Maqueda M (2004) Effect of combined physico-chemical preservatives on enterocin AS-48 activity against the enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* CECT 976 strain. *J Appl Microbiol* 97:48–56
 58. Arslan S, Özdemir F (2017) Molecular characterization and detection of enterotoxins, methicillin resistance genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from fish and ground beef. *Pol J Vet Sci* 20:85–94
 59. Rios AC, Moutinho CG, Pinto FC, Del Fiol FS, Jozala A, Chaud MV, Vila MM, Teixeira JA, Balção VM (2016) Alternatives to overcoming bacterial resistances: state-of-the-art. *Microbiol Res* 191:51–80

**Population response of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* to
bioaccumulation of trace metals**

Mahammed Zidour¹, Zakia Boubechiche², Yen-Ju Pan³, Capucine Bialais³, Benoit Cudennec¹,
Thierry Grard¹, Djamel Drider¹, Christophe Flahaut¹, Baghdad Ouddane⁴, Sami Souissi^{3*}

¹Univ. Lille, Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Artois, EA 7394, ICV Charles Violette F-
59000, Lille, France

²Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et l'Aménagement du Littoral, 16000
Alger, ALGÉRIE.

³Université de Lille, CNRS, Université du Littoral Côte d'Opale, Laboratoire d'Océanologie et
de Géosciences, UMR 8187 LOG, Wimereux, France

⁴LASIR

Corresponding author : Sami Souissi

Address : Université de Lille, CNRS, Université du Littoral Côte d'Opale, Laboratoire
d'Océanologie et de Géosciences, UMR 8187 LOG, 28 Avenue Foch, BP 80 62930,
Wimereux, France.

Email: sami.souissi@univ-lille.fr

Tel: +33 3 21 99 29 08

26

27 **Abstract**

28 In this study, we evaluated the acute toxicities of metals cadmium (Cd), copper (Cu) and nickel
29 (Ni) to a widely-distributed copepod *Eurytemora affinis* isolated from the Seine estuary
30 (France). Both sexes of adult *E. affinis* were exposed separately to the three metals at
31 concentration gradients to determine 50% lethal concentration (LC50). After 96 hours of
32 exposure, both males and females had higher toxic sensitivity to Cu (male LC50: 25.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$
33 and female LC50: 38.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) than to Ni (male LC50: 90.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and female 161.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$)
34 and Cd (male LC50: 127.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and female LC50: 90.04 $\mu\text{g.L}^{-1}$). To assess the first time, the
35 effect of metal bioaccumulation at population scale, late copepodite and adult copepods (>200
36 μm) were collected and exposed to each metal at the concentration of 1/3 LC50, and to their
37 mixture during 144h without feeding. The Cd concentration consistently increased along time
38 till the end of experiment, while the Ni and Cu concentrations reached a plateau after 24h and
39 72h exposure, respectively. The results revealed that the copepods could accumulate higher
40 quantity of Cu than Ni and Cd either in the treatment alone (0.58 $\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$) or in the three-metal
41 mixture (0.72 $\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$) after 50% of exposure time (72h). The number of individuals decreased
42 in the copepod populations except the Cd treatment, where the number of nauplii increased. In
43 addition, all treatments of metal exposure negatively affected bacterial load in the copepod
44 cultures, where the Cu treatment showed a remarkable effect compared with Cd and Ni
45 treatment did.

46

47

48

49

50 **Keywords:** Bioaccumulation, Copepods, *Eurytemora affinis*, LC50, Trace metals, Toxicity.

51

52 **1. Introduction**

53 Aquatic environments are often contaminated by various metallic elements released by
54 industries, agriculture and urban communities (Thévenot et al., 2009). Copper (Cu), cadmium
55 (Cd) and nickel (Ni) are common contaminations in waters (Rollin and Quiot, 2006; Amiard-
56 Triquet et al. 2008). Some metals, such as Cu and Ni are essential functional elements for
57 organisms, because of their participations in many metabolic pathways at low concentrations
58 (Simkiss and Taylor, 1995). However, these metals become toxic when they exceed a threshold
59 concentration. On the other hand, Cd has no established metabolic role and does not appear to
60 be biologically essential or beneficial for living organisms (Berasategui et al., 2018; Florence et
61 al., 1994; Jaishankar et al., 2014), although it is reported to be a substitution of zinc (Zn) in Zn-
62 deficient enzymatic systems of plankton (Price and Morel 1990; Lane and Morel 2000). This
63 non-essential metal is actually considered one of the most toxic metals for aquatic organisms
64 (Howard and Hacker, 1990).

65 In addition to the acute adversities caused by excessive metal concentration in water or
66 sediment, these pollutants are also endowed with a high potential of bioaccumulation
67 (Mohammed et al., 2011; Pavlaki et al., 2017). The bioaccumulation of trace metals in
68 organisms is a useful natural process that keeps metals at required levels for physiological
69 functions. Nevertheless, the bioaccumulation can reach critical levels when organisms are
70 excessively exposed to both essential and non-essential metals, which can cause adversities in
71 growth, reproduction and survival (Verschoor et al., 2012). For years, copepods have been used
72 as ideal experimental models in ecotoxicological studies because of their ecological role, short
73 life cycle, and high fecundity (Jiang et al., 2007, Raisuddin et al., 2007). They can be an
74 important factor in the processes of bioaccumulation and biomagnification of toxic pollutants in
75 the aquatic food web (Fisher et al., 2000; Watras et al., 1998). Most of the attention was

specifically paid for assessing the metal toxicity of adult copepods; moreover, a recent study has reported the sex-specific metal toxicity of two copepod species (Kadiene et al., 2017). However, the metal toxicity of other life stages is poorly studied, although the metal contaminations could affect differently the zooplankton at various developmental stages in natural environments (Jiang et al., 2007).

The calanoid copepod *Eurytemora affinis* (Poppe 1880) is characterized by a wide geographical distribution in the temperate estuaries from Europe to North America (David et al., 2005; Quintin 2014; Winkler et al., 2011). In particular, this species is dominant in the Seine estuary (France), where a variety of metallic pollutions exists (Dauvin, 2008). Therefore, here we evaluated the acute toxicity of Cd, Cu and Ni to both sexes of *E. affinis* through a dose-dependent study. In addition, the bioaccumulations of Cd, Cu and Ni and their effects on aerobic flora of the *E. affinis* population were reported for the first time. To simulate a copepod population similar to the wild, various developmental stages were exposed to sublethal concentrations of the three metals alone and to their mixture. Our study aimed to investigate the toxicokinetics of the three metals when *E. affinis* encountered such pollutants alone or their mixture, and to implicate the potential role of this copepod species as a promising bioindicator.

2. Material and Methods

2.1. Copepod culture

The copepod *E. affinis* was isolated from the Seine estuary in September 2014, then the mono-species culture was established at the Wimereux Marine Station and maintained at laboratory conditions as recently described by Souissi et al. (2016). Natural seawater was pumped from the English Channel near the Wimereux Marine Station (France), then 1µm-filtered and diluted with distilled water to salinity 15 for copepod culture. The culture was gradually increased until a final production volume of 300L in a customized acrylic tank, that was maintained in a

climate-controlled room programmed at 18 ± 2 °C and a photoperiod of 12h: 12h light: dark cycle (2500 lux). The microalga *Rhodomonas* sp. was provided as food according to Arias's method (Arias et al., 2016).

2.2. Chemical solutions

The stock solutions of Cu, Ni, and Cd were obtained from LASIR Laboratory, University of Lille (France), where the metal salts of CuCl_2 , $\text{NiSO}_4(6\text{H}_2\text{O})$ and CdCl_2 (99.9% purity, Merck, Darmstadt, Germany) were dissolved in ultrapure water as stock solutions. Then the appropriate volumes of stock solutions were introduced to contaminate the copepod culture water (salinity 15) at designed concentrations.

2.3. Acute toxicity tests

The acute toxicity tests were performed according to the protocol described by Tlili et al. (2016) and Kadiene et al. (2017). Eighty milliliter of contaminated culture water (salinity 15) at different concentrations (Cd: 0, 40, 80, 150, 220 and $360 \mu\text{g.L}^{-1}$; Ni: 0, 50, 150, 250, 350 and $500 \mu\text{g.L}^{-1}$; Cu: 0, 15, 20, 40, 220 and $400 \mu\text{g.L}^{-1}$) were prepared in 140-mL beakers. Three groups of male and female *E. affinis* ($n = 25$) were sorted under a stereomicroscope (SZX9; Olympus, Tokyo, Japan) as replicates for each treatment. The characteristics of the culture water were measured (dissolved oxygen: $8 \pm 1 \text{ mg.L}^{-1}$; temperature: $18 \pm 2^\circ\text{C}$; pH 8.4 ± 0.2 and salinity: 15), and the beakers were kept in an incubator (MLR 351, Panasonic, Tokyo, Japan) programmed at 18°C with a photoperiod of 12h: 12h light: dark cycle for 96h. The mortalities were documented under the stereomicroscope at time interval, and 50% lethal concentrations (LC50) were calculated using the Probit analysis method described by Tlili et al. (2016).

2.4. Bioaccumulation tests

Accumulation kinetics was monitored during a 144h exposure of copepods to the sublethal concentrations of Cd, Ni and Cu alone or to the three-metal mixture without food supply. The exposure doses were ca. 1/3 of 96h-LC50 for metal treatment alone (Cd: 32 µg.L⁻¹, Cu: 7 µg.L⁻¹ and Ni: 32 µg.L⁻¹) and three-metal mixture. Groups of ca. 1500 copepods at late developmental stages (>200 µm) were collected from the stock culture and transferred in five 10 L beakers containing 8L culture water (salinity 15) with moderate aeration. Then four beakers were contaminated with different metal treatments at the designed concentrations, and one beaker was set as control. The beakers were maintained in the climate-controlled room (18 ± 2° C). Samples of 500 mL culture were collected after homogeneous mixings of the populations after different exposure times (0h, 4h, 24h, 48h, 72h, 96h, and 144h), and filtered through cellulose nitrate filters of 0.22 µm porosity (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany). The copepods retained on filters were dried at 60°C for 72h and weighed for further trace metals analysis. Meanwhile, fifty milliliter of the filtrate (culture water) was collected and preserved immediately with 30 µL of nitric acid (HNO₃, 1g.L⁻¹) for the further analysis of residual metal concentrations (dissolved fraction). The individual numbers of the populations were volumetrically estimated before metal contamination and after 72h of exposure.

The accumulation indices, representing the accumulation constants by the dissolved route (K_u), were calculated from the accumulation kinetics carried out according to the model described by Tlili *et al.* (2016):

$$C_{in} = K_u C_w t$$

C_{in} is the concentration of metals in the tissues (µg.g⁻¹ dw);

K_u is the absorption rate constant (Lg⁻¹.d⁻¹);

C_w is the concentration of metal in water (µg.L⁻¹);

t is the exposure time (days).

150

151 2.5. Trace metals analysis

152 Trace metal analysis was performed as described by Ouddane et al. (1990) with minor
153 modifications. Briefly, the dried filters containing the copepods are digested for 24h at 100°C
154 using 1 mL of nitric acid (Merck suprapur, 65%) and 3 mL of hydrochloric acid (Merck
155 suprapur, 33%) in Teflon tubes. The solutions were then filtered through cellulose nitrate
156 filters, diluted to a final volume of 10 mL with ultrapure water and stored at 4°C until analysis.
157 To assess the residual metal concentrations in the culture water, the preserved filtrates (50 mL
158 culture water added 30 µL HNO₃) were directly analyzed without a prior treatment. Elemental
159 concentrations were measured in triplicate against multi element standards using an inductively
160 coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES; Vista Pro, axial view, Varian,
161 Australia). The data quality was assessed using the certified reference materials.

162

163 2.6. Microbial analysis

164 In order to evaluate the effects of the metal treatments on microbial flora of the copepod
165 cultures, 100 mL of copepod cultures were collected at different times (4h, 48h, 96h and 144h)
166 and analyzed following the procedure described in Zidour et al. (2017). The samples containing
167 the copepods and culture water of every treatment (control, Cd, Cu, Ni and mixture) were
168 homogenized for 3 min using an Ultra-turrax Ika-T25D (Imlab, Lille, France) and a dilution
169 series of 10⁻¹ to 10⁻⁸ b was pre-prepared in SSB medium (1 g of tryptone, 8.5 g of sodium
170 chloride dissolved in 1 L of distilled water). Inoculum of each dilution was plated on nutrient
171 agar and colony counting was done after 48h incubation at 25°C.

172

173 2.7. Statistical analysis

All results were expressed as means $\pm$ standard deviation (SD) from triplicate. The data were compared by one way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, using the R Commander statistics program (R64.3.43). The differences were considered significant at $p < 0.05$. The kinetics of bioaccumulation of each heavy metal was directly fitted to the appropriate model by using Curve Fitting toolbox of Matlab Software (Mathworks Inc., vers 7.2).

3. Results

3.1. Acute toxicities of trace metals

The LC50 values of Cd, Cu and Ni for both sexes of *E. affinis* are illustrated in Table 1. The result shows that the sensitivity in males and females of *E. affinis* increased along exposure time, and it varied in the two sexes among treatments. After 96h exposure, the males showed the highest sensitivity to Cu (LC50: 25.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) followed by Ni (LC50: 90.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and Cd (LC50: 127.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$) while females were more sensitive to Cu (LC50: 38.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$), followed by Cd (LC50: 90.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and Ni (LC50: 161.0 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Notably, the females are about 1.5 times more sensitive to Cd than males while males are about 1.8 times more sensitive to Ni than females.

3.2. Bioaccumulation Kinetics

3.2.1. Copepod bioaccumulation

The kinetic curves of metals accumulation in copepods during the exposure period of 144h are presented in Figure 1. In the case of Cd (Figure 1A), a quasi-linear accumulation trend was observed in both treatments (Cd alone and three-metal mixture), where the Cd concentrations in copepods were 15.0 $\mu\text{g. g}^{-1}$ dry weight (dw) and 9.45 $\mu\text{g. g}^{-1}$ dw at the end of exposure, respectively. The accumulation induce of Cd in the treatment alone (0.0831 $\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$) was also greater than in the three-metal mixture (0.0670 $\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$). The Cu accumulation (Figure 1B)

gradually increased over time for both Cu treatments alone and three-metal mixture. However, it reached a plateau after 72h of exposure. The Cu accumulation rate was greater in the three-metal mixture than in the Cu treatment alone with accumulation indices of $0.7178 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ and $0.5755 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$, respectively (Table 2). The highest Cu concentrations in the copepods were $67.66 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ dw}$ in the Cu treatment alone and $50.19 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ dw}$ in the three-metal mixture, at the end of the experiment, a slight decrease is observed.

Regarding the kinetics of Ni accumulation, treatments showed different accumulation patterns with significance ($p < 0.01$). In the case of Ni treatment alone, Ni concentration increased rapidly in the copepods after 24h exposure ($22.83 \mu\text{g.g}^{-1} \text{ dw}$) than it kept slightly increasing over the exposure time until reaching their maximum. On the other hand, Ni concentration (insert data here) reached a plateau after 24h of exposure in the three-metal mixture (Figure 1C). The difference in Ni accumulation rates (Ni treatment alone: $0.0845 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$; three-metal mixture: $0.0182 \text{ L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$) is correlated with the difference in the accumulation indices (Table 2). The bioaccumulation capacity was calculated as the ratio of the metal concentration of the copepods reached in each treatment at 144h to the concentration in the control. In both metal treatments alone or three-metal mixture, *E. affinis* showed significant bioaccumulation capacities of Cd (30 and 18.9, respectively) than Cu (4.8 and 6.5) and Ni (3.3 and 1.7).

3.2.2. Residual metal concentrations

The concentrations of residual metal in the culture water of four treatments were measured. In all treatments, the residual concentrations tend to decrease over exposure time (Figure 2). The percentage of decreases in concentrations are 22.07%, 31.96% and 43.71% for Cd, Cu and Ni treatments alone, respectively. On the other hand, the lower percentages of decrease of Cd (12.22%), Cu (32.84%) and Ni (25.40%) were all found in the treatment of three-metal mixture.

224

225 3.2.3. Developmental stage responses to trace metals

226 The copepod populations were affected differently by various treatments (the metal alone and
227 their mixture) after 50% of the exposure time (72 h). The number of nauplii in the Cu treatment
228 alone was significantly lower than the control ($p < 0.001$) with a difference of 47%. Notably,
229 the number of nauplii in Cd treatment alone was higher than the control. The numbers of
230 copepodites in metal treatments were significantly lower ($p < 0.001$) than the control, and the
231 Cu treatment alone showed the highest decreasing rate. As shown in Figure 3B, compared to
232 the control group, the pre-adult group showed clear significant differences of 58%, 64% and
233 66% for Ni, Cu and Cd, respectively. In addition, with the exception of Cd, where the number
234 of individuals is significantly lower than the control ($p < 0.001$), the adult group such as the
235 nauplii and copepodites groups are less affected than pre-adults by the different treatments.
236 Interestingly we found that the mixture treatment did not show any additive effects, on the
237 contrary the stage structure was more or less the same as in a single trace metal treatment
238 (Figure 3).

239

240 3.2.4. Sex-specific responses to trace metals

241 As shown in Figure 4A and 4B, pre-adult females exposed to Ni and Cu during 50% of
242 exposure time were significantly lower compared to pre-adult males (two left histograms,
243 Figure 4A). The difference, compared to the control group (data not shown here), in number of
244 individuals were 74% and 79%, respectively while adult females exposed to Ni showed no
245 significant differences ($p > 0.05$). Comparative analysis of alone-metal- and mixture-treatment
246 showed that the decrease in the number of pre-adult individuals of both sexes was significantly
247 lower ($p < 0.001$) in the treatment of the mixture than in the alone metal treatments compared
248 to the control group.

For adults of both sexes, different responses were observed. The number of adult females was significantly lower in the treatment case with Cd and Cu alone ($p < 0.001$). The number of males showed a significant decrease ($p < 0.001$) in the mixture treatment compared to treatments with Cu and Ni alone (unlike Cd). For ovigerous females, after 72h of exposure to alone Cd and Ni, the number of individuals decreased considerably compared to the control while no effect was observed in the case of mixture treatment.

3.2.4. Total aerobic flora counting

Figure 5 shows that the metal treatments could negatively affect the temporal evolution of total aerobic flora in the copepod cultures. The number of bacteria decreased obviously along exposure time. These decreases are significantly different between the three metal treatments alone, the three-metal mixture and also the control ($p < 0.01$). However, we note that the microbial load of the copepods exposed to Cd alone increased slightly at the beginning of the experiment and reached to a value of 6.74 ± 0.25 Log of bacteria number mL^{-1} after 48h exposure, then it decreased until the end of the experiment. In the Ni treatment alone, a progressive decrease in bacterial burden was observed over time, and the final number of total flora was 5.27 ± 0.41 Log of bacteria number mL^{-1} . In contrast to the patterns observed in Cd and Ni treatments, the number of bacteria in the Cu treatment dramatically decreased to 5.93 ± 0.36 Log of bacteria number mL^{-1} after 48h exposure. This bacterial density remained generally stable until the end of experiment. Regardless of the exposure time, the three-metal mixture seemed to have less effect than the other treatments. Bacterial burden gradually decreased to a final value of 6.2 ± 0.39 Log of bacteria number mL^{-1} .

4. Discussion

4.1. Lethal concentration

Trace metals are ubiquitous in various natural environments and can be toxic for marine organisms at high concentrations. Therefore, determination of the lethal concentration is an essential step in all toxicokinetic studies. Our results revealed that the male and female *E. affinis* had high tolerance to Cd and Ni after 96h of exposure. Compared with the studies addressed on *E. affinis* (Table 2), the Cd 96h-LC50 determined in our study is relatively higher than the previous observations. Although no study has reported the acute toxicity of Ni on *E. affinis*, our results found in male ($90.0 \mu\text{g L}^{-1}$) and female ($161.0 \mu\text{g L}^{-1}$) are relatively lower than those reported on other copepod species (Barka et al., 2001; Tlili et al., 2016; Taylor, 1981). On the other hand, the low LC50 value suggests that the *E. affinis* had relatively lower tolerance to Cu in both sexes. This high Cu toxicity for *E. affinis* revealed here does coincide with the results of studies on various copepod species (Barka et al., 2001; Hutchinson et al., 1994; Sullivan et al., 1983).

4.2. Bioaccumulation of metals alone

To reduce the effects of dietary microalgae on bioaccumulation, the copepods were exposed to heavy metals without food. Our results showed that the survival rate of the copepod *E. affinis* seemed to be less influenced by food deprivation. This observation is in agreement with other studies, where the authors confirmed that copepods can tolerate starvation up to 15 days (Finiguerra et al., 2013; Pavlaki et al., 2017). An upward trend in the accumulation of the three metals tested with increasing exposure time. In parallel, the gradual decrease of the three metal concentrations measured in water correlates with the increases of the accumulation in copepods. Although *E. affinis* accumulated relatively lower quantity of Cd than Cu and Ni in the present study, they showed almost a linearly increasing bioaccumulation of Cd over time without saturation. The similar trend has been reported in some crustacean species, such as calanoid copepods *Acartia tonsa* and *Calanoides acutus* (Kahle and Zauke, 2002; Pavlaki et al.,

2017) and Antarctic amphipod *Chaetogammarus marinus* and *Paramoera walkeri* (Clason et al., 2004 and Clason et al. 2003). The unsaturated pattern of Cd accumulation in crustaceans could due to their poor capacity to eliminate this non-essential metals, and it may eventually lead to a high storage capacity Cd (Rainbow,1998; Ray,1984; Pavlaki et al., 2017).

On the other hand, *E. affinis* accumulated significantly high concentrations (as shown by their high accumulation indices) of Cu and Ni than Cd. Similar profiles of Cu- and Ni-accumulation were found in previous studies (Barka et al., 2010; Tlili et al., 2016). Although the fast accumulations were documented at the initial time of exposure, the absorption of these metals progressively reached a plateau. This decelerating bioaccumulation rate could be explained by a saturation of the metal-binding sites at high accumulated concentrations. Indeed, copepods can accumulate trace metals by performing complexation with different types of metal-binding amino acids or proteins such as glutathione and metallothionein (MT) (Rainbow, 2007; Roesijadi and Robinson 1994). These chelators have a strong affinity for metals because of their richness in thiol groups. In combination with complexation phenomena, the sequestration of metals in lysosomes or granules is a major route of storage and detoxification (Rainbow, 2007; Viarengo et al., 1987).

4.3. Bioaccumulation from metal mixture

To better understand the phenomenon of bioaccumulation and to stimulate the presence state of trace metals in the natural environment, exposure experiments to the Cd, Cu and Ni mixture were performed. Similar patterns of Cd, Cu and Ni accumulations were found when the copepods were exposed to the three-metal mixture as in the treatments alone. However, different quantities of accumulated metals in the copepods were clearly observed between the treatments. In the mixture treatment, the Cd accumulation increased linearly over time at lower

concentration than the treatment alone, and it is corresponded to the declined Cd concentration in water. The copepods accumulated Cu progressively in both treatments alone and three-metal mixture. Notably, the higher Cu accumulation indices indicate that the Cu accumulation was higher in the three-metal mixture. The concentration of Ni in copepod was remarkably lower when they were exposed to the three-metal mixture than the Ni alone. Nevertheless, the trends of bioaccumulation were similar in both treatments, that the Ni concentrations reached saturations after 24h exposure time. In addition, a comparative analysis shows that the copepod *E. affinis* tends to accumulate more Cu than Cd and Ni. This finding is different from the study using *Daphnia magna* as model for investigating multi-metal interaction during bioaccumulation process, where authors showed that the Cd has a higher affinity to metallothionein followed by lead (Pb) and Cu (Wang et al., 2018).

Although the phenomenon of bioaccumulation is well studied for metals alone (Croteau and Luoma, 2007; Jakob et al., 2017; Kahle and Zauke, 2002; Kahle and Zauke, 2003; Luoma and Rainbow, 2005; Manimaran et al., 2012; Rainbow and Luoma, 2011; Tlili et al., 2016), the literature concerning the bioaccumulation of metal mixtures remains limited. Indeed, the changes of metal bioaccumulation capacities in the multi-metal environments have been observed. Lopez et al. (2003) investigated the competitive effect of Cd and Zn on metallothionein, and they found that the incorporation of a new ion in the metallothionein led to the reorganization of previously incorporated metals. Similarly, a combination of metallothionein with Cu appeared to change its structure, resulting in a greater affinity to Pb (Wang et al., 2018). The differences of bioaccumulation levels between the treatments alone and the mixture, as well as the order of bioaccumulation level (Cu>Cd>Ni) found in the metal mixture could be expected as the consequences of competitive complexation between the three metals and subsequent interactions between metals with detoxifying proteins.

4.4. Bioaccumulation effect of Cd, Cu and Ni on the population structure of *E. affinis*

Mortality is usually the first parameter to consider when assessing the impact of contaminants in the environment. Trace metals are recognized by their toxic effects on environment and on marine organisms (Berasategui et al., 2017; Florence et al., 1994; Luoma et al., 1995; Zyadah and Abdel-Baky, 2000; Niebor and Templeton, 1994; Ghosal and Kaviraj, 2001; Ghosal and Kaviraj, 2002). Contaminations may reduce nauplii recruitment in copepod population by lowering their egg production and hatching success rate, or nauplii survival. This negative effect may vary with concentration of contaminant and duration of exposure among copepod species (Jiang et al., 2007; Kadiene et al., 2017; Mohammed et al., 2011). The results of our experiments showed that after 50% of the exposure time to the three metals alone and their mixture, the overall population of *E. affinis* is negatively affected. The number of individuals at all developmental stages (nauplii, copepodite, pre-adult and adult) in Cu and Ni treatments alone decreased significantly. The Cd showed the similar adverse effect on all stages of *E. affinis* except the nauplii, where the number of individuals increased compared to the control. We found that the number of individuals of both sexes of adults and pre-adults also decreased after exposure to the three metals studied alone and in mixture. This decrease was due to mortality that occurred throughout the life cycle of *E. affinis*. Despite the limited number of works in this theme, some field studies have reported this observation. For example, Korsman et al. (2014) noted that exposures to Zn and Cu were largely responsible for the reduction of *E. affinis* population in contaminated estuary. Similarly, Jiang et al., (2007) reported a decrease in the number of copepod *Acartia pacifica* nauplii when they were exposed to Cd, Cu and Pb. Indeed, we found the obvious toxic effects of the three metals on *E. affinis* with various mortalities of 14.29% (Cd alone), 43.96% (Cu alone), 17.40% (Ni alone) and 22.34% (three-metal mixture), respectively. The most toxic element for *E. affinis* among the three metals is Cu, and it coincides with the findings on another calanoid copepod *Acartia pacifica* (Jiang et

al., 2007). The study showed that Cu induced a high total mortality (46.6%) and a lower mortality rate of 31.5% for only 3 days of exposure. Exposure of multiple metals could cause different toxicity to organism. Meyer et al. (2015) suggested that the mixtures of Cu and Zn could induce additive toxicity to the water flea *Daphnia magna*. However, the designed metal mixture of Cd, Cu and Ni did not induce additive toxicity in term of mortality to *E. affinis* in our study.

4.5. Cd-, Cu-, Ni-effect on total aerobic bacteria

In this study, we followed the responses of the total flora of *E. affinis* cultures exposed to the various treatments for 144h. The bacterial load in all copepod cultures exposed were negatively affected, where the Cu showed the strongest effect compared to Cd and Ni. Despite the low number studies, some authors have reported that various forms of heavy metals in the environment can cause significant changes in microbial communities and their activities (Doelman et al. al., 1994; Guzzo et al., 1994; Starzecka and Bednarz, 1993; Hiroki, 1992; Hiroki 1994). Although some metals are essential for microorganisms at a relatively low concentration (e.g. Co, Cu, Zn, Ni) because they provide vital cofactors for metalloproteins and enzymes (Eiland, 1981; Doelman et al., 1994), these heavy metals generally exert an inhibitory action on microorganisms by blocking essential functional groups (Doelman et al., 1994; Li and Tan, 1994; Wood and Wang, 1983), displacing essential metal ions or modifying active conformations biological molecules.

In conclusion, the calanoid copepod *E. affinis* has different toxic sensitivities toward the trace metals Cd, Cu and Ni, and they can accumulate these metals at different levels. The metal contaminants had negative effects on the copepod cultures, where the total numbers of bacteria were markedly reduced. Moreover, we confirmed that the mixture of metallic pollutants can create complex interaction that eventually changes their bioaccumulation levels in the

copepods. Here we report the first time the metal toxicities and bioaccumulations of *E. affinis* at population scale. Our results provide implications of *E. affinis* as a biological model for environmental risk assessment, and further raise the interests to investigate their detoxification mechanisms at molecular level in the future.

5. Acknowledgment

This work is a contribution to the projects CPER 2015-2020 MARCO funded by Europe (FEDER), the French government and the region Hauts-de-France, ECOTONES funded by the GIP Seine-Aval and the International Associate Laboratory between Lille University and National Taiwan Ocean University. We thank past and present members of the group of S.S. for their involvement in maintaining several cultures of copepods and algae and the Communauté d'Agglomération du Boulonnais (CAB) for supporting the implementation of a copepod-rearing pilot project (agreement Lille University-CAB). The authors are indebted to la Région des Hauts-de-France for awarding ALIBIOTECH CPER/FEDER project 2014-2020.

6. References

- Arias, A.H., Souissi, A., Roussin, M., Ouddane, B., Souissi, S., 2016. Bioaccumulation of PAHs in marine zooplankton: an experimental study in the copepod *Pseudodiaptomus marinus*. Environ. Earth Sci. 75, 691.
- Amiard-Triquet, C., Cossu-Leguille, C., Mouneyrac, C., 2008. Les biomarqueurs de défense, la tolérance et ses conséquences écologiques. In: Amiard J.-C. and Amiard-Triquet C. (Eds.) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pp. 55-94. (In French)
- Barka, S., Pavillon J. F., and Amiard-Triquet C., 2010. Metal distributions in *Tigriopus brevicornis* (Crustacea, Copepoda) exposed to copper, zinc, nickel, cadmium, silver, and

- mercury, and implication for subsequent transfer in the food web. *Environ. Toxicol.* 25(4), 350-360.
- Barka, S., Pavillon, J. F., Amiard, J. C., 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the copepod *Tigriopus brevicornis*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 128(4), 479-493.
- Berasategui, A. A., Biancalana, F., Fricke, A., Fernandez-Severini, M.D., Uibrig, R., Dutto, M.S., Marcovecchio, J., Calliari, D., Hoffmeyer, M.S., 2018. The impact of sewage effluents on the fecundity and survival of *Eurytemora americana* in a eutrophic estuary of Argentina. *Estuar. Coast. Shelf. Sci.* 211, 208-216.
- Clason, B., Duquesne, S., Liess, M., Schulz, R., Zauke, G.P., 2003. Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): Comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Aquat. Toxicol.* 65, 117–140.
- Clason, B., Langston, W.J., Zauke, G.P., 2004. Bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Chaetogammarus marinus* (Leach, 1815) from the Avon and Tamar estuaries (UK): Comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Mar. Environ. Res.* 57, 171–195.
- Cripe, G. M., Cripe, C. R., 1990. Comparative acute sensitivity of selected estuarine and marine crustaceans to toxic substances. US Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory, Gulf Breeze, Florida.
- Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 41(9), 3140-3145.
- Dauvin, J. C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: the case of the Seine estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 57(1-5), 160-169.
- David, V., Sautour, B., Chardy, P., Leconte, M., 2005. Long-term changes of the zooplankton

- 449 variability in a turbid environment: the Gironde estuary (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.*
450 64(2-3), 171-184
- 451 Doelman, P., Jansen, E., Michels, M., Van Til, M., 1994. Effects of heavy metals in soil on
452 microbial diversity and activity as shown by the sensitivity-resistance index, an
453 ecologically relevant parameter. *Biol. Fertil. Soil.* 17, 177-184.
- 454 Eiland, F., 1981. The effects of application of sewage sludge on microorganisms in soil.
455 *Tidsskr. Planteavl* 85, 39-46.
- 456 Finiguerra, M.B., Dam, H.G., Avery, D.E., Burris, Z., 2013. Sex-specific tolerance to starvation
457 in the copepod *Acartia tonsa*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 446, 17–21.
- 458 Fisher, N.S., Saijudo-wilhelmyl, S., Wang, W., Teyssie, J., Scott, W., 2000. Trace metals in
459 marine copepods : a field test of a bioaccumulation model coupled to laboratory uptake
460 kinetics data. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 194, 211-218.
- 461 Florence, T.M., Stauber, J.L., Ahsanullah, M., 1994. Toxicity of nickel ores to marine
462 organisms. *Sci. Total Environ.* 148, 139–155.
- 463 Ghosal, T.K., Kaviraj A., 2001. Acute toxicity of cadmium to fish *Labeo rohita* and copepod
464 *Diaptomus forbesi* pre-exposed to CaO and KMnO₄. *Chemosphere* 42(8), 955–958.
- 465 Ghosal, T.K., Kaviraj A., 2002. Combined effects of cadmium and composted manure to
466 aquatic organisms. *Chemosphere* 46(7), 1099–1105.
- 467 Guzzo, A., Du Bow, M., Bauda, P., 1994. Identification and characterization of genetically
468 programmed responses to toxic metal exposure in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.*
469 14, 369-374.
- 470 Hall, L.W., Ziegenfuss M.C., Anderson R.D., Lewis B.L., 1995. The effect of salinity on the
471 acute toxicity of total and free cadmium to a Chesapeake Bay copepod and fish. *Mar*
472 *Pollut. Bull.* 30(6), 376–384
- 473 Hiroki, M., 1992. Effects of heavy metal contamination on soil microbial population. *Soil Sci.*

- 474 Plant Nutr. 38, 141–147.
- 475 Hiroki, M., 1994. Populations of Cd-tolerant microorganisms in soils polluted with heavy
476 metals. Soil Sci. Plant Nutr. 40, 515–524.
- 477 Howard, C.L., Hacker, C.S., 1990. Effects of salinity, temperature, and cadmium on cadmium-
478 binding protein in the grass shrimp, *Palaemonetes pugio*. Arch. Environ. Contam. Toxicol.
479 19, 341–347.
- 480 Hutchinson, T. H., Williams, T. D., Eales, G. J., 1994. Toxicity of cadmium, hexavalent
481 chromium and copper to marine fish larvae (*Cyprinodon variegatus*) and copepods (*Tisbe*
482 *battagliai*). Mar. Environ. Res. 38(4), 275-290.
- 483 Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, BB., Beeregowda, KN., 2014. Toxicity,
484 mechanism and health effects of some heavy metals. Interdiscip. Toxicol. 7(2), 60-72.
- 485 Jakob, L., Bedulina, D. S., Axenov-Gribanov, D. V., Ginzburg, M., Shatilina, Z. M., Lubyaga,
486 Y. A., Madyarova E. V., Gurkov A. N., Timofeyev M. A., Pörtner H.-O., Sartoris F. J.,
487 Altenburger R., Luckenbach T., Sartoris, F. J., 2017. Uptake kinetics and subcellular
488 compartmentalization explain lethal but not sublethal effects of cadmium in two closely
489 related Amphipod Species. Environ. Sci. Technol. 51(12), 7208-7218.
- 490 Jiang, X. dong, Wang, G. zhong, Li, S. jing, He, J. feng, 2007. Heavy metal exposure reduces
491 hatching success of *Acartia pacifica* resting eggs in the sediment. J. Environ. Sci. 19, 733–
492 737.
- 493 Kadiene, E.U., Bialais, C., Ouddane, B., Souissi, S., 2017. Differences in lethal response
494 between male and female calanoid copepods and life cycle traits to cadmium toxicity.
495 Ecotoxicology 26(9), 1227-1239.
- 496 Kahle, J., Zauke, G.P., 2002. Bioaccumulation of trace metals in the calanoid copepod *Metridia*
497 *gerlachei* from the Weddell Sea (Antarctica). Sci. Total Environ. 295, 1–16.
- 498 Kahle, J., Zauke, G.P., 2003. Trace metals in Antarctic copepods from the Weddell Sea

- 499 (Antarctica). Chemosphere 51, 409–417.
- 500 Korsman, J.C., Schipper A.M., De Hoop L., Mialet B., Maris T., Tackx M.L., Hendriks A.J.
- 501 2014. Modeling the impacts of multiple environmental stress factors on estuarine copepod
- 502 populations. Environ. Sci. Technol. 48(10), 5709–5717
- 503 Lane, T.W., Morel, F.M., 2000. A biological function for cadmium in marine diatoms. Proc.
- 504 Natl. Acad. Sci. USA 97(9), 4627-4631.
- 505 Li, F., Tan, T.C., 1994. Monitoring BOD in the presence of heavy metal ions using a poly (4-
- 506 microbial senso. Biosens. Bioelectron. 9(6), 445-455.
- 507 López, M.J., Ariño, C., Díaz-Cruz, S., Díaz-Cruz, J.M., Tauler, R., Esteban, M., 2003.
- 508 Voltammetry assisted by multivariate analysis as a tool for speciation of metallothioneins:
- 509 competitive complexation of α -and β -metallothionein domains with cadmium and zinc.
- 510 Environ. Sci. Technol. 37(24), 5609-5616.
- 511 Luoma, S.N., O, Y.B.H., Bryan, G.W., 1995. Fate, bioavailability and toxicity of silver in
- 512 estuarine environments. Mar. Pollut. Bull. 31(1-3), 44-54.
- 513 Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as
- 514 a unifying concept. Environ. Sci. Technol. 39, 1921–1931.
- 515 Manimaran, K., Karthikeyan, P., Ashokkumar, S., Prabu, V. A., & Sampathkumar, P., 2012.
- 516 Effect of copper on growth and enzyme activities of marine diatom, *Odontella*
- 517 *mobiliensis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 88(1), 30-37.
- 518 Meyer, J.S., Ranville, J.F., Pontasch, M., Gorsuch, J.W., Adams, W.J., 2015. Acute toxicity of
- 519 binary and ternary mixtures of Cd, Cu, and Zn to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol.
- 520 Chem. 34, 799–808.
- 521 Mohammed, E.H., Wang, G., Xu, Z., Liu, Z., 2011. Physiological response of the intertidal
- 522 copepod *Tigriopus japonicus* experimentally exposed to cadmium. Int. J. Bioflux Soc. 4,
- 523 99–107.

- 524 Nieboer, E., and Templeton, D.M., 1994. Special issue nickel biochemistry, toxicology, and
525 ecologic issues in: Sci. Total Environ., A collection of papers presented at the Fifth
526 International Conference on Nickel Biochemistry. Toxicology and Ecologic Issues, (eds),
527 148.
- 528 Ouddane, B., 1990. Comportement des éléments majeurs et mineurs dans un milieu soumis à
529 des gradients physico-chimiques marqués: cas de l'estuaire de la Seine. PhD theis,
530 Université des sciences et technologies de Lille, Lille, France. (In French)
- 531 Pavlaki, M.D., Morgado, R.G., Gestel, C.A.M. Van, Calado, R., Soares, A.M.V.M., Loureiro,
532 S., 2017. Ecotoxicology and environmental safety influence of environmental conditions
533 on the toxicokinetics of cadmium in the marine copepod *Acartia tonsa*. Ecotoxicol.
534 Environ. Saf. 145, 142–149.
- 535 Price, N. M., Morel, F. M. M., 1990. Cadmium and cobalt substitution for zinc in a marine
536 diatom. Nature 344(6267), 658.
- 537 Quintin, J.Y. et al., 2014. Surveillance écologique du site du Blayais, année 2013. Rapp.
538 IFREMER, Brest, France. (In French).
- 539 Verschoor, A.J., Hendriks, A.J., Vink, J.P., de Snoo, G.R., Vijver, M.G., 2012. Multimetal
540 accumulation in crustaceans in surface water related to body size and water
541 chemistry. Environ. Toxicol. Chem. 31(10), 2269-2280.
- 542 Viarengo, A., Moore, M.N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R.K., and Farrar, S.V.,
543 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine
544 mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar. Biol.
545 94(2), 251-257.
- 546 Watras, C.J., Back, R.C., Halvorsen, S., Hudson, R.J.M., Morrison, K.A., Wente, S.P., 1998.
547 Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. Sci. Total Environ. 219(2-
548 3), 183-208.

- 549 Rainbow P.S., 1998. Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans, in: Langston W.J.,
550 Bebianno M.J. (Eds), Metal Metabolism in Aquatic Environments. Springer, Boston, MA,
551 pp 285-319
- 552 Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and
553 toxicity. *Environ. Int.* 33(4), 576-582.
- 554 Rainbow, P.S., Luoma, S.N., 2011. Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic
555 invertebrates—modelling zinc in crustaceans. *Aquat. Toxicol.* 105(3-4), 455-465.
- 556 Raisuddin, S., Kwok, K. W., Leung, K. M., Schlenk, D., & Lee, J. S., 2007. The copepod
557 *Tigriopus*: a promising marine model organism for ecotoxicology and environmental
558 genomics. *Aquat. Toxicol.* 83(3), 161-173.
- 559 Ray, S., 1984. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. *Experientia* 40, 14–23.
- 560 Roberts, M.H., Warinner, J.E., Tsai, C.F., Wright, D., Cronin, L.E., 1982. Comparison of
561 estuarine species sensitivities to three toxicants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11(6),
562 681-692.
- 563 Roesijadi, G., Robinson, W. E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of
564 uptake, accumulation and release. *Aquat. Toxicol.* 102, 125-133.
- 565 Rollin, C., Quiot, F., 2006. *Éléments traces métalliques-guide méthodologique:*
566 *recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans*
567 *les sols et les eaux souterraines. Rapport d'étude n° INERIS-DRC-06-66246/DESP-R01a.*
- 568 Simkiss, K., Taylor M.G. 1995. Transport of metals across membranes. in: Tessier A., Turner
569 D.R. (Eds.), Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. IUPAC, John Wiley
570 and Sons Ltd, Chichester, pp. 1–44.
- 571 Souissi, A., Souissi, S., Hansen, B.W., 2016. Physiological improvement in the copepod
572 *Eurytemora affinis* through thermal and multi-generational selection. *Aquac. Res.* 47,
573 2227–2242.

- 574 Sullivan, B.K., Buskey, E., Miller, D.C., Ritacco, P.J., 1983. Effects of copper and cadmium on
575 growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). Mar. Biol.
576 77, 299–306.
- 577 Starzecka, A., Bednarz, T., 1993. Comparison of development and metabolic activity of algae
578 and bacteria in soils under the influence of short-and long-term contamination with
579 metallurgic industrial dusts. Arch. Hydrobiol. Suppl. 98, 71-88.
- 580 Taylor, D., 1981. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life, 12,
581 Nickel. In: B.H.R. Williams (Ed.), BL/A/2143, Imperial Chemical Industries Limited,
582 Brixham, United Kingdom, pp. 745-756.
- 583 Thévenot, D. R., Laurence, L., Marie-Helene, T. V., Jean-Louis, G., & Michel, M., 2009. Les
584 métaux dans le bassin de la Seine. Programme PIREN-Seine. Programme
585 Interdisciplinaire de Recherche sur l’Environnement de la Seine, Paris, France P.52. (In
586 French).
- 587 Tlili, S., Ovaert, J., Souissi, A., Ouddane, B., Souissi, S., 2016. Acute toxicity, uptake and
588 accumulation kinetics of nickel in an invasive copepod species: *Pseudodiaptomus*
589 *marinus*. Chemosphere 144, 1729–1737.
- 590 Verschoor, A.J., Hendriks, A.J., Vink, J.P.M., de Snoo, G.R., Vijver, M.G., 2012. Multimetal
591 accumulation in crustaceans in surface water related to body size and water chemistry.
592 Environ. Toxicol. Chem. 31, 2269–2280.
- 593 Viarengo, A., Moore, M. N., Mancinelli, G., Mazzucotelli, A., Pipe, R. K., Farrar, S. V., 1987.
594 Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the
595 effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar. Biol. 94(2), 251-
596 257.
- 597 Wang, X., Liu, J., Tan, Q., Ren, J., Liang, D., Fan, W., 2018. Development of multi-metal
598 interaction model for *Daphnia magna*: Significance of metallothionein in cellular

- 599 redistribution. Ecotoxicol. Environ. Saf. 151, 42–48.
- 600 Watras, C.J., Back, R.C., Halvorsen, S., Hudson, R.J.M., Morrison, K.A., Wente, S.P. 1998.
- 601 Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. Sci. Total Environ. 219(2-
- 602 3), 183-208.
- 603 Winkler, G., Souissi, S., Poux, C., Castric, V., 2011. Genetic heterogeneity among *Eurytemora*
- 604 *affinis* populations in Western Europe. Mar. Biol. 158, 1841–1856.
- 605 Wood, J.M., Wang, H.K., 1983. Microbial resistance to heavy metals. Environ. Sci. Technol.
- 606 17(12), 582A-590A.
- 607 Zidour, M., Chevalier, M., Belguesmia, Y., Cudennec, B., Grard, T., Drider, D., Souissi, S.,
- 608 Flahaut, C., 2017. Isolation and characterization of bacteria colonizing *Acartia tonsa*
- 609 copepod eggs and displaying antagonist effects against *Vibrio anguillarum*, *Vibrio*
- 610 *alginolyticus* and other pathogenic strains. Front. Microbiol. 8, 1919.
- 611 Zyadah, M.A., Abdel-Baky, T.E., 2000. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and
- 612 cadmium in some aquatic organisms. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 64, 740–747.
- 613
- 614
- 615
- 616
- 617
- 618 **Table 1:** Acute 50% lethal concentrations (LC50) of cadmium (Cd), copper (Cu) and nickel
- 619 (Ni) for the adult copepod *E. affinis* after 48h, 72h and 96h exposure.

	LC50 ($\mu\text{g.L}^{-1}$)								
	48h			72h			96h		
	Cd	Cu	Ni	Cd	Cu	Ni	Cd	Cu	Ni
Females	239.0	-	-	121.0	224.0	-	90.0	39.0	161.0

Males - 145.2 - 67.0 51 88.0 127.8 28.0 90.0

:- Not determined (slow response)

Table 2. Accumulation indices of Cu, Ni and Cd alone and in mixture in *E. affinis*.

Trace metals	Cu		Ni		Cd	
	Alone	Mixture	Alone	Mixture	Alone	Mixture
Accumulation indices (L.g ⁻¹ .d ⁻¹)	0.58	0.72	0.09	0.02	0.08	0.07
r ²	0.53	0.91	0.77	0.81	0.97	0.93

Table 3: Comparison of the acute toxicity (96h- LC₅₀) of trace metals (Cd, Cu and Ni) for the copepod *E. affinis*.

Life stage	96h-LC50 (µg.L ⁻¹)			Reference
	Cd	Cu	Ni	
Adult female	90.04	38	161	Present study
Adult male	127.75	25	90	Present study
Adult female	90.04	-	-	(Kadiene et al., 2017)

Adult male	127.75	-	-	(Kadiene et al., 2017)
Nauplii	>120	30	-	(Sullivan et al., 1983a)
Nauplii	51.6 (5 ppt)	-	-	(Hall et al., 1995)
Nauplii	213 (15 ppt)	-	-	(Hall et al., 1995)
Nauplii	82.9 (25 ppt)	-	-	(Hall et al., 1995)
Not precised	147.7	-	-	(Cripe and Cripe, 1990)
Not precised	60	-	-	(Roberts et al., 1982)

660 -: Not determined

674 **Figure captions**

676 **Figure 1.** Accumulation of trace metals in copepod *E. affinis* after different exposure times (A:
677 cadmium, B: nickel, C: copper).

Figure 2. Residual concentrations of the trace metals in water from accumulation experiments in *E. affinis* copepods during different exposure times (A: cadmium, B: nickel, C: copper).

Figure 3. Effect of trace metals on *E. affinis* developmental stages after 50% of exposure time (A) individuals number per liter (B) percentage decrease of individual number. Data are presented as means $\pm$ SD (n=3), and the different letters (a-d) labeled above bars indicate significant difference ($p < 0.05$) within each developmental stage.

Figure 4. Effect of trace metals on *E. affinis* sex-developmental stages after 50% of exposure time (A) individuals numbers (B) percentage decrease of individual numbers. Data are presented as means $\pm$ SD (n=3), and the different letters (a-d) labeled above bars indicate significant difference ($p < 0.05$) within each sex-developmental stage.

Figure 5. Effect of trace metals on the total aerobic flora in copepods *E. affinis* exposed to trace metals alone and in mixture during different exposure time.

Fig.1

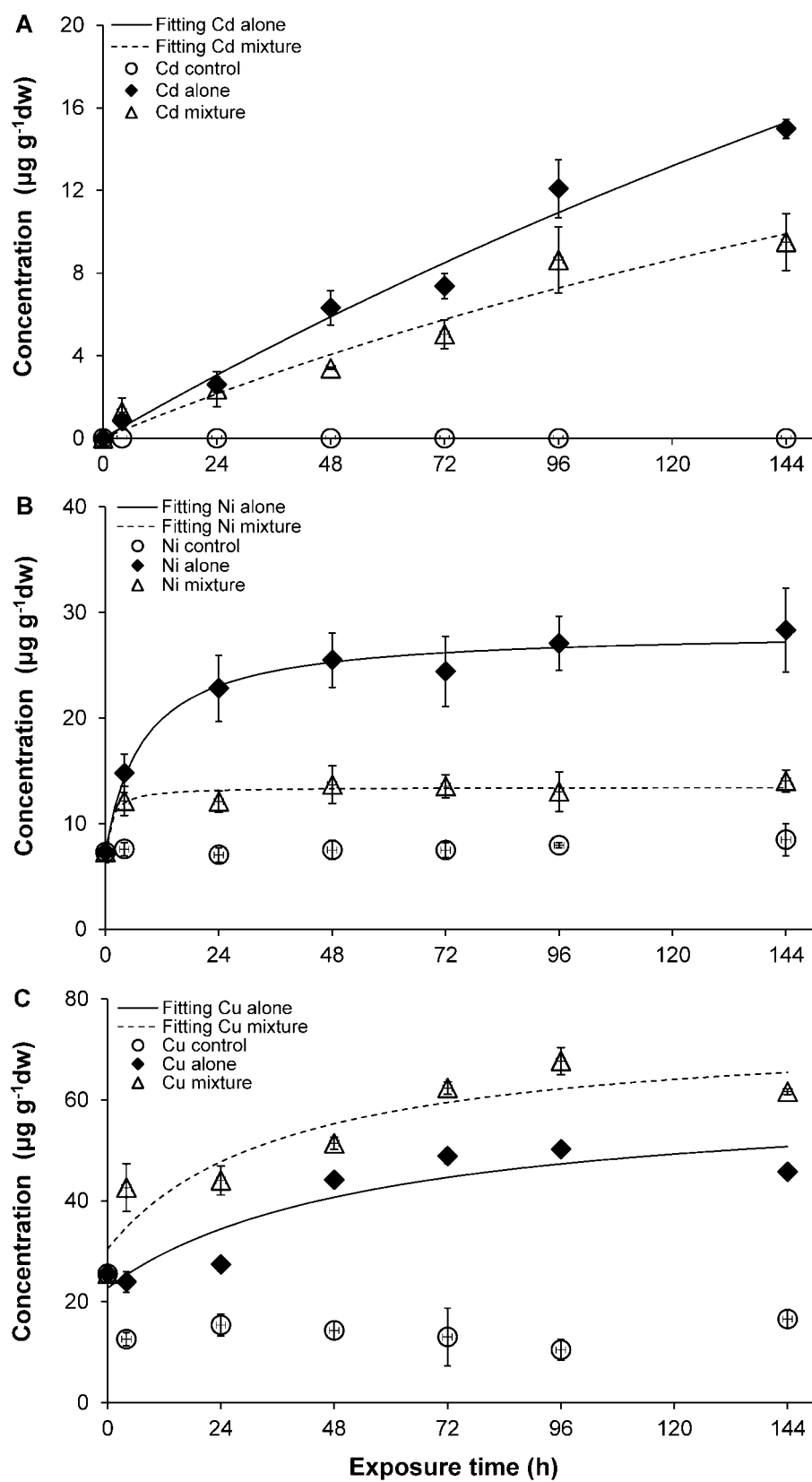


Fig.2

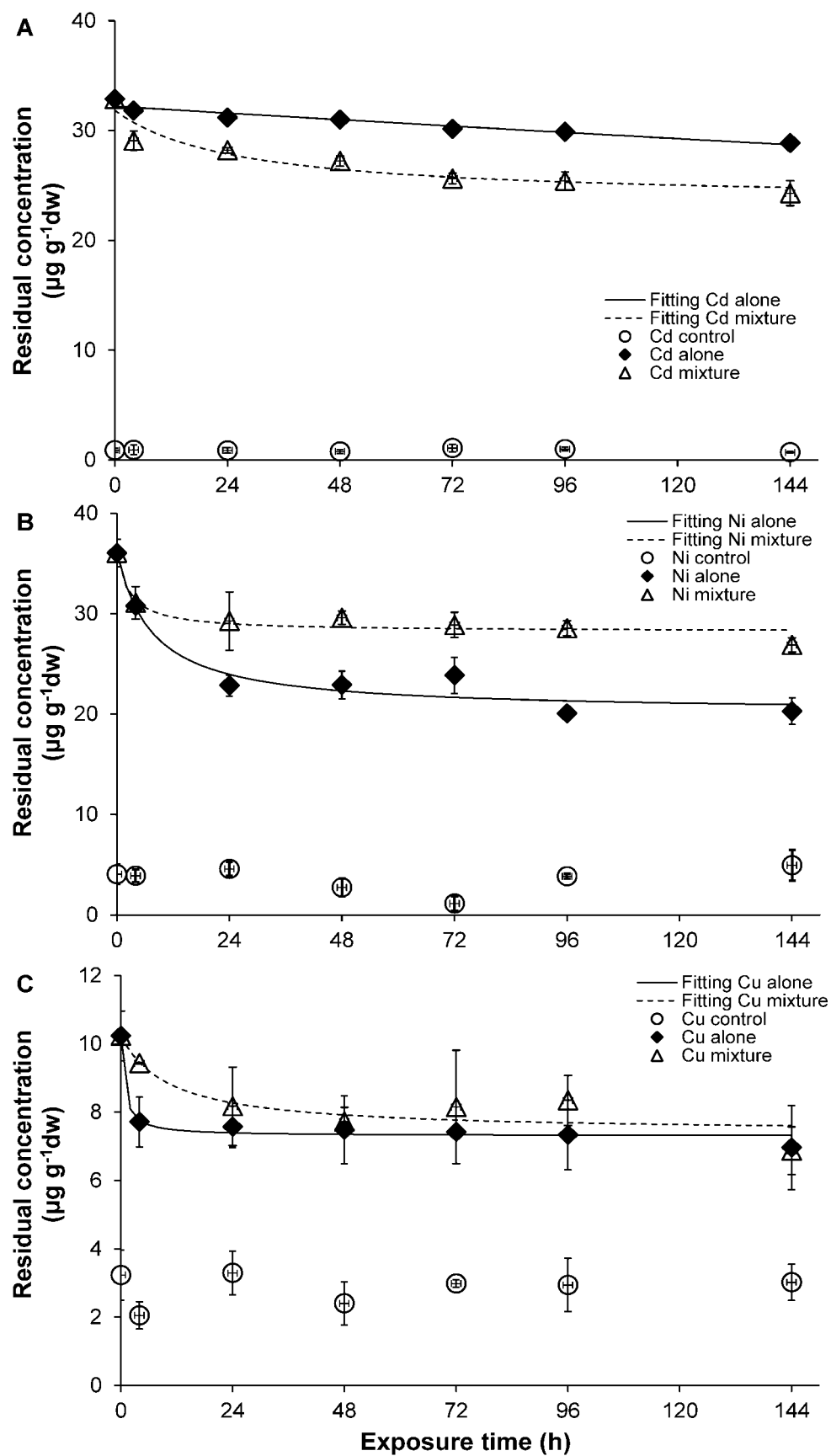


Fig. 3

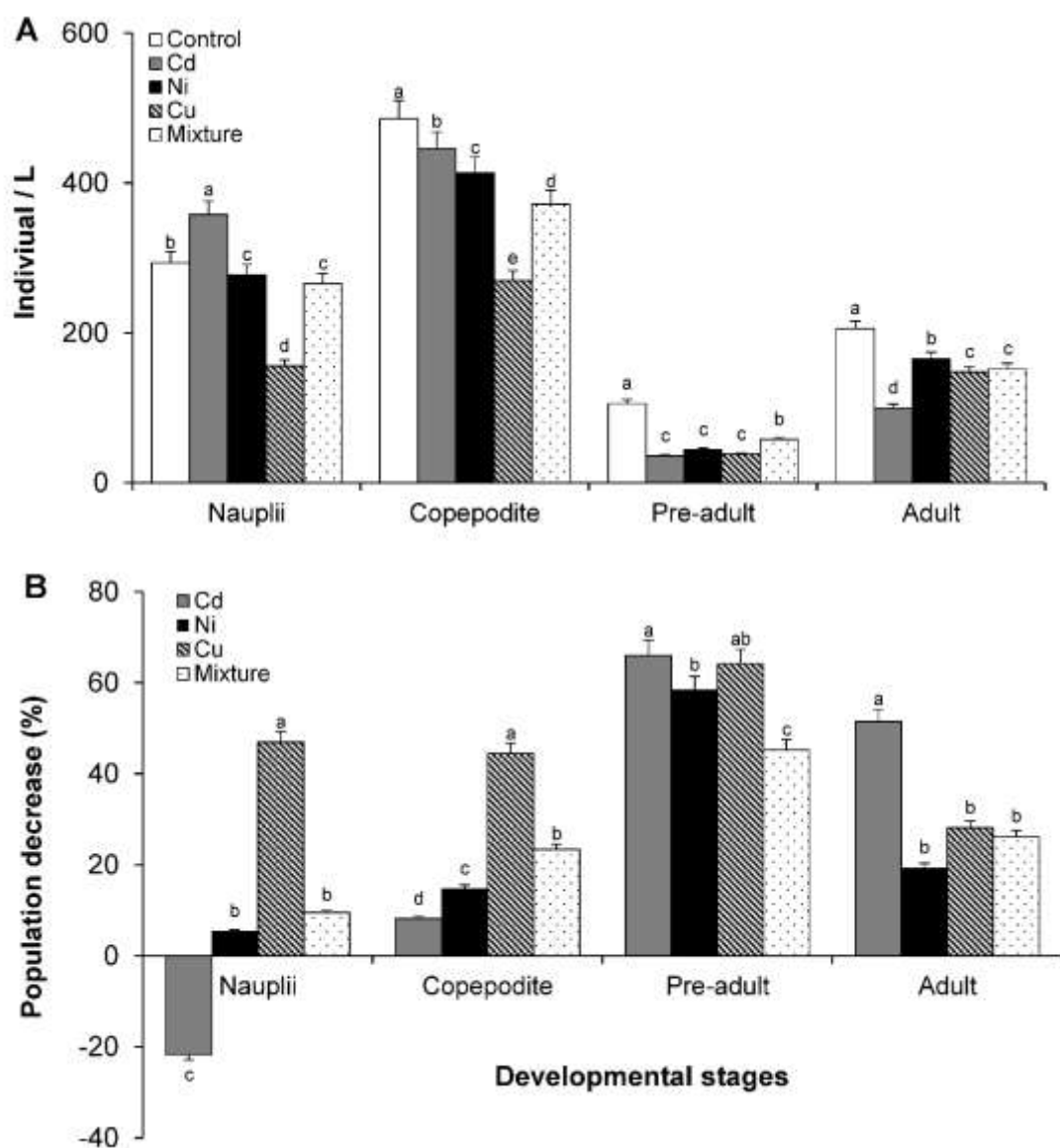


Fig. 4

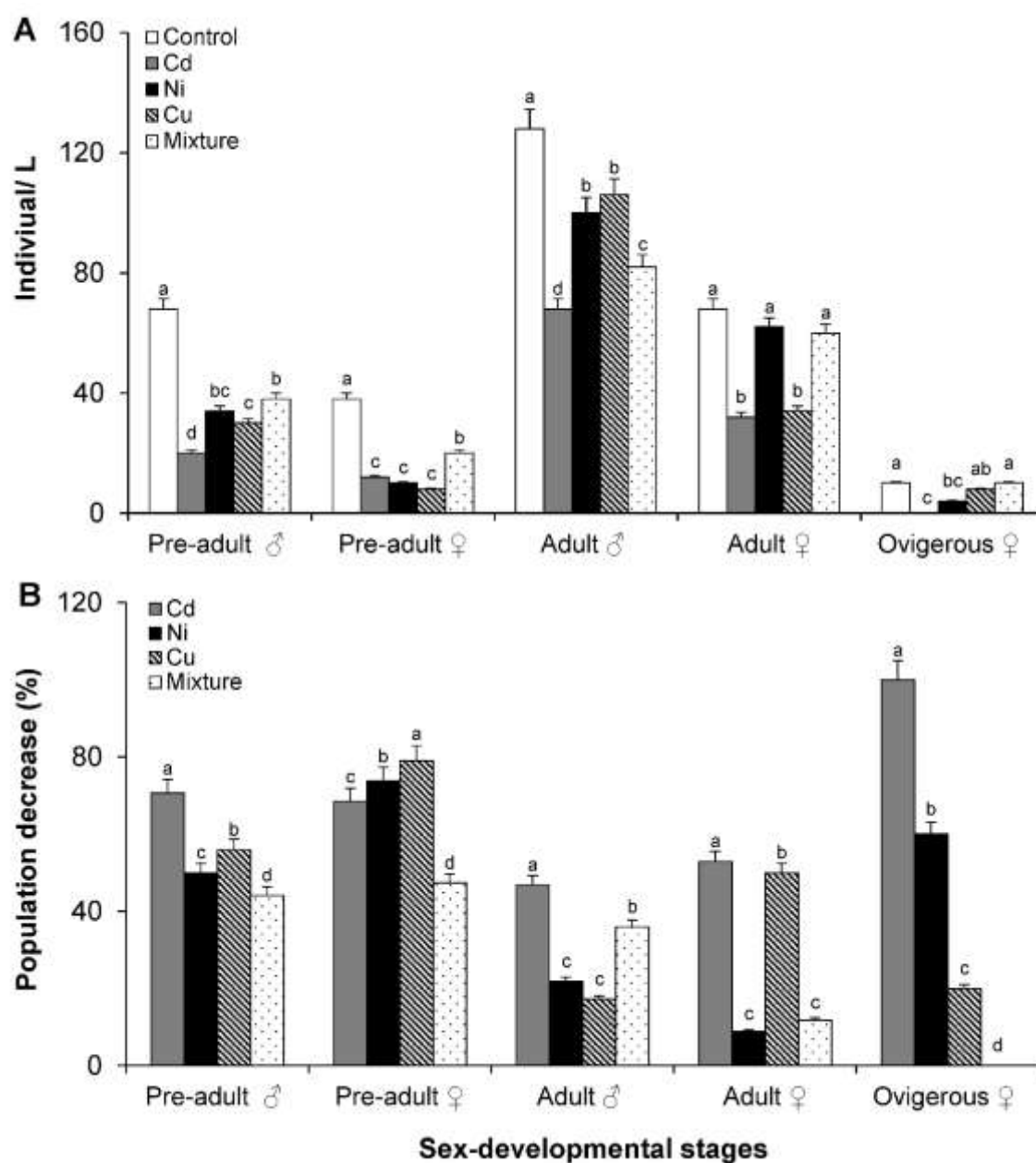


Fig. 5

