

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

KARA Hanane et MADANI Sihem

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN HYDROBIOLOGIE MARINE ET CONTINENTALE

Spécialité: Ressources Halieutiques

THÈME

**Contribution à l'étude de la microflore
digestive de l'holothurie *Holothuria poli***

Soutenue publiquement le 16/09/2019

DEVANT LE JURY

Président	Pr. SOUALILI Dina Lila	U. Mostaganem
Encadreur	Dr. BELBACHIR Nor Eddine	U. Mostaganem
Co-encadreur	M ^{me} BENZIDANE Dehiba	U. Mostaganem
Examineur	Dr. BACHIR BOUIADJRA Benabdellah	U. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire d'Halieutique (Université de Mostaganem)

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier le Bon Dieu tout puissant de m'avoir aidé à réaliser ce modeste travail.

Mes plus sincères s'adressent à notre encadreur M. BELBACHIR Nor eddine pour tout ses conseils judicieux, ses jugements critiques et son appui tout au long de cette étude.

Un remerciement particulier à Madame Benzidane Dehiba pour ses conseils et son aide au laboratoire et de m'avoir transmis ses connaissances.

Nous sommes honorés par la présence de M. BACHIR BOUIADJRA Benabdellah et parmi les M^{me}. SOUALILI Dina Lila membres du jury que nous exprimons notre gratitude et nos respects.

Nous tenons à remercier personnellement toutes les personnes qui nous ont aidés de près ou de loin à réaliser ce modeste travail.

Dédicace

Je dédie ce projet :

A ma chère mère

A mes sœurs

A mes frères

*Qui ont fait des sacrifices et crus en moi tout au long de mon
parcours scolaire*

Et pour leurs conseils précieux.

A mon cher fiancé

Qui m'a aidé et supporté dans les moments difficiles.

A mes adorables amies Meriem et Zohra

Et enfin à ceux qui m'ont aidé à réaliser ce mémoire.

Sihem

Dédicace

Je dédie ce travail Pour tous ceux que j'aime

A ma chère mère

A mes frères et mes sœurs

A toute ma famille sans exception

A ma chère amie et binôme : Sihem

A mes amies : Abbou Meriem et Fartas Zohra

Et en fin à toute le promo M2 RH 2018/2019

Hanane

Sommaire

Introduction	01
Chapitre I Etude bibliographique	
I. Généralité sur l'embranchement des Echinodermes	03
II. Les holothuries	03
II.1.Classification	04
II.2.Morphologie	05
II.3.Systeme digestif	08
II.4.Systeme de reproduction	10
II.5.Ecologie	11
II.5.1.Habitat et répartition géographique	11
II.5.2.Le déplacement	11
II.5.3.Moyenne de défense	12
II.5.3.1.Toxines	12
II.5.3.2.Tubes de Cuvier	12
II.6.Régime et comportement alimentaire	13
II.7.Symbioses et commensalismes	14
II.8.Prédation	15
II.9.Intérêt des holothuries	17
II.9.1.Intérêt environnementaux	17
II.9.2.Utilisation médicale et pharmaceutique	17
II.9.3.Alimentation humaine	18
III. La flore digestive des invertébrés marins	19
III.1.Généralité	19
III.2.les types des bactéries digestives chez les invertébrés	20
III.3.La flore bactériennes du tube digestif des holothuries	20

Chapitre II : Matériels et méthode

II. Présentation de la zone côtière de Mostaganem	22
II.1.Hydrodynamisme	22
II.2.Température	22
III. Présentation du site de prélèvements	23
IV.prélèvement et traitement des échantillons	23
V.Analyse microbiologique	25
V.1.isolement et purification des souches	25
V.1.1.préparation de l'eau physiologique	25
V.1.2.Préparation de la solution mère	26
V.1.3.Préparation des dilutions	26
V.1.4.Dénombrement des bactéries	27
V.1.4.1.Préparation de la Gélose Nutritive	27
V.1.4.2.Mode d'opérateur	29
V.1.5.Pré-enrichissement	30
V.1.5.1.Préparation du Bouillon Nutritive	30
V.1.5.2.Mode d'opérateur	31
V.1.6.Isolement des bactéries	31
V.2.Caractéristique des souches	32
V.2.1.Etude morphologique	32
V.2.1.1.Aspect macroscopique	32
V.2.1.2.Aspect microscopique	33
• Coloration de gram	33
V.2.2.Tests d'orientation	36
V.2.2.1.Mise en évidence d'enzymes respiratoires	36
• Test de catalase	37

V.2.2.2.Etude de type respiratoire	37
•Préparation de milieu Viande Foie	37
•Mode d'opérateur	37
V.2.2.3.Test de mobilité	38
•Préparation du milieu Mannitol-Mobilité	38
•Mode d'opérateur	38

Chapitre III : Résultats et discussion

I.Dénombrement des bactéries	39
II.Caractérisation des souches	44
II.1.Etude morphologique	44
II.1.1.Aspect macroscopique	44
II.1.2.Aspect microscopique	45
•Coloration de gram	45
II.2.Tests d'orientation	47
II.2.1.Mise en évidence d'enzymes respiratoire	47
•Test de catalase	47
II.2.2.Etude du type respiratoire	49
II.2.3.Test de mobilité	50

Conclusion

Références bibliographique

Annexe

La listes des figures

Figure 01 : Diversité Morphologique des Holothuroidea. *Pelagothurianatatrix* (A), *Ypsilothuriabitentaculata*(B), *Paracaudinachilensis* (C), *Lissothurianutriens*(D), *Enypniasteseximia* (E), *Colochirusrobustus* (F) (Miller *et al.*, 2017).

Figure 02 : Anatomie externe d'une holothurie aspidochirote (D'après Samynet *al.*, 2006)

Figure 03 : Anatomie interne d'une holothurie aspidochirote (Samynet *al.*, 2006).

Figure 04 : Tube digestif d'une holothurie. Schéma générale (A) [D'après Oomen, (1926) In Massin et Jangoux, (1976)]. Différentes parties du tube digestif caractérisées par leurs fonctions physiologiques (B) (In Mezali, 1998).

Figure 05 : *Holothuria forskali* lâchant des tubes de Cuvier (Fleche)

Figure 06 : Situations géographiques du site Salamandre (Source : Google earth).

Figure 07 : Individu de l'espèce *Holothuria poli*.

Figure 08 : Dissection de l'individu d'*Holothuria poli*. Incision longitudinale de l'individu (A) ; prélèvement du tube digestif (B).

Figure 09 : Préparation de l'eau physiologique.

Figure 10 : Pesée des sous échantillons pour la préparation de la solution mer

Figure 11 : Préparation des dilutions décimales.

Figure 12 : Préparation de la gélose nutritive. Dissolution du milieu déshydraté (A), mise en bouteilles du milieu de culture (B).

Figure 13 : Préparation des boîtes de pétri en vue de l'analyse microbiologique. Emballage des boîtes de pétri, dans du papier film (A), mise à l'étuve des boîtes de pétri (B).

Figure 14 : Procédure effectuées avant le dénombrement des bactéries. Prise de l'inoculum à partir des dilutions (A) ; mise de l'inoculum sur la gélose nutritive (B) ; étalement de l'inoculum sur la gélose nutritive (C).

Figure 15 : Préparation du bouillon nutritif. Composition (A), mise en ébullition dans de l'eau distillée (B).

Figure 16 : Méthode d'ensemencement en stries.

Figure 17 : Différentes étapes de la coloration de Gram. Préparation du frottis (A), coloration au violet de Gentiane (B), mordancage au Lugol (C), décoloration à l'alcool (D), contre coloration à la Safranine (E) et lavage à l'eau (F).

Figure 18 : Test de la Catalase

Figure 19 : Préparation du milieu mannitol-mobilité.

Figure 20 : Aspect des colonies obtenues au niveau des échantillons du Forgut (A) et du Hindgut (B).

Figure 21 : Nombre de colonies en Unité Formant Colonie (UFC/ml), au niveau des deux tronçons du tube digestif de *Holothuria poli*, Forgut (FG) et Hindgut (HG), ainsi qu'au niveau du sédiment du biotope (SB).

Figure 22 : Champignons observés au niveau des échantillons du Sédiment du Biotop (A), ainsi qu'au niveau du Hindgut (B).

Figure 22 : Caractéristiques est colonies isolées à partir des échantillons de sédiment du biotope (A et B), du Forgut (C) et du Hindgut (D), de l'espèce d'*Holothuria poli*.

Tableau 1 : Prédateurs de certaines espèces d'holothuries (d'après Purcell *et al.*, 2016).

Tableau 2 : Nombre de colonies en Unité Formant Colonie (UFC/ml), au niveau du sédiment du biotope, du Forgut, et au niveau du Hindgut de l'espèce *Holothuria poli*.

Tableau 3 : Résultats de l'aspect macroscopiques des deux souches obtenues à partir du sédiment du biotope (SB1 et SB2), de la souche obtenue du Forgut (FG), ainsi que de la souche obtenue à partir du Hindgut (HG) de *Holothuria poli*.

Tableau 4 : Résultats de la coloration de gram des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Grossissement x100).

Tableau 5 : Résultats du test de catalase des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* [le test positif est mis en évidence par l'apparition des bulles (flèche rouge)].

Tableau 6 : Résultats de l'étude du type respiratoire des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Aérobie Stricte : AS ; Aérobie Anaérobie Facultative : AAF).

Tableau 7 : Résultats du test de mobilité des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli*.

Tableau 8 : Résultats globale des tests d'orientation des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB₁ et SB₂), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Aérobie Stricte : AS ; Aérobie Anaérobie Facultative : AAF).

Tableau 9 : Comparaison des résultats obtenus lors du présent travail, avec ceux des précédents travaux.

Résumé

Résumé

Les Holothurie aspidochirotés appelé communément « concombre de mer » sont des échinodermes très caractéristiques par leur comportement alimentaires « deposit feeders ». Ces animaux marins ont un potentiel aquacole assez important, ceci dans différentes régions du monde. Lors du présent travail, une caractérisation de la flore bactérienne du tube digestif de l'espèce *Holothuria poli* a été effectuée.

Le nombre de bactéries au niveau du Forgut (3.5×10^3 UFC/ml) est plus important par rapport celui du sédiment du biotope (0.5×10^3 UFC/ml) ; ce qui nous laisse supposé que *Holothuria poli* sélectionne les sédiments les plus riches en bactéries. La souche isolée à partir du Forgut appartient au genre *Micrococcus*, celle isolée à partir du Hindgut appartient à la famille des Entérobactériaceae ; tandis que celles isolées du sédiment du biotope, appartiennent à la famille des Entérobactériaceae ainsi qu'au genre *Neisseria*. Mis à part les *Neisseria*, les souches obtenues sont également observées chez d'autres espèces d'holothuries.

Mots clés : *Holothuria poli*, microflore digestive, sélectivité, Entérobactériaceae, *Micrococcus*, *Neisseria*.

Abstract

Aspidochirote holothurians commonly referred to as "sea cucumber" are echinoderms that are very characteristic of their "deposit feeders" behavior. These marine animals have a significant aquaculture potential, in different parts of the world. In this work, we performed a characterization of the bacterial flora of the digestive tract of *Holothuria poli*.

The number of bacteria at the Forgut (3.5×10^3 CFU/ml) is greater than that of the biotope sediment (0.5×10^3 CFU/ml); which suggests that *Holothuria poli* selects sediments that are rich in bacteria. The strain isolated from Forgut belongs to the genus *Micrococcus*, the one isolated from Hindgut belongs to the Enterobacteriaceae family; while those isolated from the sediment of the biotope, belong to the Enterobacteriaceae family as well as to the genus *Neisseria*. Except *Neisseria*, the strains obtained are also observed in other sea cucumber species.

Key words: *Holothuria poli*, digestive microflora, selectivity, Enterobacteriaceae, *Micrococcus*, *Neisseria*.

خاياريات البحر التي يشار إليها عادةً باسم "خيار البحر" هي شوكات الجلد التي تتميز بسلوكياتها على أنها "مغذيات" ، ولهذه الحيوانات البحرية إمكانية كبيرة للاستزراع المائي في مناطق مختلفة من العالم. في العمل الحالي ، تم إجراء

توصيف للبكتيريا النباتية للجهاز الهضمي للأنواع المرقمة *Holothuria poli*.

عدد البكتيريا على مستوى المعى الأمامي (3.5×10^3 UFC/ml) أكبر من عدد الرواسب المونل لأحيائي (0.5×10^3)

(UFC/ml) ، مما يشير إلى أن *Holothuria* تختار الرواسب الغنية بالبكتيريا. تنتمي السلالة المعزولة من المعى الأمامي

إلى جنس *Micrococcus* ، والتي معزولة من المعى الأخير تنتمي إلى أسرة *Entérobactériaceae* ، في حين تنتمي

تلك المعزولة من رواسب المونل لأحيائي إلى عائلة *Entérobactériaceae* في جنس *Neisseria*. بصرف النظر

عن *Neisseria* ، و يلاحظ أيضا سلالات تم الحصول عليها في أنواع خيار البحر الأخرى .

كلمات البحث *Holothuria poli* : ، بكتيريا معوية ، انتقائية ، *Entérobactériaceae* ، *Micrococcus* ، *Neisseria*

Introduction

Introduction

Les holothuries aspidochirotés font partie des espèces que l'on trouve le plus au sein du compartiment benthique de l'écosystème à *Posidonia oceanica* ; ces animaux marins sont d'une grande importance écologique, du moment qu'elles contribuent au recyclage de la matière organique et jouent un rôle important dans le réseau trophique détritivore de cet écosystème (Zupo et Fresi, 1984).

Les sédiments ingérés par les holothuries se composent principalement de matière inorganique (débris de corail, restes de coquillage, coralline, squelettes et restes inorganiques du benthos, silicates) de matière détritique organique (plantes marines, algues, animaux morts en décomposition), de microorganismes (bactéries, diatomées, protozoaires et cyanophycées), (Massin, 1982 ; Moriarity, 1982 ; Belbachir *et al.*, 2018). En Algérie, peu de travaux ont été effectués sur le comportement alimentaire des holothuries aspidochirotés ; entre autres, on peut signaler ceux de Mezali et Soualili, (2013) et Belbachir *et al.*, (2014). Ces auteurs ont constaté une certaine sélectivité chez différentes espèces d'holothuries aspidochirotés, au niveau de différentes zones de la côte Algériennes.

Les premières formes d'élevage d'holothuries ont été développées au Japon depuis le 18^{ème} siècle (Tanaka, 1992). Ces dernières années, l'holothuriculture occupe une place considérable dans la filière aquacole mondiale, mais en Algérie, cette filière n'a pas encore vu le jour. Au niveau des côtes algériennes, il existe certaines espèces d'holothuries à potentiel aquacole, tel que *Holothuria tubulosa*, *Holothuria arguinensis* et *Holothuria poli*. A partir de là, on estime qu'il est intéressant d'aborder des thématiques de recherche qui touchent à l'holothuriculture.

Les infections bactériennes sont les causes majeures de mortalité en holothuriculture. Pour faire face à ce problème et prévenir ces maladies, les aquaculteurs utilisent des probiotiques.

Toutefois, afin d'utiliser les probiotiques, il est important d'avoir des connaissances sur la flore bactérienne des holothuries. Dans cette optique, l'objectif de notre étude est d'avoir une idée sur la microflore du tube digestif d'une des espèces d'holothuries les plus abondantes de la côte de Mostaganem ; à savoir, *Holothuria poli*.

Chapitre I

Etude Bibliographique

I. Embranchement des Echinodermes

Le nom échinoderme vient de deux termes grecs : echinos (=épineux) et derma (=peau), ceci en raison des structures calcaires épineuses que l'on retrouve dans la peau ; ce terme désigne donc des animaux ayant une peau recouverte d'épines. Cependant pour certaines classes, la présence d'épines n'est pas évidente. Exclusivement marins et présent sous toutes les latitudes et à toutes les profondeurs, ils constituent l'un des phyla le mieux caractérisé du règne animal (Samynet *al*, 2006).

Ils ont tous une organisation à peu près équivalente et présentent des caractéristiques uniques :

- Symétrie pentaradiée (d'ordre 5) parfois masquée par une symétrie bilatérale,
- Squelette intradermique formé de nombreuses plaques ou spicules calcaires,
- Appareil aquifère encore appelé système ambulacraire. Celui-ci est formé d'un système de canaux internes connectés à des extensions externes. Cet appareil particulier n'existe dans aucun autre groupe du règne animal. Il assure principalement le mouvement et la nutrition des animaux.

Les échinodermes actuels sont répartis en cinq classes très différentes d'aspect : les astérides ou étoiles de mer (Classe Asteroidea), les ophiures (Classe Ophiuroidea), les échinides ou oursins de mer (Classe Echinoidea), les crinoïdes ou lys de mer (Classe Crinoidea) représentés par les comatules en milieu récifal et enfin les holothuries ou concombres de mer (Classe Holothuroidea)(Massin et Vanden Spiegel2006 ; Samynet *al*, 2006).

II. Les Holothuries

II.1. Classification

Les holothuries se distinguent des autres classes d'échinodermes par l'absence des plaques externes et par l'existence d'un squelette dermique ou endosquelette qui conserve chez l'adulte un état embryonnaire (Samynet *al.*, 2006). Cet endosquelette qui est constitué par des sclérites, est une caractéristique importante de la classe des holothuries (Hampton, 1958 ; Nichols, 1969). La classe des Holothuroidea (ou concombre de mer) compte environ 1693 espèces actuelles (Pauly et Hansson, 2013), qui se répartissent dans six ordres distincts : les Apodes, les Aspidochiotes, les Dactylochiotes, les Dendrochiotes, les Elasipodes et les Molpadides. Ces différents ordres se distinguent notamment par la présence ou l'absence de podia (pieds ambulacraires), de muscles rétracteurs buccaux, d'arbres respiratoires ainsi que par l'aspect des tentacules buccaux. L'identification des genres et espèces d'holothuries dépend de la morphologie et la taille des sclérites dans les différents tissus du corps et constituent donc des caractères clefs dans la détermination et la classification de ces espèces (Rowe, 1969 ; Samynet *al.*, 2006).

L'espèce faisant l'objet de notre étude, à savoir *Holothuria (Roweothuria) poli* Delle Chiaje, 1824, appartient à l'ordre des aspidochiotes, actuellement appelé Holothuriida (Miller *et al.*, 2017). Cet ordre rassemble des espèces aux tentacules buccaux peltés, au tégument épais et aux pieds ambulacraires disposés ventralement (Conand, 1990, 1994, 1998). *Holothuria poli* fait partie de la famille des Holothuriidae, caractérisée par des gonades constituées d'une seule touffe de tubules (Conand, 1998). La famille des Holothuriidae quant à elle, compte environ 170 espèces, pour la plupart tropicales (Rowe, 1969) dont 120 sont rattachées au genre *Holothuria*. Ce dernier est caractérisé par une face ventrale aplatie pourvue de

nombreux podia et une face dorsale arquée unie de papilles coniques plus ou moins développées.

II.2. Morphologie

Les holothuries (ou concombre de mer), présentent différents aspect morphologique (Fig. 01), mais généralement le corps des Holothuries peut être cylindrique, prismatique, déprimé, ovoïde ou vermiforme, mais sa forme varie suivant qu'il est contracté ou non.

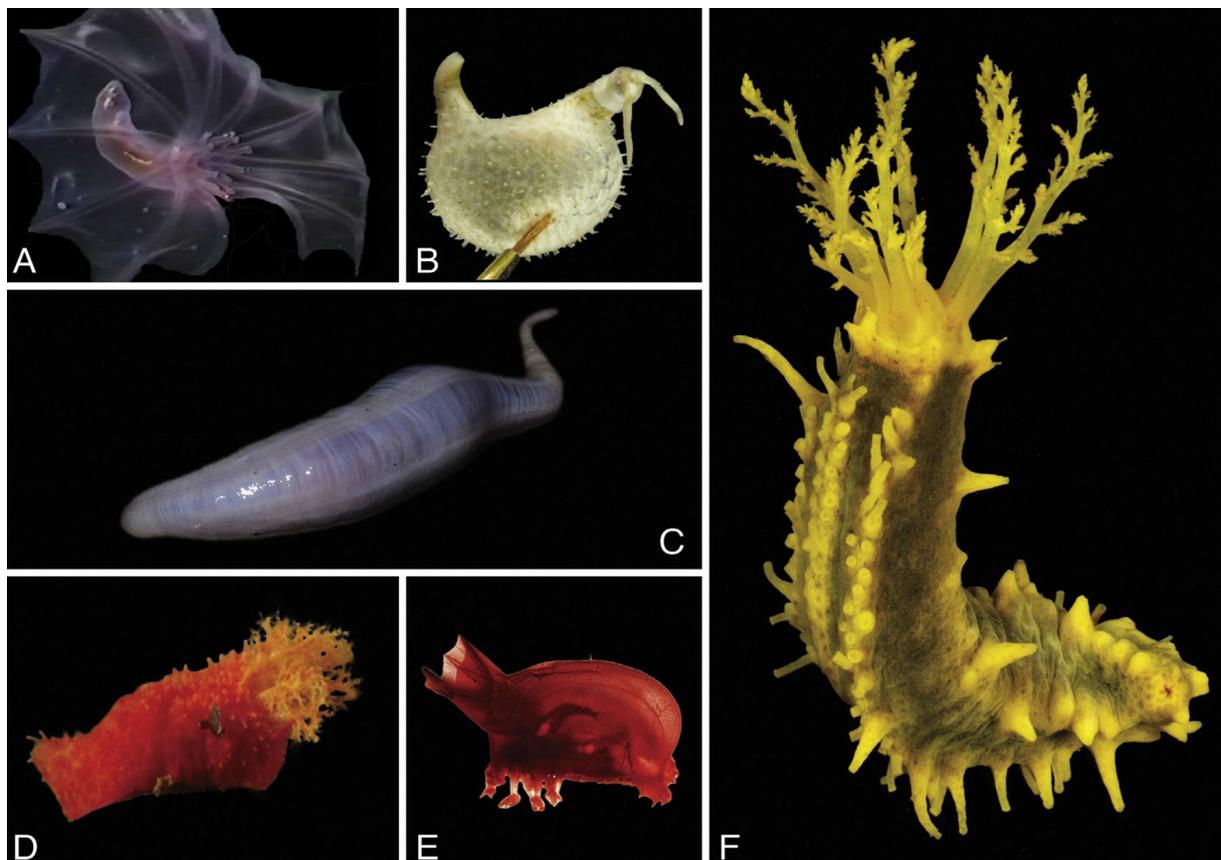


Figure 01 : Diversité Morphologique des Holothuroidea. *Pelagothurianatrix* (A), *Ypsilothuriabitentaculata*(B), *Paracaudinachilensis* (C), *Lissothurianutriens*(D), *Enypniasteseximia* (E), *Colochirusrobustus* (F) (Miller *et al.*, 2017).

La symétrie bilatérale qui se traduit extérieurement par la présence de pôles antérieurs (oral) et postérieur (aboral), est masquée par la disposition de 5 zones radiaires ou ambulacraires

alternant avec 5 zones inter radiaires ou inter ambulacraires qui s'étendent longitudinalement de la bouche à l'anus. Les zones ambulacraires sont aussi appelées radius. Trois de ces radius (trivium) sont situés sur la face ventrale qui peut être légèrement aplatie, tandis que les deux autres (bivium) sont situés sur la face dorsale ; la bouche et l'anus sont terminaux ou subterminaux sur la face dorsale ou ventrale (Fig. 02). Une couronne de 10 à 30 tentacules buccaux, de taille égale, est disposée en un seul cercle autour de la bouche. Ces tentacules buccaux ont une forme de bouclier ou de parapluie (avec une rosette de lobes à leur extrémité), arborescente (avec des ramifications primaires et secondaires), plumeuse (avec des prolongements des deux côtés) ou digitée (avec un petit nombre de prolongements en forme de doigt à leur extrémité). Les podias (Fig. 02), sont soit éparpillés sur toute la surface de l'animal, soit disposés en rangées plus ou moins régulières le long des radius ; ils peuvent manquer chez quelques espèces. Les podias dorsaux sont souvent coniques, sans ventouse, et sont alors appelés papilles (Fig. 02). Le tégument est souvent épais et dur, tandis que la forme des spicules dermiques est très variable et peut être utilisée comme caractère de détermination spécifique (Samynet *al.*, 2006 ; Tortonese *et* Vadon, 1987).

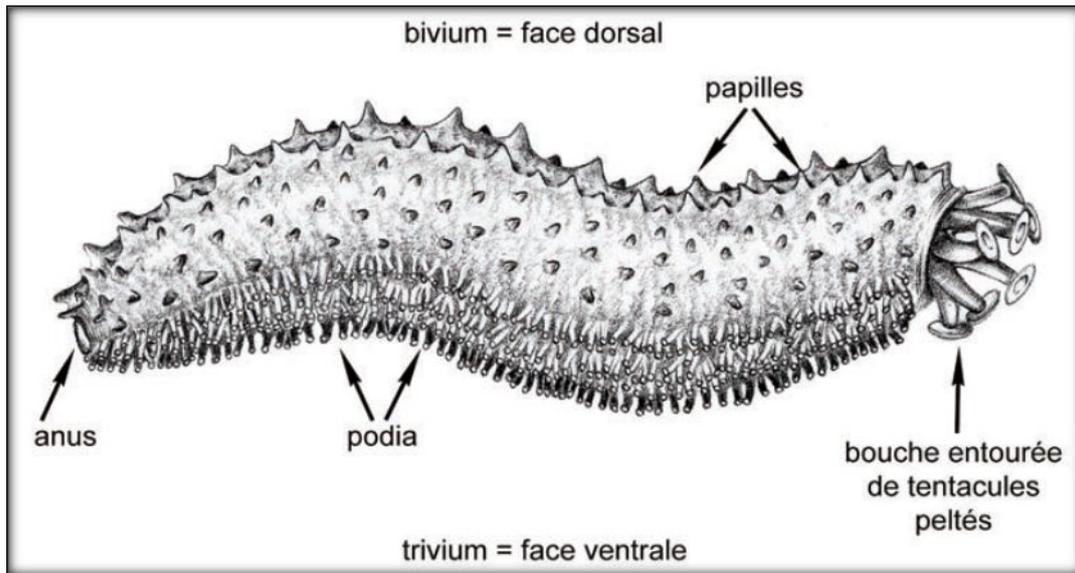


Figure 02 : Anatomie externe d'une holothurie aspidochirote (D'après Samynet *et al.*, 2006)

Podia et papilles sont en rapport avec les cinq canaux radiaires qui, avec l'anneau aquifère pourvu d'une ou plusieurs vésicules de Poli et de un ou de plusieurs canaux du sable, constituent le système aquifère (Fig. 03). Contrairement aux autres échinodermes, ce système s'ouvre la plupart du temps dans la cavité interne à hauteur de la plaque madréporique. De consistance souvent molle les holothuries ont un squelette réduit à une couronne calcaire péripharyngienne et à de microscopiques pièces calcaires, disséminées dans leur peau et autres tissus. La couronne est formée de pièces radiales et de pièces interradales macroscopiques. La réduction du squelette est largement compensée par le système musculaire. Ce dernier est constitué de cinq bandes musculaires longitudinales, en position radiale, qui sont antérieurement attachées aux pièces radiales de la couronne calcaire et postérieurement au cloaque via les muscles rétracteurs du cloaque (Samyn *et al.*, 2006).

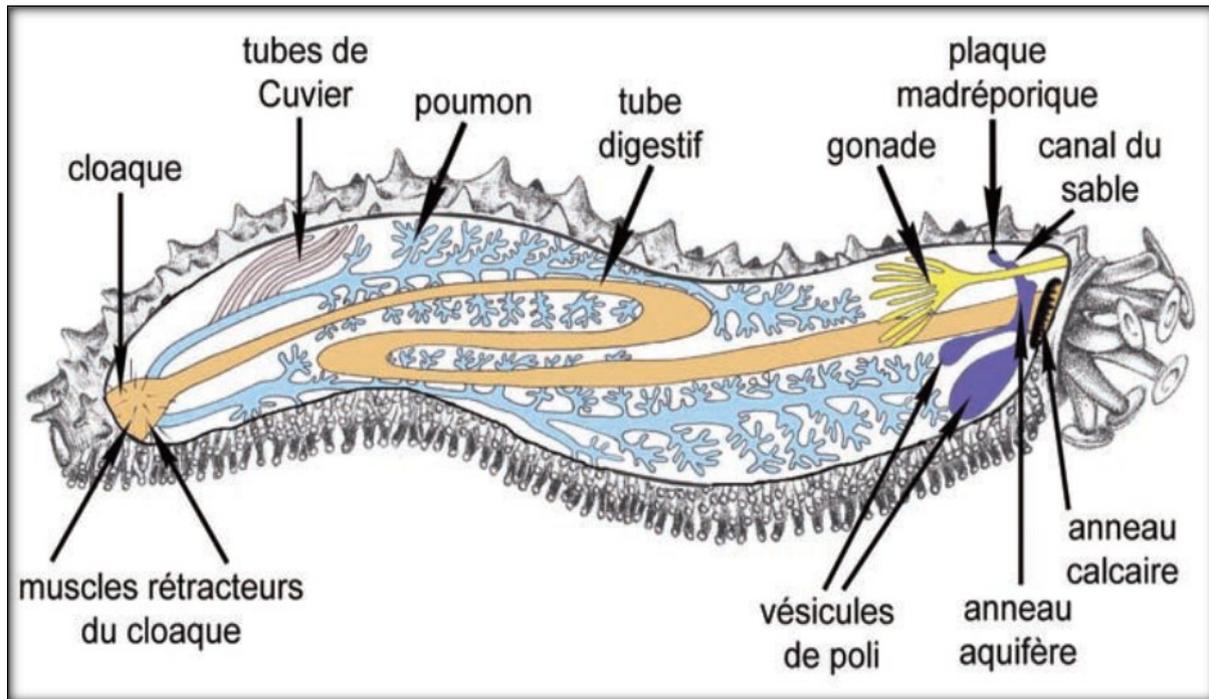


Figure 03 : Anatomie interne d'une holothurie aspidochirote (Samynet *al.*, 2006).

II.3. Système digestif

Le système digestif des Holothuries est formé d'un canal tubulaire. Il commence par une bouche sans dents plus au moins ronde entouré par une couronne de tentacules, qui servent à l'exploitation du sédiment et la capture de la nourriture. La bouche est suivie d'un pharynx et d'un œsophage ; l'intestin qui suit est très long, ceci pour optimiser la digestion d'une alimentation peu énergétique (la digestion peut durer jusqu'à 36 heures chez certaines espèces) ; le gros intestin se termine par une poche cloacale, où peuvent vivre certains symbiotes. L'épithélium n'est pas cilié et ne présente ni piquants ni plaques squelettiques. Ces dernières sont réduites à des sclérites dermiques non jointifs (Jans et Jangoux, 1990).

Il existe deux nomenclatures assignées aux différentes régions du tube digestif (Ferral et Massin, 1982). La première qui est plus détaillée, repose sur une étude de structures anatomiques et histologiques (Massin, 1979). La deuxième est plus sommaire, elle repose plutôt sur l'aspect fonctionnel et qui divise le tube digestif en trois parties (Ferral et Massin, 1982 ; Chekaba, 2002 ; Mezali *et al.* 2003).

Massin et Jangoux (1976) ont subdivisé le tube digestif en trois parties pouvant être caractérisées par leurs fonctions physiologiques respectives (Fig. 04). La première partie, zone de stockage du sable s'étend de la bouche au sphincter marqué par l'inversion des couches musculaires de la paroi digestive. La deuxième partie, zone digestive correspond au segment digestif entouré par le réseau admirable. La dernière partie, zone d'élimination se compose de la quasi-totalité du deuxième tronçon digestif descendant.

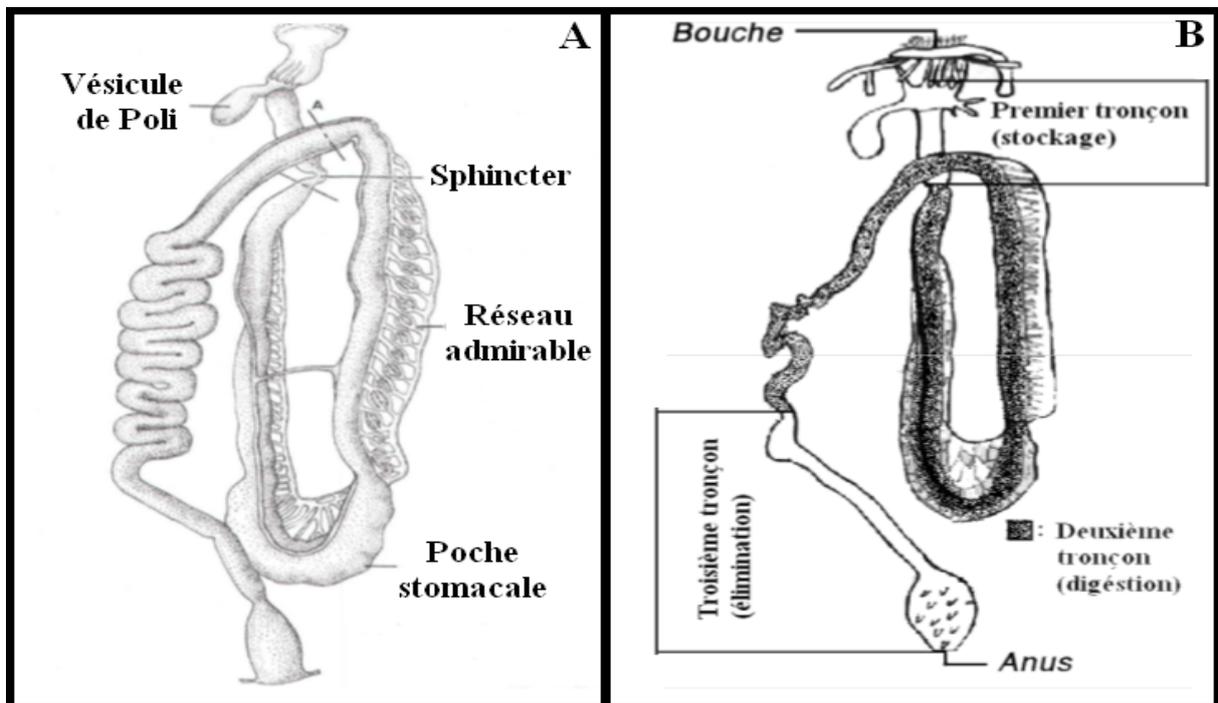


Figure 04 : Tube digestif d'une holothurie. Schéma générale (A) [D'après Oomen, (1926) In Massin et Jangoux, (1976)]. Différentes parties du tube digestif caractérisées par leurs fonctions physiologiques (B) (In Mezali, 1998).

II.4. Système reproducteur

Le système reproducteur est composé d'une gonade (mâle ou femelle) et d'un gonoducte débouchant sur le gonopore externe, situé à proximité de la bouche. La gonade se compose d'un grand nombre de tubes gonadiques ramifiés dont la partie distale flotte librement dans le coelome. Elle est soutenue du côté proximal par un mésentère relié à la partie antérieure du tube digestif : Les cellules reproductrices sont situées dans ces tubes gonadiques et seront relarguées à maturation (Neghli, 2014). Les organes génitaux se localisent dans la partie antérieure de la cavité coelomique. Les sexes sont séparés, mais il existe dans certains cas des espèces hermaphrodites. La couleur des gonades se diffère selon le sexe (Mezali, 1998).

Les holothuries sont généralement gonochoriques (à sexes séparés) et ne présentent pas de dimorphisme sexuel, ce qui rend impossible de reconnaître extérieurement les mâles des femelles (Battaglène, 1999a ; Mercier *et al.*, 2000b). La plupart des holothuries ont une reproduction sexuée à fécondation externe : elles libèrent les gamètes dans la colonne d'eau où se déroule la fécondation, qui augmente avec la taille de l'individu (Conand, 1993). Les œufs fécondés se transforment alors en larves pélagiques qui peuvent passer 50 à 90 jours dans le plancton où elles sont largement dispersées par les courants.

Certaines espèces sont cependant capables de multiplication par voie asexuée dans certaines conditions (Conand, 1989, 2006a ; Uthicke, 2001c). Ce mode de reproduction se fait surtout par scission transversale du corps. La plupart des espèces qui se reproduisent de la sorte le font en impliquant une torsion du corps et/ou un étirement (Uthicke, 2001c). Des études plus récentes ont montré qu'il serait possible de l'induire chez certaines espèces (Reichenbach et Holloway, 1995).

II.5. Écologie

II.5.1. Habitat et répartition géographique

Les holothuries se trouvent dans de nombreux biotopes marins à toutes les latitudes, des zones intertidales aux plus grandes profondeurs (Hyman, 1955 ; Conand, 1990, 1994). Elles sont généralement benthiques à l'exception de certaines Elaspodes pélagiques. Bien que certaines espèces se trouvent sur les substrats durs (roches, anfractuosités, récifs coralliens) ou en épibiose sur des végétaux ou des invertébrés, elles sont surtout caractéristiques des fonds meubles, pouvant vivre soit à leur surface, soit, de manière temporaire ou permanente, dans le sédiment, n'exposant que leurs tentacules (Hyman, 1955 ; Conand, 1990).

La répartition des différents groupes dans les zones littorales est marquée par la prédominance de l'ordre des Aspidochirotes dans les zones intertropicales et celle des Dendrochirotes aux latitudes tempérées et élevées. La diversité est maximale dans les zones littorales tropicales (Conand, 1994).

Certaines espèces nécessitent des eaux très pures, comme *Thelenota ananas* ; alors que d'autres préfèrent les eaux turbides, comme *Bohadschiavitiensis*. Plusieurs espèces tolèrent même des seuils de pollution importants. Les espèces pourvues de puissants podia sont plus souvent adaptées à des courantologies importantes, alors que d'autres comme *Synap maculatané* nécessitent des eaux calmes. Certaines espèces comme *Actinopygaechinites* tolèrent même de passer plusieurs heures à l'air libre, pendant les marées basses.

II.5.2. Le déplacement

Le déplacement des holothuries est peu connu à ce jour. Généralement considérées comme sédentaires, certaines espèces peuvent cependant se mouvoir relativement rapidement par contractions musculaires. Plusieurs espèces présentent des rythmes nycthéméraux en relation avec leur nutrition.

Différentes études ont permis de déterminer la vitesse moyenne de certaines espèces. Une des plus rapide, trouvées dans la littérature, est *Stichopusparvimensis* avec une vitesse sur substrat sableux de 50 cm/heure (Muscat, 1983). Ces vitesses maximales sont généralement atteintes en situation de fuite (Kropp, 1982).

II.5.3. Moyens de défense

II.5.3.1. Toxines

Les holothuries ont la particularité de dégager en permanence des toxines appelées saponines. Ces toxines sont cytotoxiques et hémolytiques, donc dangereuses pour la plupart des poissons, ce qui fait que les holothuries adultes ont généralement peu de prédateurs. Suivant l'espèce et la condition des individus, ces toxines sont présentes en plus ou moins grande quantité et plus ou moins efficaces.

II.5.3.2. Tubes de Cuvier

Lorsqu'elles sont inquiétées, certaines holothuries appartenant toutes à la famille des Holothuriidae peuvent émettre de longs filaments collants appelés tubes de Cuvier (Fig. 05) : expulsés par l'orifice cloacal, le réseau de filaments quiescents s'allonge de 20 à 30 fois et devient collant, immobilisant l'ennemi : poisson, crabe, gastéropode ou étoile de mer. Les Polynésiens se servent de ces filaments, en les enroulant sur leurs pieds, pour marcher sur les

récifs de coraux. Après expulsion, l'holothurie met de deux semaines à cinq semaines pour régénérer ses tubes.



Figure 05 : *Holothuria forskali* lâchant des tubes de Cuvier (Fleche).

II.6. Régime et comportement alimentaire

Les holothuries aspidochirotés ingèrent le sédiment superficiel ; celui-ci se compose essentiellement de matières inorganiques (débris de corail, restes de coquillages, corallines, tests de foraminifères, restes inorganiques du benthos). De matières détritiques organiques (phanérogames marines notamment des feuilles mortes de posidonies ou en dégradation, algues, animaux morts en décomposition), de microorganismes (bactéries, diatomées, protozoaires et cyanophycées), ou de boulettes fécales expulsées par l'holothurie elle-même ou par d'autres animaux ; la matière détritique constitue la part la plus importante du carbone organique assimilé (60 à 70%) (Massin, 1982a ; Moriarty, 1982 ; Robert *et al.*, 2000 ; Belbachir *et al.*, 2018, 2019).

Le sédiment avalé par les holothuries transite dans le tube digestif, ce dernier présente trois tronçons dont chacun correspond à une fonction spécifique : le tronçon de stockage "Foregut", qui est capable d'emmagasiner de grandes quantités de sable ; le tronçon digestif "Midgut", à partir duquel se fait l'extraction et l'absorption de la matière organique ; enfin le tronçon

d'élimination "Hindgut", ou se condense les chapelets de pelotes fécales (Mezali, 2008) (Fig. 04). Après avoir transité dans le tube digestif, le sédiment passe dans le cloaque et est rejeté par l'anus sous forme de fèces (Sloan, 1979 ; Massin, 1982a).

II.7. Symbioses et commensalismes

De très nombreux petits animaux ainsi que certains parasites, peuvent vivre en symbiose ou en commensalisme avec les holothuries. Certaines crevettes nettoyeuses, notamment plusieurs espèces du genre *Periclimenes* (genre spécialisé dans les échinodermes) dont *Periclimenes imperator* vivent sur le tégument des holothuries.

Le commensalisme est fréquent dans la cavité cœlomique des grosses holothuries tropicales. On y trouve notamment plusieurs espèces de crabes et de crevettes nettoyeuses pouvant entrer et sortir librement de l'anus, comme le crabe *Lissocarcinus orbicularis* qui peut même vivre dans la bouche de certaines espèces tropicales. Certains petits poissons comme les Carapidae séjournent et circulent librement dans l'anus et parfois une partie du tube digestif des grosses holothuries, où ils trouvent un abri mais aussi une aire de reproduction pour certaines espèces, qui peuvent y habiter en couple. Certains de ces Carapidae sont cependant des parasites délétères, comme les *Encheliophis* qui se nourrissent des organes internes des holothuries. Certaines espèces d'holothuries peuvent réguler leurs hôtes internes grâce à des dents anales. D'autres endocommensaux comme les bivalves du genre *Entovalva* vivent dans l'œsophage des holothuries.

Plusieurs parasites vivent accrochés sur le tégument des holothuries, comme des gastéropodes ectoparasites de la famille des Eulimidae (par exemple *Melanella* sp. ou *Stilapex* sp.). Sans que la nature de l'association soit encore complètement élucidée, il existe sur le tégument

d'holothuries des observations de plusieurs espèces vers polychètes (notamment des Polynoidae).

II.8. Prédateurs

Les holothuries sont évitées par la plupart des prédateurs marins en raison des toxines qu'elles contiennent (notamment l'holothurine) et de leurs moyens de défense parfois spectaculaires. Cependant, elles demeurent la proie de certains prédateurs très spécialisés qui ne craignent pas leurs toxines (Tab. 01). D'autres prédateurs plus généralistes et opportunistes peuvent aussi parfois s'en prendre aux holothuries les moins bien défendues faute de mieux, comme certains poissons (balistes, poissons-globes...), étoiles de mer et crustacés (crabes, langoustes).

Tableau1 : Prédateurs de certaines espèces d'holothuries (d'après Purcell *et al.*,2016).

Prédateurs	Proies
Annelida:Polychaeta	<i>Cucumariafrondosa</i>
Crustacea	
Copepoda	<i>Apostichopusjaponicus</i> (forme larvaire)
Decapoda	<i>Psoluschitonoides</i> <i>Holothuria scabra</i>
	<i>Apostichopusjaponicus</i> <i>Holothuria scabra</i>
	<i>Stichopustremulus</i> <i>Parastichopuscalifornicus</i>
Gastropoda	

Tonnidae	various species <i>Holothuria poli</i> <i>Holothuria tubulosa</i> <i>Holothuria forskali</i> <i>Holothuria sanctori</i>
<i>Tonna galea</i> <i>Tonna galea</i> <i>Tonna galea</i> <i>Tonna galea</i>	
Columbellidae	<i>Psolus chitonoides</i>
Ranellidae	<i>Apostichopus japonicus</i> <i>Bohadschia argus</i>
Asteroidea	various species <i>Holothuria scabra</i> <i>Cucumaria frondosa</i> <i>Apostichopus japonicus</i>

Tableau 1 (suite) :Prédateurs de certaines espèces d'holothuries (d'après Purcell *et al.*,2016).

Prédateurs	Proies
Poisson	
Elasmobranchii	<i>Stichopus chloronotus</i>
Actinopterygii	
Balistidae	<i>Holothuria scabra</i>
Labridae	<i>Holothuria scabra</i> <i>Holothuria poli</i>
Lethrinidae	<i>Holothuria scabra</i>
Nemipteridae	<i>Holothuria scabra</i>
Sparidae	<i>Cucumaria</i> sp.
Gadidae	<i>Stichopus tremulus</i> <i>Parastichopus californicus</i>

Cependant, le principal prédateur actuel des holothuries reste l'Homme : de nombreuses espèces sont intensément pêchées et braconnées pour alimenter le marché asiatique, et plusieurs ont connu un effondrement spectaculaire de leur population, avec parfois des conséquences néfastes sur les écosystèmes.

II.9. Intérêt des holothuries

II.9.1. Intérêts environnementaux

Par leurs activité de bioturbation (remaniement, brassage ou mélange de couches de sédiments par des organismes vivant), les holothuries aspidochirotés peuvent jouer un rôle important dans la redistribution des sédiments de surface (Uthicke, 1999), ce qui peut avoir un effet sur le taux de reminéralisation de la matière organique, ainsi que sur le flux des nutriments inorganique (Reise, 2002 ; Lohreret *al.*, 2004). Ces organismes rejettent des excréments qui sont généralement moins riche en matières organiques que les sédiments consommés ; ce qui leurs donnent un rôle de nettoyeurs de sédiments (Michioet *al.*, 2003 ; Paltzatet *al.*, 2008 ; MacTavishet *al.*, 2012 ; Yuan *et al.*, 2015).

II.9.2. Utilisation médicinale et pharmaceutique

En Chine, une vingtaine d'espèces d'holothuries comestibles sont considérées depuis longtemps comme des médicaments traditionnels (Chen, 2004) ; alors qu'en Malaisie, certaines espèces sont utilisées pour la guérison de blessure, le traitement d'ulcère de l'estomac et comme calmant (Poh-Sze, 2004). A partir de là, on peut constater que les holothuries sont également exploitées pour leurs propriétés médicinales. Sans cholestérol, avec une teneur élevée en protéine (55 % du poids sec du corps) et contenant 10-16 type de polysaccharides et des saponines, les concombres de mer aideraient à réduire les douleurs arthritiques (Poh-She, 2004). Les saponines (toxiques en doses importantes) qu'ils renferment,

présenteraient des propriétés anti-inflammatoires et anticancéreuses (Awaluddin, 2001). Les holothuries possèderaient en outre des agents antibactériens et antifongiques (Poh-Sze, 2004). Le liquide coelomique de certaines espèces d'holothuries présenterait aussi une activité antioxydante (Hawaet *al.*, 1999).

II.9.3. Alimentation humaine

Les holothuries constituent une nourriture traditionnelle dans plusieurs pays d'Asie (Conand, 1990, 2004, 2006a, 2006b). En Chine, le tégument cuit et séché, connu sous le nom de « bêche-de-mer » ou « trévang » est très prisé pour ses propriétés curative et médicinale (Preston, 1993). Au Japon et en Corée, les holothuries se mangent crues ou après des préparations très simples (Conand, 1990). Dans quelques pays du Pacifique Sud, le tégument et les viscères sont consommés frais, cuits, salés ou séchés (Shelley, 1985 ; Yanagisawa, 1996). Au Japon, les holothuries appelées localement « namako » découpées en fines tranches, peuvent aussi être trempées dans un mélange de vinaigre et de sauce de soja (Akamine, 2004). D'autres organes, comme les ovaires, les arbres respiratoires et les intestins, regroupés sous le nom général de « konowata », sont aussi appréciés par les fins gourmets asiatiques (Conand, 1990).

Dans certains pays, les holothuries constituent la ressource halieutique, la plus importante, pour l'économie de produits de la mer autres que les poissons. La majorité des holothuries sont récoltées et exportées afin d'approvisionner le marché de la « bêche-de-mer », qui constitue le produit le plus utilisé dans les repas à base d'holothuries (Samynet *al.*, 2006). Certaines espèces d'holothuries atteignent un prix de 15-40 USD le kilogramme (Bruckner, 2005).

III. La flore digestive des invertébrés marins

III.1. Généralités

Le tube digestif de la plupart des invertébrés marins héberge une microflore particulière, composée d'une communauté assez complexe de micro-organismes (Smith et Douglas, 1987) ; ces derniers sont de deux types : transitoires et résidentes. Possédant des mécanismes d'adhésion à la paroi du tube digestif qui les empêchent d'être expulsées, la majorité des micro-organismes résidents n'est par conséquent pas éliminé du tube digestif (Harris, 1993). Ceux transitoire, quant à eux, sont ingérés avec la nourriture, résistent au passage à travers le tube digestif et sont éliminés avec les fèces.

Parmi les micro-organismes du tube digestif, les bactéries constituent des membres importants ; celles autochtones du tube digestif sont généralement un mélange de bactéries résidentes et transitoire ; dont la majorité sont ingérées lors de l'alimentation des invertébrés marins (Plotieau, 2007). Les bactéries ingérées peuvent être lysées dans le tube digestif ; dans ce cas les invertébrés peuvent soit absorbés les nutriments, ou en bénéficier des enzymes libérées. Certains des enzymes libérées après la lyse des bactéries, peuvent rester actives et conférer à l'invertébré marin de nouvelles propriétés digestives.

Les bactéries ingérées peuvent fortement croître dans le tube digestif de certains invertébrés. En effet, des études ont montré l'importance de l'abondance des bactéries dans le tube digestif de certaines Holothuries abyssales, par rapport à l'abondance des bactéries de la nourriture avant ingestion (Deming et Colwell, 1981, 1982 ; Deming *et al.*, 1981). L'hôte peut simplement être un incubateur fournissant des conditions stables pour les bactéries et ne pas bénéficier de l'augmentation du nombre de ces bactéries. Dans d'autres cas, le nombre de bactéries présente une diminution de la partie antérieure vers la partie postérieure du tube digestif chez les détritivores aquatiques (Baker et Bradnam, 1976).

III.2. Les types de bactéries digestives chez les invertébrés marins

La plupart des bactéries du tube digestif des invertébrés marins sont anaérobies facultatives. Cependant, des bactéries aérobies et anaérobies obligatoires peuvent parfois être présentes. La majorité des bactéries associées au tube digestif des invertébrés marins sont gram-, mais certains d'entre elles sont gram+. Certaines des bactéries du tube digestif d'invertébrés marins permettent la fermentation (Prieur, 1981).

Les genres les plus communément présents au sein de tube digestif des invertébrés marins sont : *Vibrio* et *Pseudomonas*. Les genres *Flavobacterium*, *Aeromonas* et *Micrococcus* sont présents dans une moindre mesure, mais ils sont toutefois bien représentés (Plotieau, 2007).

III.3. La flore bactérienne du tube digestif des holothuries

C'est dans les années quatre-vingt que les premiers travaux ayant abordés la flore bactérienne du tube digestif des holothuries ont vues le jour. La première étude est celle de Sun et Chen (1989), ces auteurs ont isolé 11 genres bactériens provenant de la partie antérieure et de la partie postérieure du tube digestif, ainsi que du liquide cœlomique et du tégument de l'espèce *Stichopusjaponicus*. Les bactéries isolées appartenaient aux genres : *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Actinobacter*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Xanthomonas*, *Corynebacterium*, *Caulobacteretalcaligenes*. La seconde étude est celle de Ralijaona, (1980) ; c'est une caractérisation phénotypique des bactéries du tube digestif d'*Holothuria tubulosa*, ce qui a permis de mettre en évidence au sein du tube digestif de cette espèce d'holothurie, des bactéries proches des *Vibrio* et des *Pseudomonas*.

Une caractérisation génotypique de la flore digestif de l'espèce *Holothuria atra*, a été réalisée par Ward-Rainey *et al.*, (1996). L'analyse de la composition bactérienne du tube digestif a été réalisée par séquençage de cultures bactériennes ; le nombre total des bactéries isolées a été de

34 et appartenait aux groupes des Actinomycetales, \pm -Protéobactérie, β -Proteobactéries et *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB). Parmi ces bactéries, les genres *Vibrio* (les plus abondants avec 65% des bactéries isolées) et *Pseudomonas* ont également été mis en évidence. Selon Ward-Rainey *et al.*, (1996), le nombre de bactéries augmente dans la partie terminale du tube digestif (Hindgut), par rapport à la partie antérieure (Foregut). Plus récemment, Plotieau *et al.*, (2013), avaient isolés 116 bactérie à partir du sédiment du tube digestif de l'espèce *Holothuria scabra* ; ces bactéries appartiennent aux groupes des : β -Proteobacteria (60.5 %), \pm -Proteobacteria (24.5 %), Bacteroidetes (6 %), Actinobacteria (2.75 %), Fusobacteria(1.75 %), Firmicutes (1.75 %), Cyanobacteria (1.75 %) et des γ -Proteobacteria (1 %). La communauté microbienne des sédiments est modifiée lors de son transit le long du tube digestif d'*Holothuria scabra*, ce qui mène à supposer que cette espèce d'holothurie joue un rôle important dans la structuration des communautés bactériennes de l'interface eau-sédiment Plotieau *et al.*, (2013).

Chapitre II

Matériels et méthodes

II. Présentation de la zone côtière de Mostaganem

Le plateau de Mostaganem est situé à une centaine de kilomètres à l'est d'Oran ; cette zone d'une superficie de 682Km² est comprise entre :

- La vallée du Chélif à l'est,
- Les monts de Belhacel au sud,
- La Méditerranée au nord,
- La dépression de la Mactaa au l'ouest.

II.1. Hydrodynamisme

Le courant dominant au large de la région côtière de Mostaganem est d'origine atlantique. Ce courant d'une épaisseur moyenne de 200Km, pénètre par le détroit de Gibraltar et coule au niveau des côtes algériennes où il prend le nom de courant algérien. La veine de courant devient instable, formant des tourbillons cycloniques de 100Km de diamètre associés à des remontées importantes d'eau profondes, ce qui rend ces zones très productives (Milot, 1987b).

II.2. Température

Lalami-Taleb (1970), montrent que les couches superficielles sont directement influençables par les températures externes en raison des échanges thermiques entre le milieu interne et l'air ambiant, leur température varie entre 21° C et 27° C en moyenne. Les maxima de températures se situent en été (mois d'Aout) et se prolongent jusqu'au mois d'Octobre ; alors que les températures minimales se situent aux mois de février-mars. En profondeur, les températures sont plus basses et relativement stables, fluctuant entre 13° C et 14° C en toute saison.

III. Présentation du site de prélèvements

L'échantillonnage a été réalisé au niveau d'un site du littoral de Mostaganem, à savoir la Salamandre (Fig. 06) ; ce site d'étude est situé à 5 km à l'Ouest du chef-lieu de la wilaya de Mostaganem. Salamandre est une plage à caractère rocheux, qui a une orientation vers l'ouest (coordonnées géographiques : 35° 55' N / 0°03'E).



Figure 06 : Situations géographiques du site Salamandre(Source : Google earth).

Par ailleurs, la proximité de la zone industrielle de Mazagran dont les terminaux de canalisation de déchets industriels débouchent à environ 1km à l'ouest. L'impact sur l'environnement de ces effluents liquides rejetés dans la mer est très ressentie (Benhamidi, 2002).L'aspect sous-marin de la zone d'étude est également caractérisé par un herbier à *Posidonia oceanica* installé sur substrat rocheux.

IV. Prélèvements et traitement des échantillons

L'échantillonnage a été réalisé pendant le mois de Juin 2018, par plongée en apnée à 3m de profondeur. Un seul individu d'*Holothuria poli* a été prélevé (Fig. 07), ainsi que les premiers millimètres du sédiment du biotope au niveau duquel se trouve cet individu. Les échantillons

ont été transportés dans une glacière à 4 °C, afin que l'échantillon ne soit pas endommagé ou modifié lors du transport.



Figure 07 : Individu de l'espèce *Holothuria poli*.

Au laboratoire, l'individu d'*Holothuria poli* est soigneusement disséqué dans des conditions aseptiques. Le tube digestif de l'individu est ouvert par une incision longitudinale et le contenu digestif des deux tronçons antérieure (Foregut) et postérieure (Hindgut) sont soigneusement collectés (Fig.08), puis mis séparément dans des boîtes pétri.

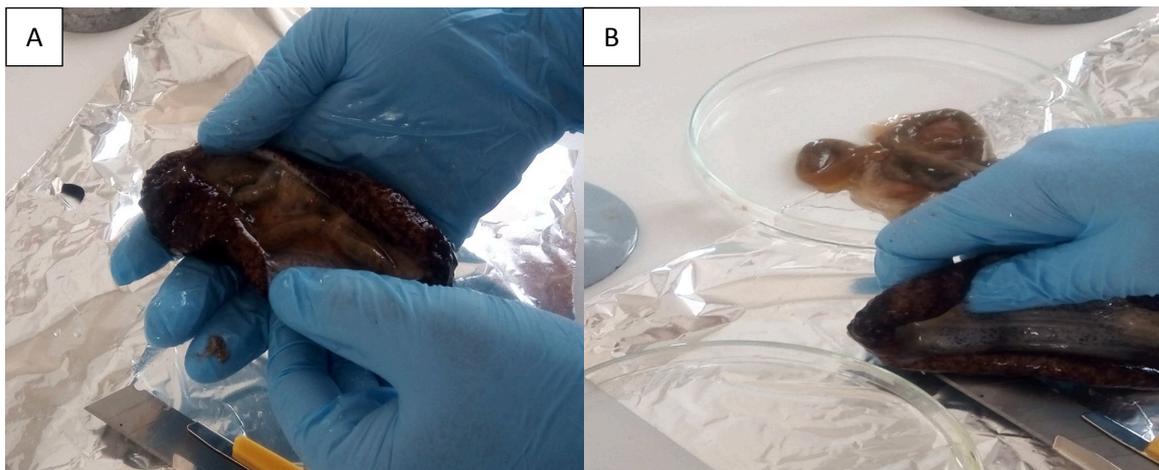


Figure 08 : Dissection de l'individu d'*Holothuria poli*. Incision longitudinale de l'individu (A) ; prélèvement du tube digestif (B).

V. Analyses microbiologique

L'étude microbiologique a pour but de mettre en évidence les microorganismes présents dans les sédiments des deux tronçons antérieure (Forgut) et postérieure (Hindgut) du tube digestif de l'espèce étudiées, ainsi que dans le sédiment de son biotope. Pour cela nous avons réalisé un isolement et une purification des souches distinctes, suivie d'une caractérisation macroscopique, microscopique et biochimique. Le dénombrement et la culture de cette flore bactérienne ont été effectués sur gélose nutritive.

V.1. Isolement et purification des souches bactériennes

V.1.1. Préparation de l'eau physiologie

Mettre 4,5g de NaCl dans un 500 ml d'eau distillée, puis on porte lentement la solution à ébullition sous agitation constante avec un barreau magnétique et la maintenir durant le temps nécessaire jusqu'à dissolution (Fig. 09). Ensuite, on fait répartir la solution dans des tubes à essai ; chacun des tubes contient un volume de 4.5ml. Enfin, les tubes à essais contenant l'eau physiologique sont stérilisée à l'autoclave pendant une durée de 30mn.

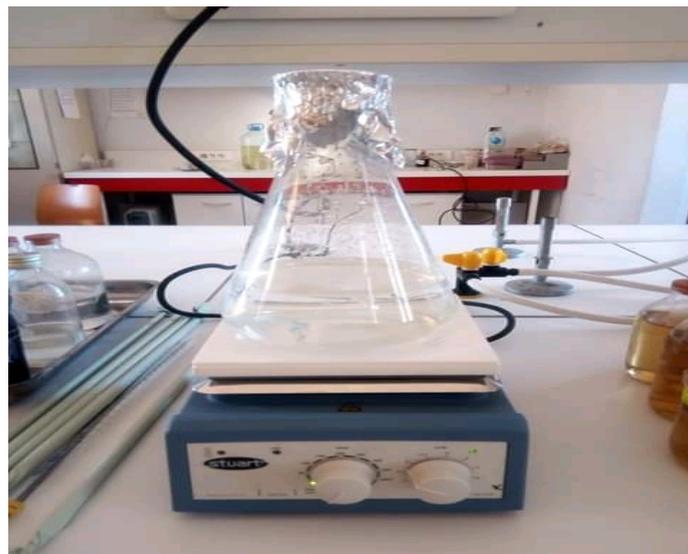


Figure 09 : Préparation de l'eau physiologique.

V.1.2. Préparation de la solution mer

Dans des conditions aseptiques, un sous échantillon de 0.5g a été prélevé à partir du sédiment du contenu digestif des deux tronçons du tube digestif, ainsi qu'à partir du sédiment du biotope de l'espèce étudiée (Fig. 10). Chaque sous échantillon est mis dans des tubes à essais contenant 4.5ml d'eau physiologique stérile, puis chaque tube à essai a été énergiquement agité pendant une durée de 2 minutes. A partir de là, on a pu obtenir une solution mer de chaque échantillon.



Figure 10 : Pesée des sous échantillons pour la préparation de la solution mer

V.1.3. Préparation des dilutions

D'abord, un volume de 0.5 ml de la solution mère de chaque échantillon a été ajouté dans des tubes à essai contenant 4.5ml d'eau physiologique stérile (Fig. 11) ; ceci représente la dilution 10^{-1} . Ensuite, un volume de 0.5 ml de la dilution 10^{-1} est ajouté à 4.5 ml d'eau physiologique stérile, ce qui correspond à la dilution 10^{-2} . On continue cette procédure jusqu'à l'obtention d'une dilution de 10^{-10} .



Figure 11 : Préparation des dilutions décimales.

V.1.4. Dénombrement des bactéries

V.1.4.1. Préparation de la Gélose Nutritive

La culture en surface d'un milieu gélosé, est recommandée lorsque la description des colonies peut être utile à l'identification des germes dénombrés. La gélose nutritive est un milieu riche permettant le développement de la plupart des microorganismes. Ce milieu comprend une peptone riche en acide aminés libre et de l'extrait de levure ; ce qui fournit au milieu de nombreux facteurs de croissance (Multon, 1994).

Afin de préparer notre milieu de culture, à savoir la gélose nutritive ; on a mis en suspension 1.5 g de milieu déshydraté dans 1.5 litre d'eau distillée. Ensuite, on porte le milieu de culture à ébullition sur une plaque chauffante, ceci sous agitation constante grâce à un barreau magnétique, durant le temps nécessaire jusqu'à sa dissolution complète. Une fois dissous, le milieu de culture est mis dans des bouteilles en verre de 250ml (Fig. 12). Enfin, le milieu de culture est stérilisé à l'autoclave pendant 30 minutes.

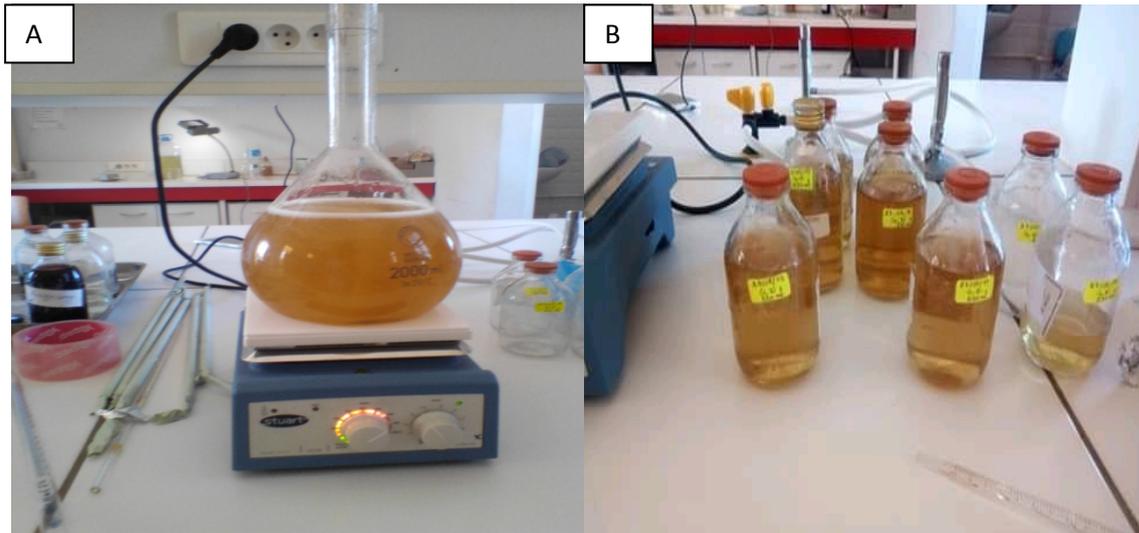


Figure 12 : Préparation de la gélose nutritive. Dissolution du milieu déshydraté (A), mise en bouteilles du milieu de culture (B).

Une fois la gélose nutritive prête, on la fait couler dans boîtes pétri stériles, ceci dans des conditions aseptiques bien sûr. Après avoir laissé solidifier le milieu sur une surface froide, toutes les boîtes pétri préparées ont été emballées dans du papier film et mises à l'étuve pendant une durée de 48h à 37°C (Fig. 13).

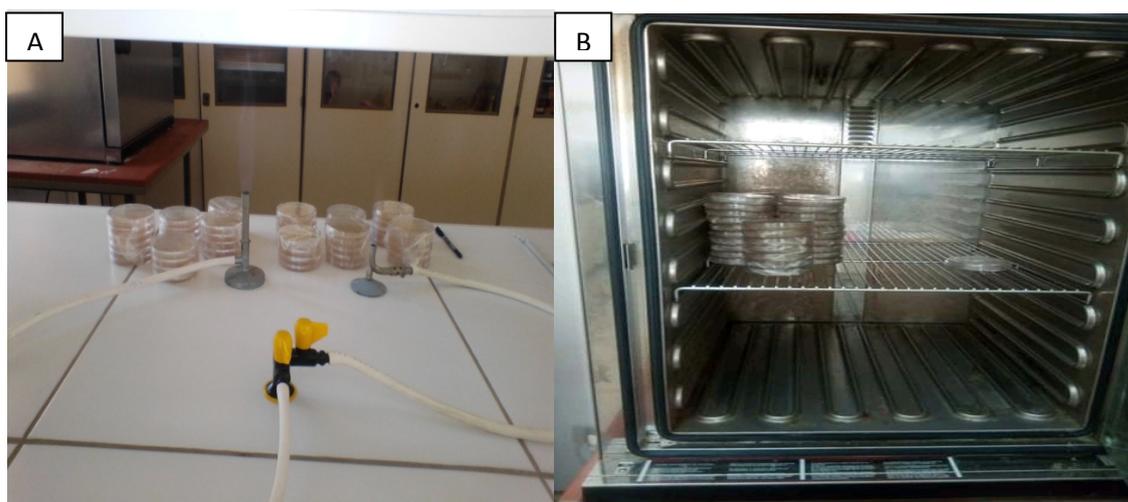


Figure 13 : Préparation des boîtes de pétri en vue de l'analyse microbiologique. Emballage des boîtes de pétri, dans du papier film (A), mise à l'étuve des boîtes de pétri (B).

V.1.4.2. Mode opératoire

Afin qu'on puisse effectuer le dénombrement à partir de chaque sous échantillon, on procède à un prélèvement de 100 μ l de chaque tube à essai (donc de chaque dilution préparée), à l'aide d'une micropipette (Fig. 14). Ensuite, on porte aseptiquement cette solution sur la boîte pétri contenant la gélose nutritive, puis étaler l'inoculum à l'aide d'une pipette râteau stérile à la surface de la gélose (Fig. 14). Enfin, on procède à l'incubation des boîtes pétri à une température de 30 °C, pendant 48h.

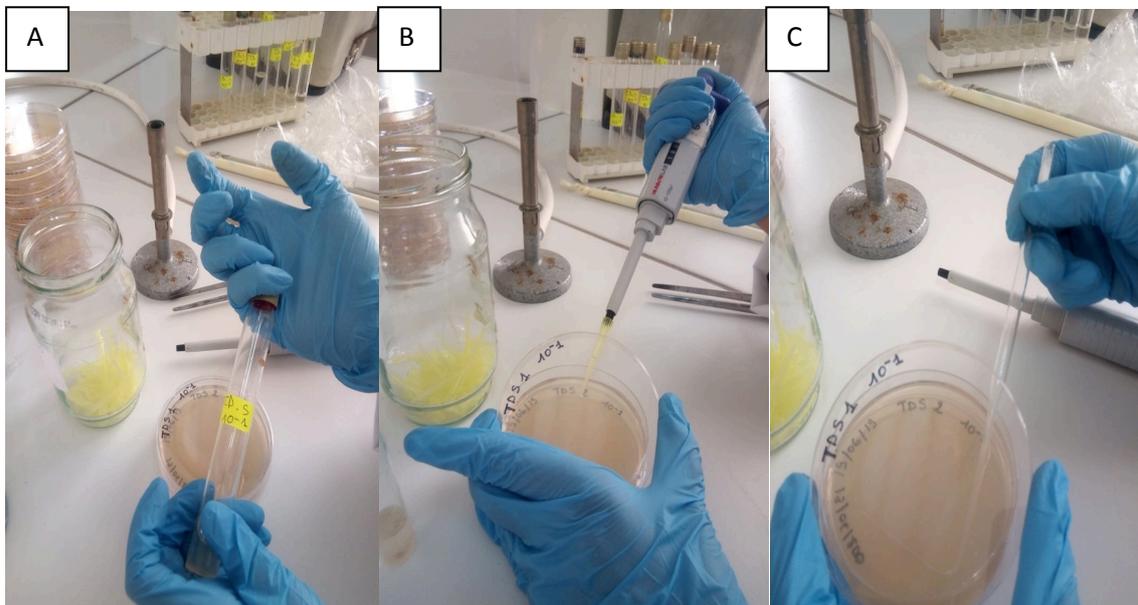


Figure 14 :Procédure effectuées avant le dénombrement des bactéries. Prise de l'inoculum à partir des dilutions (A) ; mise de l'inoculum sur la gélose nutritive (B) ; étalement de l'inoculum sur la gélose nutritive (C).

Après incubation, la lecture se fait par comptage visuel. Seules les boîtes pétries contenant entre 20 et 300 colonies sont prise en considération, lors du comptage. Le résultat est exprimé en UFC/ml (unités formant colonie par un volume de 1ml), dont la formule est la suivante :

UFC/ml = (Nombre de colonies x l'inverse de la dilution) / Volume réparti dans les boîtes pétri

V.1.5. Pré-enrichissement des bactéries

Au terme de cette phase non sélective, toutes les bactéries vont se multiplier. Les bactéries soumises à des conditions d'environnement très éloignées de celles de leur milieu de prédilection (ex : le tube digestif), récupèrent à l'issue de cette phase, leur faculté à se multiplier rapidement. Le bouillon nutritif est un milieu de pré-enrichissement largement utilisé pour la culture des micro-organismes peu exigeants ; il est composé d'NaCl, de Peptone et d'extrait de viande.

V.1.5.1. Préparation du bouillon nutritif

Mettre en suspension 3.5g de milieu déshydraté dans 250ml d'eau distillée. Ensuite, on porte lentement le milieu à ébullition sur une plaque chauffante ; ceci sous agitation constante moyennant un barreau magnétique et le maintenir durant le temps nécessaire jusqu'à sa dissolution (Fig. 15). Enfin, on procède à la répartition du bouillon nutritif dans des tubes à essais, puis les stérilisés à l'autoclave pendant 30mn.

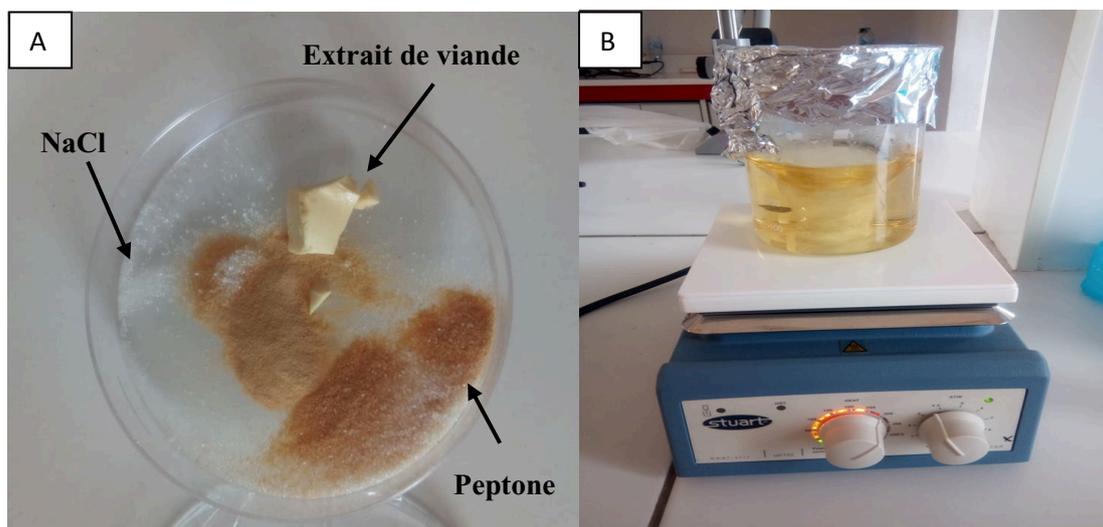


Figure 15 : Préparation du bouillon nutritif. Composition (A), mise en ébullition dans de l'eau distillée (B).

V.1.5.2. Mode opératoire

A l'aide d'une anse de platine stérilisée, on prélève une souche bactérienne à partir de chacun des différents échantillons (Forgut, Hindgut et substrat du biotope). Chaque souche est mise dans le bouillon nutritif, puis incubée 48h à 30°C. La croissance microbienne est mise en évidence par l'obtention d'une turbidité.

V.1.6. Isolement des bactéries

Cette technique permet de séparer les bactéries existantes dans les échantillons les unes des autres ; elle se fait par un ensemencement en stries sur un milieu solide (Fig. 16). Ce type d'ensemencement permet s'il est bien réalisé, d'obtenir des colonies isolées, donc d'obtenir des cultures pures d'une espèce bactérienne. Le principe de ce type d'ensemencement est d'épuiser un dépôt initial en faisant des étalements successifs dans différentes directions. Deux techniques sont couramment appliquées : 4 ou 5 étalements successifs ; elle se fait selon les étapes suivantes :

- Dépôt initial d'une goutte de la souche près d'un bord d'une boîte de gélose, à l'aide d'une anse de platine,
- Etalement de ce dépôt en réalisant des stries serrées sur environ 1/3 de la boîte,
- Stérilisation de l'instrument d'étalement, à savoir l'anse de platine,
- Etalement d'une partie des stries précédentes, après avoir fait tourner la boîte,
- Répétition des deux étapes précédentes 2 fois,
- Incubation à 30°C pendant 24h.

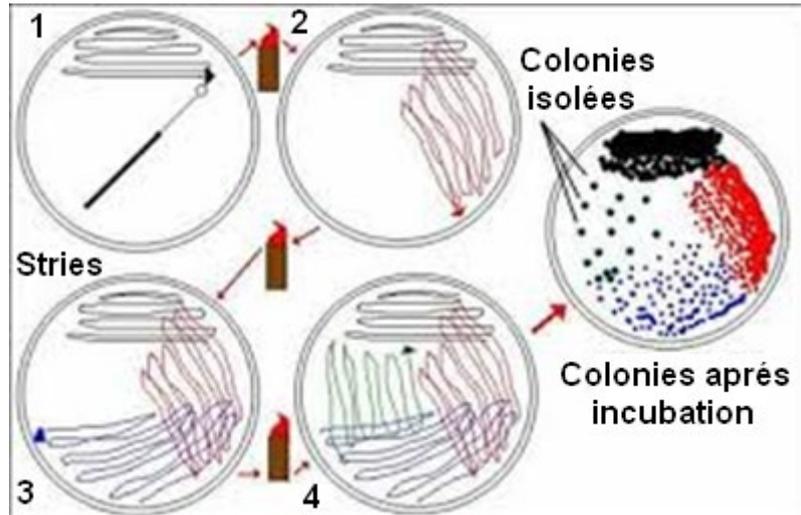


Figure 16 : Méthode d'ensemencement en stries.

Pendant l'incubation, chaque micro-organisme déposé se multiplie pour donner un clone de cellules identiques. Lorsque les microorganismes déposés sont suffisamment éloignés, le clone se développe abondamment pour produire une colonie. Ces colonies d'une souche pure, doivent toutes présenter les mêmes caractères. Si la technique est correctement réalisée et si le dépôt n'est pas trop important, après incubation, la boîte doit présenter des colonies isolées en son centre.

V.2. Caractérisation des souches

V.2.1. Etude morphologique

V.2.1.1. Aspect macroscopique

L'identification des bactéries est souvent entamée par une observation macroscopique à l'œil nu, des caractères cultureux. Cette étape consiste en une description des colonies obtenues sur le milieu de culture ; ceci on se basant sur certains caractères morphologiques proposés par Thomas *et al.*, (1970). Les caractères retenus lors du présent travail sont :

- La taille des colonies : Punctiforme (< 1mm de diamètre), non punctiforme (> 1mm),

- La forme : Circulaire, ondulée, filamenteuse, ou irrégulières,
- La couleur,
- L'aspect de contour : Régulier ou non régulier (dentelé, étoilé...),
- L'opacité : Transparente, translucide ou opaque,
- L'aspect de la surface : Lisse, sèche, rugueuse, brillante ou émoussé,
- La consistance : Visqueuse ou non visqueuse.

V.2.1.2. Aspect microscopique

La caractérisation microscopique des souches bactériennes consiste à réaliser certains tests d'observation et de coloration. Le test effectué lors de ce travail est la coloration de Gram.

❖ Coloration de Gram

Cette coloration va nous permettre de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour différencier entre les bactéries selon leurs formes, ainsi que leur affinité pour les colorants (Marchel, 1973). En effet, le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool (ou le mélange alcool + acétone) qui décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet. Pour ce faire, on suit les étapes suivantes :

1. Réaliser un frottis : On dépose une goutte d'eau sur une lame nettoyée à l'alcool, puis on touche une colonie moyennant une anse en platine préalablement stérilisée. Ensuite, on frotte l'anse sur la goutte d'eau et on laisse sécher à l'air. Enfin, on passe directement 3 fois la lame dans une petite flamme (veilleuse) du bec Bunsen pour fixer l'échantillon à la chaleur.

2. Coloration au violet de Gentiane : Déposer quelques gouttes de Violet de Gentiane sur la lame fixée, puis laisser agir pendant 1mn. A partir de là, toutes les bactéries sont colorées en violet. Ensuite, rincer très brièvement le frottis à l'eau,
3. Mordantage au Lugol : Déposer quelques gouttes de Lugol sur le frottis et le laisser agir environ 1mn. Le Lugol (composé iodé) est un mordant qui permet de fixer le violet dans les bactéries. Suite à cela, on jette la solution de Lugol dans un bécher et on rince brièvement à l'eau.
4. Décoloration à l'alcool : Couler une solution de décoloration (contient un mélange d'alcool et d'acétone) sur la lame jusqu'à ce que le violet ne s'écoule plus du frottis (5 à 10 secondes), puis rincer à l'eau. Les pores de la paroi des bactéries Gram+ sont fermés par la déshydratation à l'alcool ; la paroi est alors imperméable et le colorant violet reste dans les bactéries. Cependant, la membrane des bactéries Gram- est dissoute par le mélange alcool-acétone ; la paroi plus mince et de composition différente laisse alors sortir la coloration violette.
5. Contre coloration avec de la Safranine : Déposer la solution de safranine (rose) sur la lame pendant 1 minute. Ce colorant permet de visualiser les bactéries Gram-décolorées à l'étape précédente. Cette coloration moins forte que le violet n'affecte pas la couleur des Gram+. Enfin, on lave la préparation à l'eau.
6. Séchage et observation : Après séchage à l'air, la lame est observée au microscope optique avec un grossissement x40, puis x100, en ajoutant une goutte d'huile à immersion.

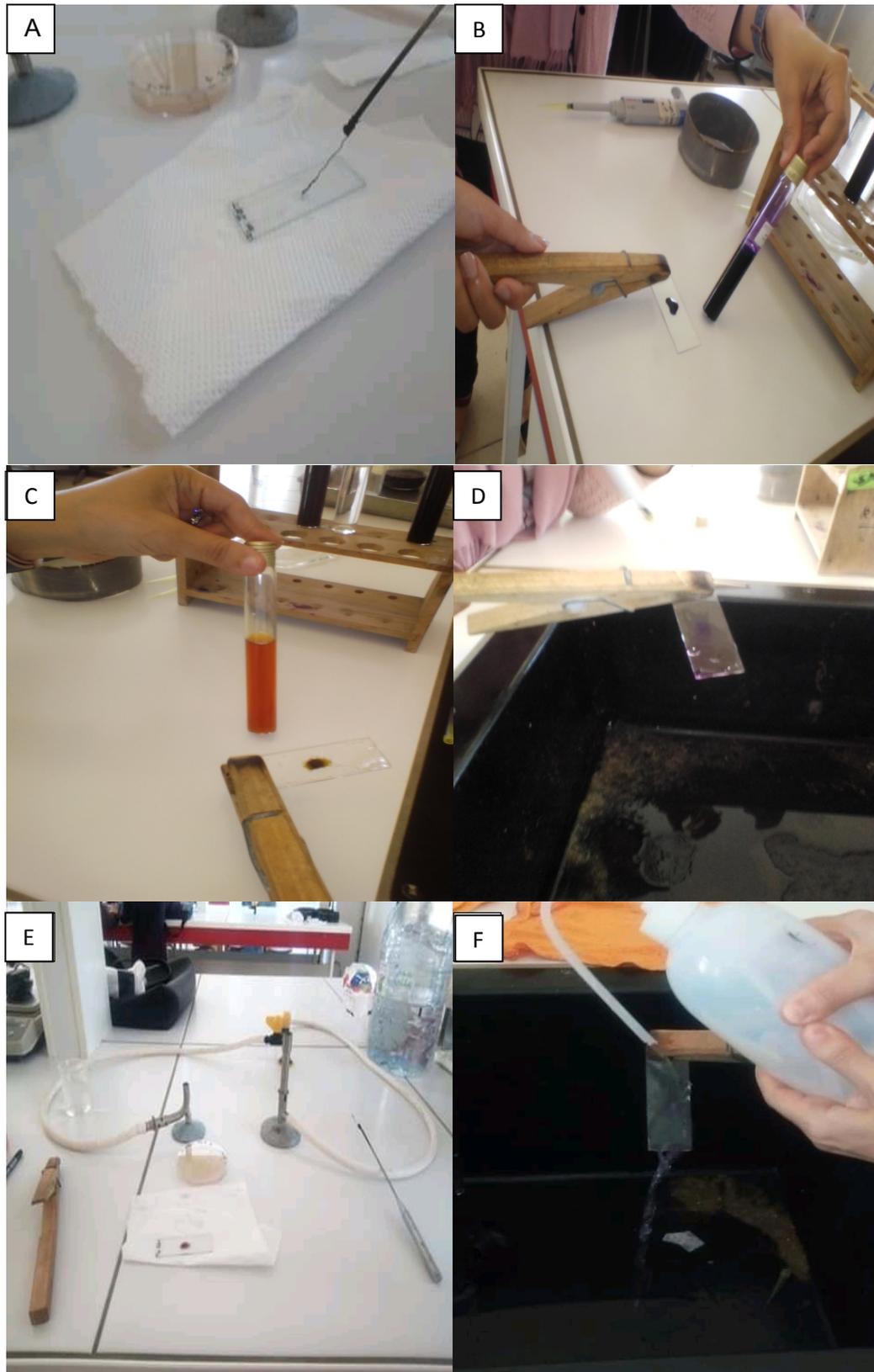


Figure 17 :Différentes étapes de la coloration de Gram. Préparation du frottis (A), coloration au violet de Gentiane (B), mordancage au Lugol (C), décoloration à l'alcool (D), contre coloration à la Safranine (E) et lavage à l'eau (F).

V.2.2. Tests d'orientation

V.2.2.1. Mise en évidence d'enzymes respiratoires

❖ Test de Catalase

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée en oxygène. La bactérie qui présente cette caractéristique peut ainsi se protéger du peroxyde d'hydrogène, qui est habituellement toxique pour les bactéries aérobies ; c'est-à-dire celles qui ont besoin d'oxygène pour proliférer. La présence de la catalase est mise en évidence en déposant une goutte d'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène) sur une boîte pétri, à l'aide d'une pipette Pasteur ; puis prendre une quantité suffisante de la culture et la dissocier dans cette eau oxygénée (Fig. 18). La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène (Gerhardt *et al.*, 1994).

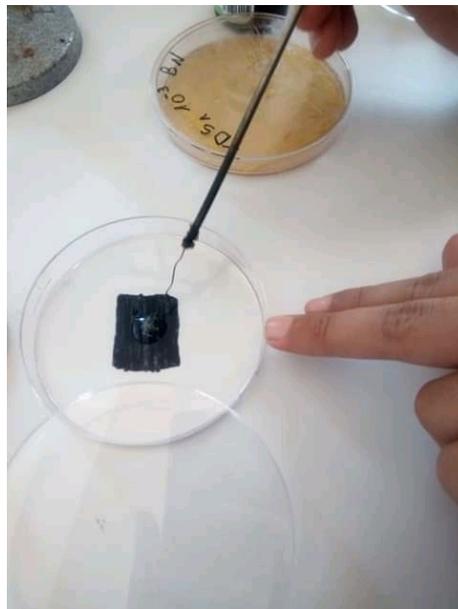


Figure 18 : Test de la Catalase.

V.2.2.2. Etude du type respiratoire

Selon Delarras, (2007) et Joffinet *al.*,(2006), les bactéries sont soit :

1. Aérobie strictes : Bactéries ayant besoin d'oxygène pour leur respiration,
2. Anaérobies strictes : La présence d'oxygène est toxique pour ces bactéries,
3. Aéro-anaérobies facultatives : La présence d'oxygène est facultative, elles peuvent se développer en présence ou en absence d'oxygène,
4. Micro-aérophiles : Bactéries qui se développent sous une faible pression d'oxygène,
5. Anaérobies aéro-tolérantes : Bactéries qui se développent en absence d'oxygène mais elles tolèrent la présence de ce dernier dans le milieu.

La mise en évidence du type respiratoire des souches est réalisée selon le protocole de Guiraud (1998), sur une gélose viande foie (VF) coulés dans des tubes.

❖ Préparation du milieu viande foie

On fait dissoudre 7,6 gr du milieu déshydraté dans 200 ml d'eau distillée. Ensuite, on fait lentement porter la solution à ébullition sur une plaque chauffante, ceci sous agitation constante et la maintenir jusqu'à sa dissolution. Après, on fait répartir 20 ml de cette solution dans des tube à essai, qui sont par la suite stériliser à l'autoclave pendant 30 mn.

❖ Mode opératoire

Au moment de l'emploi, la gélose est régénérée par chauffage au bain marie bouillant pendant 20mn à 10 °C, puis maintenue en surfusion entre 45 et 50°C. L'ensemencement de la souche est effectué à l'aide d'une pipette pasteur qui est plongée au fond du tube contenant le milieu viande foie, puis remontée en décrivant une spire, de façon à ensemer uniformément le milieu. Après refroidissement et solidification du milieu, les cultures sont incubées à 30°C pendant 48 h.

V.2.2.3. Test de mobilité

❖ Préparation du milieu mannitol-mobilité

Dissoudre 2.4 gr du milieu déshydraté dans 100ml d'eau distillée. Ensuite, porter lentement la solution à ébullition sur une plaque chauffante et sous agitation constante et la maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution. On fait répartir 10 ml du milieu dans chaque tube à essai (Fig. 19), puis les stériliser à l'autoclave pendant 30mn.



Figure 19 : préparation du milieu mannitol-mobilité.

❖ Mode opératoire

La mobilité bactérienne est étudiée en ensemençant le milieu semi-solide mannitol-mobilité par piqure centrale à l'aide d'un fil droit. La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) du milieu mannitol-mobilité rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. La mobilité est révélée par un envahissement plus ou moins grand du milieu à partir de la piqure d'inoculation, l'utilisation du mannitol acidifie le milieu est traduite par un virage de la couleur du rouge au jaune (Gerhardt *et al.*, 1994).

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Dénombrement des bactéries

Les résultats du dénombrement des bactéries au niveau des deux tronçons du tube digestif d'*Holothuria poli*, ainsi qu'au niveau du sédiment de son biotope ; montrent que la plus importante charge microbienne est obtenue pour les trois première dilutions (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3})(Tab. 2). Les colonies présent en comptent pour l'identification des bactéries, sont issues des dilutions 10^{-3} pour le premier tronçon (Forgut) du tube digestif d'*Holothuria poli*, 10^{-2} pour le troisième tronçon (Hindgut) et 10^{-2} pour le sédiment du substrat du biotope de cette espèce d'holothurie (Fig. 20, Tab. 2).

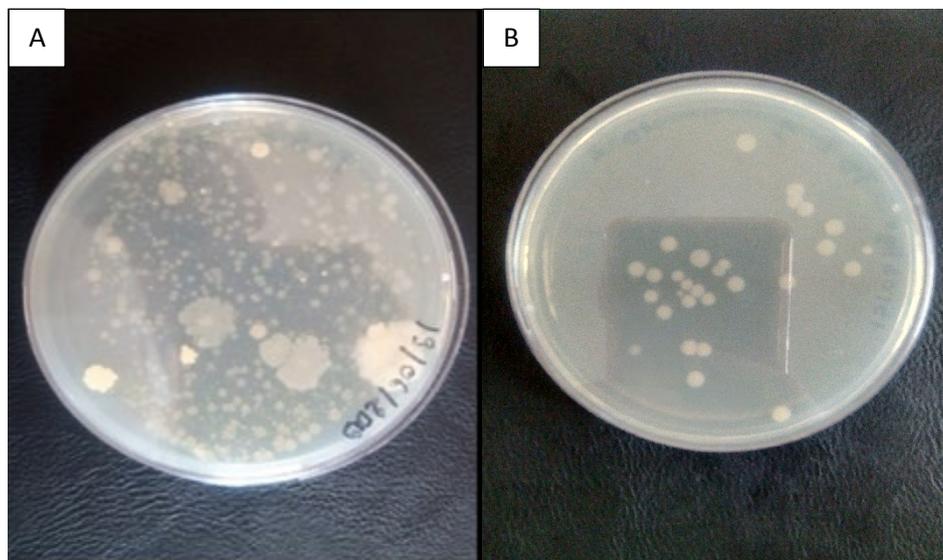


Figure 20 : Aspect des colonies obtenues au niveau des échantillons du Forgut (A) et du Hindgut (B).

Tableau 2 : Nombre de colonies en Unité Formant Colonie (UFC/ml), au niveau du sédiment du biotope, du Forgut, et au niveau du Hindgut de l'espèce *Holothuria poli*.

Dilution	Sédiment du biotope	Forgut	Hindgut
10 ⁻¹	Absence	Tapis bactérien	Tapis bactérien
10 ⁻²	0.5 x 10 ³	3.5 x 10 ³	34 x 10 ³
10 ⁻³	Champignon	5.5 x 10 ⁴	0.5 x 10 ⁴
10 ⁻⁴	Champignon	1 x 10 ⁵	0.5 x 10 ⁵
10 ⁻⁵	Champignon	0.5 x 10 ⁶	Champignon
10 ⁻⁶	Champignon	2 x 10 ⁷	Absence
10 ⁻⁷	Absence	0.5 x 10 ⁸	Absence
10 ⁻⁸	Absence	Absence	0.5 x 10 ⁹
10 ⁻⁹	Absence	Absence	Absence
10 ⁻¹⁰	Absence	1.5 x 10 ¹¹	1 x 10 ¹¹

Pour l'ensemble des dilutions 10⁻², 10⁻³ et 10⁻⁴, la charge bactérienne obtenue au niveau du Forgut, est plus importante que celle obtenue au niveau du substrat du biotope (Fig. 21).

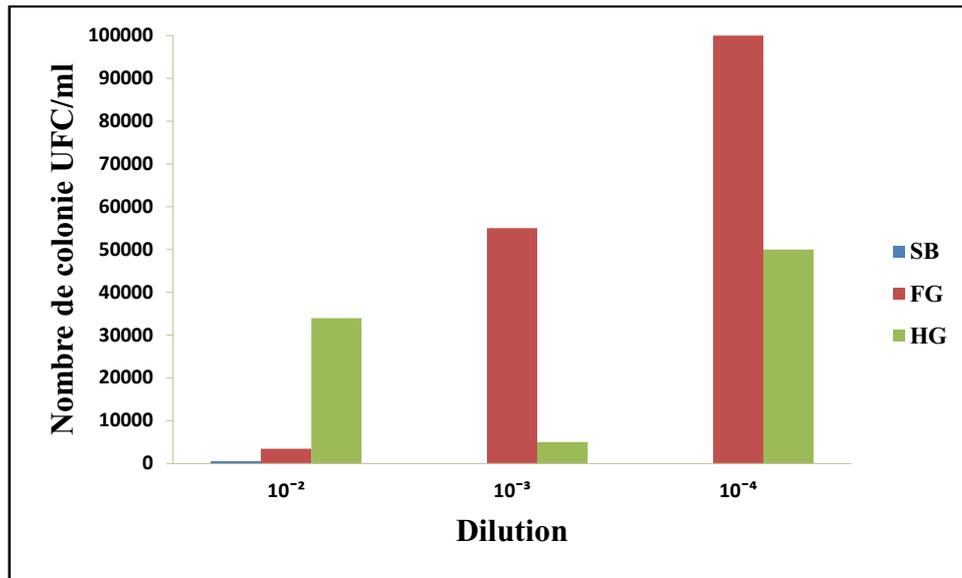


Figure 21 : Nombre de colonies en Unité Formant Colonie (UFC/ml), au niveau des deux tronçons du tube digestif de *Holothuria poli*, Forgut (FG) et Hindgut (HG), ainsi qu'au niveau du sédiment du biotope (SB).

Il est à noter que quelques colonies seulement (500 UFC/ml) apparaissent dans l'échantillon du sédiment du biotope, ceci pour la dilution 10⁻²; tandis que pour les autres dilutions, aucune colonie n'apparaît (Fig. 21). Par ailleurs, on a remarqué la présence de quelques champignons sur les boîtes de pétri contenant le sédiment du substrat du biotope (Fig. 22). D'autre part, nos résultats montrent que la charge bactérienne pour les dilutions 10⁻³ et 10⁻⁴ est nettement plus importante au niveau Forgut, par rapport au Hindgut (FG : 55000 UFC/ml, HG : 5000 UFC/ml pour la dilution 10⁻³ et FG : 10000 UFC/ml, HG : 50000 UFC/ml pour la dilution 10⁻⁴) (Fig. 21, Tab. 2). Par contre, pour la dilution 10⁻², le nombre de bactérie est plus important au niveau du Hindgut (34000 UFC/ml) par rapport au Forgut (3500 UFC/ml) (Fig. 21, Tab. 2).

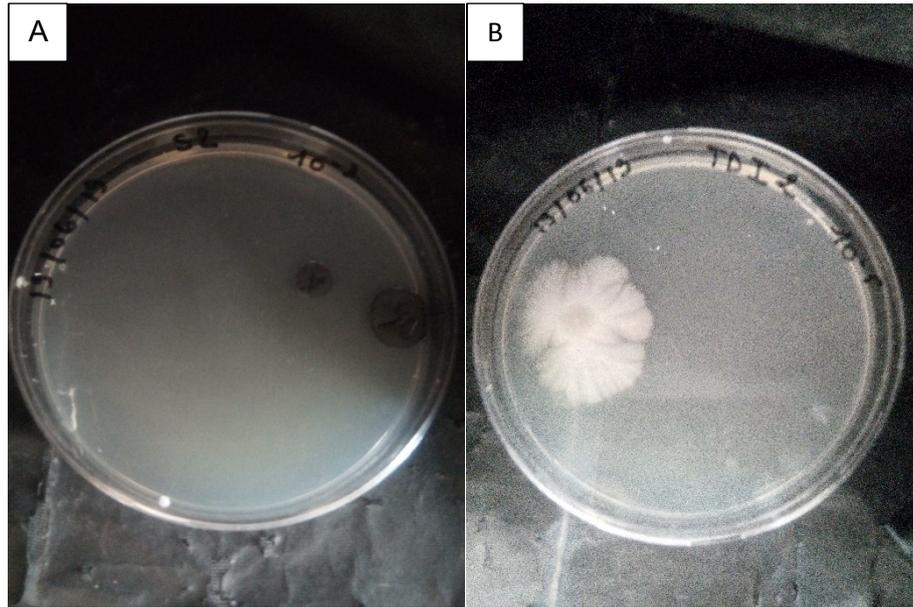


Figure 22 : Champignons observés au niveau des échantillons du Sédiment du Biotope (A), ainsi qu'au niveau du Hindgut (B).

C'est les résultats obtenus pour la dilution 10^{-2} qui vont être présent en considération, du moment qu'ils avaient donné un nombre optimal de colonie (entre 20 et 300 colonies) pour le dénombrement. Le nombre élevé de bactéries au niveau du Forgut par rapport au Sédiment du Biotope, avait également été observé dans plusieurs travaux, à savoir ceux de Taddei, (2006) ; Amaro *et al.*, (2012) ; Plotieau *et al.*, (2013). Ces derniers auteurs estiment qu'il peut y avoir deux explications à ce résultat : (1) croissance bactérienne au niveau du Forgut, ou (2) ces holothuries exercent une sélectivité de particules riches en bactéries. La sélectivité des holothuries dans leur alimentation, a été observée par Belbachir et Mezali, (2013) ; Mezali et Soualili, (2013) et Belbachir *et al.*, (2014). A partir de nos résultats, on estime que *Holothuria poli* est une espèce sélective qui peut détecter et ingérer de manière préférentiel les particules sédimentaires riche en bactéries.

Ward-Rainey *et al.*, (1996), avaient également obtenus un nombre de bactérie qui est supérieur au niveau du Hindgut par rapport au Forgut de l'espèce *Holothuria atra*. Selon

Deming et Colwell, (1982), certaines bactéries survivent au transit intestinale et proliférer au niveau du Hindgut. Par contre, en utilisant une autre méthode de dénombrement, Plotieau *et al.*, (2013) avaient obtenu une importante charge bactérienne au niveau du sédiment du Forgut par rapport à celui du Hindgut chez l'espèce *Holothuria scabra*.

Les bactéries ingérer représentent une importante source de nourriture pour les holothuries, sans oublier que les enzymes de ces bactéries aident dans la digestion au niveau du Midgut (Yingst, 1976 ; Plotieau, 2012). D'autre part, 73.3% des bactéries du tube digestif de l'espèce *Holothuria scabra*, produit de la protéase et 13.3% produit de l'amylase ; ce qui conforte l'idée que ces bactéries fournissent des enzymes utiles à la digestion (Hatmanti et Purwati, 2011 ; Plotieau *et al.*, 2013).

II. Caractérisation des souches

II.1. Etude morphologique

II.1.1. Aspect macroscopique

Les résultats obtenus après l'isolation, nous ont permis d'observer une souche à partir de chacune des deux parties du tube digestif de *Holothuria poli* (Forgut et Hindgut), ainsi que deux souches à partir du sédiment du biotope (Fig. 23).

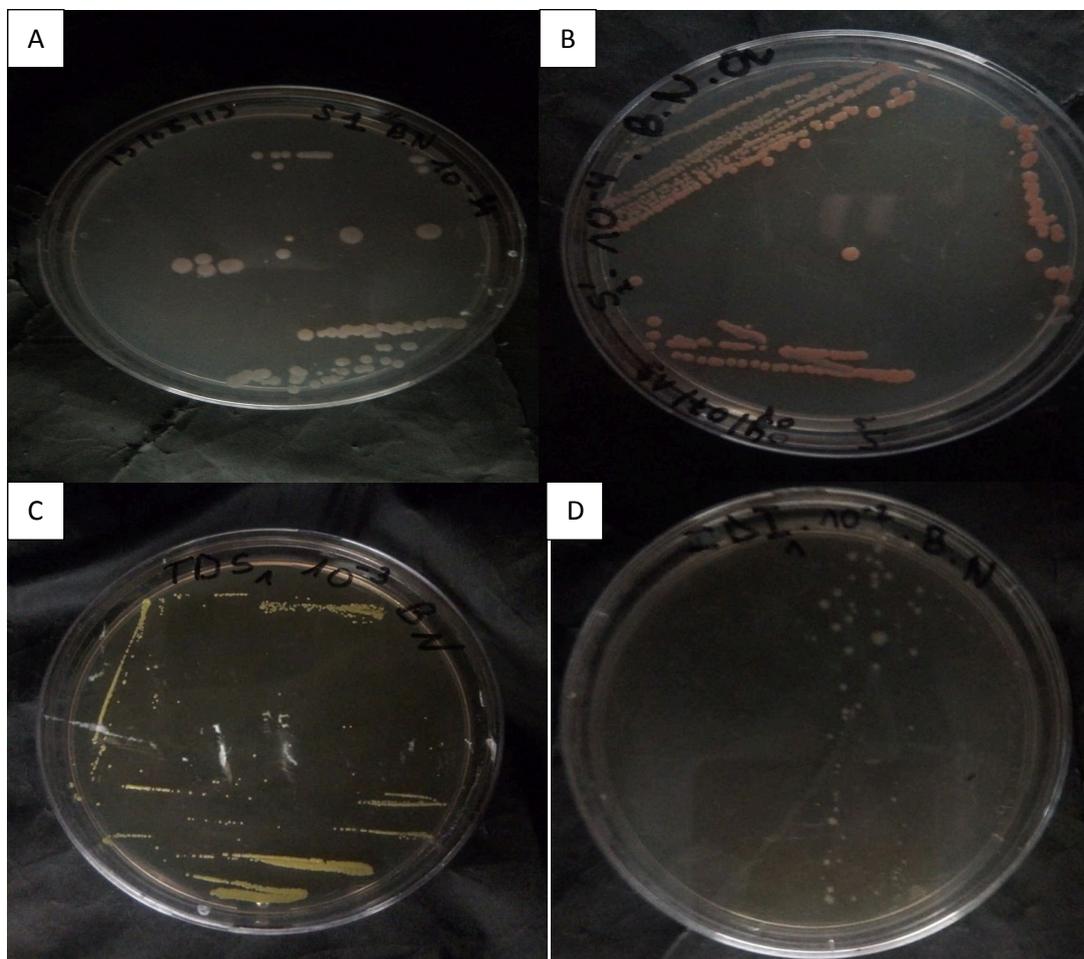


Figure 22 : Caractéristiques est colonies isolées à partir des échantillons de sédiment du biotope (A et B), du Forgut (C) et du Hindgut (D), de l'espèce d'*Holothuria poli*.

Les résultats de l'examen macroscopique des souches isolées à partir du sédiment du biotope de l'espèce *Holothuria poli*, ainsi qu'à partir des deux tronçons du tube digestif de cette holothurie, sont mentionnés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats de l'aspect macroscopiques des deux souches obtenues à partir du sédiment du biotope (SB1 et SB2), de la souche obtenue du Forgut (FG), ainsi que de la souche obtenue à partir du Hindgut (HG) de *Holothuria poli*.

Echantillon	Taille	Forme	Couleur	Contour	Opacité	Surface	Consistance
SB ₁ (10 ⁻²)	moyenne	circulaire	blanche	régulier	opaque	lisse	Crémeuse
SB ₂ (10 ⁻²)	petit	circulaire	Orange	régulier	Opaque	lisse	Crémeuse
FG (10 ⁻³)	moyenne	circulaire	Jaune	régulier	opaque	lisse	Crémeuse
HG (10 ⁻²)	moyenne	circulaire	Transparent	régulier	Translucide	lisse	Crémeuse

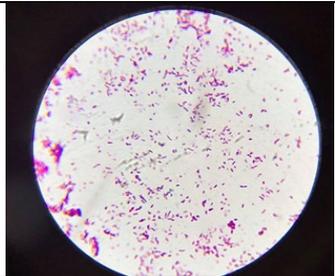
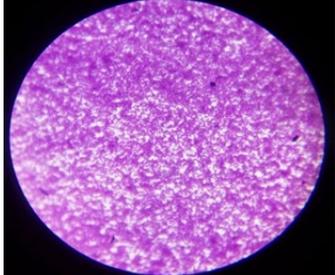
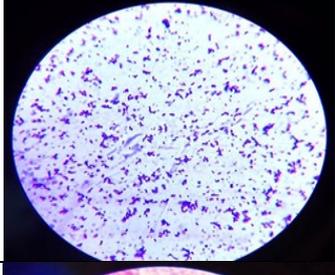
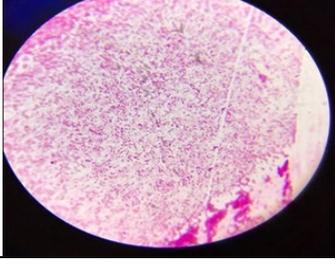
II.1.2. Aspect microscopique

❖ Coloration de Gram

L'aspect microscopique observé après coloration de gram, a permis de révéler que les souches isolées à partir des deux tronçons du tube digestif d'*Holothuria poli*, se présentent sous différentes formes et ont données différents résultats par rapport à la coloration de gram. La souche isolée à partir du Forgut se présente sous forme de Cocci, à gram positif ; alors que

celle isolée à partir du Hindgut se présente sous forme de Coccobacille, à gram négatif (Tab. 4).

Tableau 4 : Résultats de la coloration de gram des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Grossissement x100).

Echantillon	Observation microscopique	Gram	Forme
SB ₁ (10 ⁻²)		Négatif	Coccobacilles Associe à de petits Bacilles
SB ₂ (10 ⁻²)		Négatif	Cocci
FG (10 ⁻³)		Positif	Cocci
HG (10 ⁻²)		Négatif	Coccobacilles

Les deux souches isolées à partir du sédiment du biotope de l'espèce *Holothuria poli*, se présentent sous différentes formes, à savoir Bacille associées à des Coccobacilles (au niveau

du SB₁) et Cocci (au niveau du SB₂) ; cependant, ces deux souches sont à gram négatif (Tab. 4).

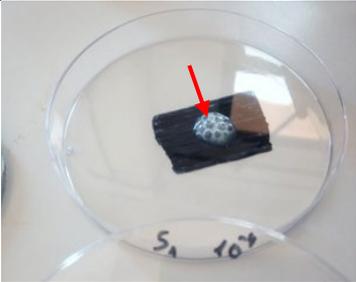
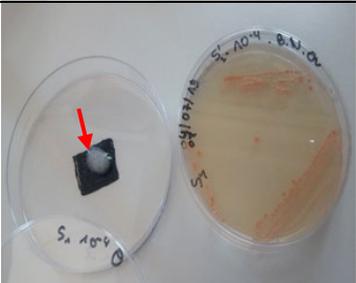
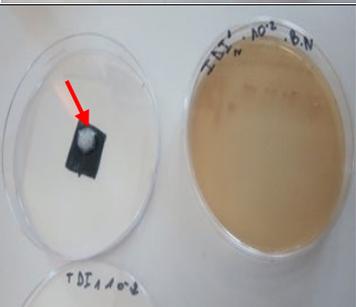
II.2. Tests d'orientation

II.2.1. Mise en évidence d'enzymes respiratoires

❖ Test de Catalase

Les résultats du test de la catalase obtenus, montrent que chez l'ensemble des souches bactériennes isolées à partir des deux tronçons du tube digestif d'*Holothuria poli* (Forgut et Hindgut), ainsi qu'à partir du sédiment de son biotope ; il y a apparition de bulles (Tab. 5). Ce résultat indique une production d'O₂ provenant de la dégradation d'H₂O₂, donc toutes ces souches sont catalase positives.

Tableau 5 : Résultats du test de catalase des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* [le test positif est mis en évidence par l'apparition des bulles (flèche rouge)].

Echantillon	Observation	Résultat
SB ₁ (10 ⁻²)		Positif
SB ₂ (10 ⁻²)		Positif
FG (10 ⁻³)		Positif
HG (10 ⁻²)		Positif

II.2.2. Etude du type respiratoire

Les résultats du type respiratoire montrent que la souche isolée à partir du Hindgut, est Aérobie-Anaérobie Facultative (AAF) (Tab. 6). Ce résultat est confirmé par la présence d'un amas bactérien au milieu du tube à essai (Tab. 6). D'autre part, la souche isolée à partir du Forgut, est Aérobie Stricte (AS) ; ce résultat est confirmé par la présence de culture seulement en haut du tube à essai (Tab. 6). Les souches isolées à partir du sédiment du biotope de *Holothuria poli*, présentent deux types respiratoires ; Aérobie Stricte (au niveau du SB₂) et Aérobie-Anaérobie Facultative (au niveau du SB₁) (Tab. 6).

Tableau 6 : Résultats de l'étude du type respiratoire des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Aérobic Stricte : AS ; Aérobic Anaérobic Facultative : AAF).

Echantillon	Observation	Résultat
SB ₁ (10 ⁻²)		AAF
SB ₂ (10 ⁻²)		AS
FG (10 ⁻³)		AS
HG (10 ⁻²)		AAF

II.2.3. Test de mobilité

Mis à part la deuxième souche isolée du sédiment du biotope (SB₂), qui présente un test de mobilité négatif, toutes les souches du reste des échantillons sont mobiles (Tab. 7).

Tableau 7 : Résultats du test de mobilité des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB et SB), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli*.

Echantillon	Observation	Résultat
SB ₁ (10 ⁻²)		Mobile
SB ₂ (10 ⁻²)		Immobile
FG (10 ⁻³)		Mobile
HG (10 ⁻²)		Mobile

A partir de l'ensemble des résultats obtenus, on estime que les deux souches bactériennes du sédiment du biotope de l'espèce *Holothuria poli*, appartiennent à la famille des Entérobactériaceae (classe des ³ Protéobacteria) pour celle isolée du SB₁ et au genre *Neisseria*

(classe des ² Protéobacteria) pour celle isolée du SB₂ (Tab. 8). Par ailleurs, on suppose que la souche bactérienne isolée du Forgut appartient au genre *Micrococcus* (classe des Actinobacteria), alors que celle isolée du Hindgut appartient à la famille des Entérobactériaceae (classe des ³ Protéobacteria) (Tab. 8).

Tableau 8 : Résultats globale des tests d'orientation des souches isolées à partir du sédiment du biotope (SB₁ et SB₂), du Forgut (FG), ainsi que du Hindgut (HG) d'*Holothuria poli* (Aérobic Stricte : AS ; Aérobic Anaérobic Facultative : AAF).

Echantillon	Forme	Coloration de Gram	Catalase	Mobilité	Type respiratoire	Résultats
Forgut	Cocci	+	+	+	AS	<i>Micrococcus</i> sp
Hindgut	Cocco bacille	-	+	+	AAF	Familles des Entérobactériaceae
SB ₁	Cocco bacille + Bacille	-	+	+	AAF	Familles des Entérobactériaceae
SB ₂	Cocci	-	+	-	AS	<i>Neisseria</i> sp

La diversité des bactéries isolées à partir du tube digestif d'*Holothuria poli* est très faible, en comparaison avec ce qui a été obtenu dans de précédentes recherches. En effet, lors de leur étude (par des analyses moléculaires) sur l'espèce *Holothuria scabra*, Plotieau *et al.*, (2013) avaient obtenu 116 souches bactériennes, avec une plus importante diversité au niveau du Hindgut. Kazzazet *al.*, (2019), avaient également obtenu une flore plus diversifiées (13 souches, dont 8 au niveau du Hindgut) dans le tube digestif d'*Holothuria atra*. On suppose que c'est le milieu utilisé lors du présent travail (Gélose Nutritive), qui n'a probablement pas permis la croissance d'un plus grand nombre de bactéries.

Les Entérobactériaceae qu'on a obtenus au niveau du sédiment du biotope (SB₁), ainsi qu'au niveau du Hindgut, appartiennent à la classe des ³ Protéobacteria. Des espèces appartenant à cette classe ont été également observés par plusieurs auteurs ; certains les avaient observés au niveau des trois tronçons du tube digestif, d'autres les avaient observés uniquement au niveau du Forgut et du Hindgut ; ceci chez différentes espèces d'holothuries (Plotieau, 2007, 2013 ; Zhong *et al.*, 2012 ; Gao *et al.*, 2017 ; Kazzaz *et al.*, 2019) (Tab. 9).

Tableau 9 : Comparaison des résultats obtenus lors du présent travail, avec ceux des précédents travaux.

Holothurie étudiée	Tronçon du tube digestif	Bactérie dominantes	Référence
<i>Holothuria scabra</i>	Forgut	Classe des ³ Protéobacteria	Plotieau, (2007)
	Midgut	Classe des ³ Protéobacteria	
	Hindgut	Classe des ³ Protéobacteria	
<i>Holothurialeucospilota</i>	Tube digestif entier	1. Classe des ³ Protéobacteria 2. Genre <i>Micrococcus</i>	Zhang <i>et al.</i> , (2012)
<i>Stichopus japonicus</i>	Tube digestif entier	1. Classe des ³ Protéobacteria 2. Classe des Actinobactéria	Gao <i>et al.</i> , (2017)
<i>Holothuria atra</i>	Forgut	Classe des ³ Protéobacteria	Kezzaz <i>et al.</i> , (2019)
	Hindgut	Classe des ³ Protéobacteria	
<i>Holothuria poli</i>	Forgut	Genre <i>Micrococcus</i> (Classe des Actinobactéria)	Présent travail
	Hindgut	Famille des Entérobactériaceae (Classe des ³ Protéobacteria)	
	Sédiment du biotope	1. Famille des Entérobactériaceae (Classe des ³ Protéobacteria) 2. Genre <i>Neisseria</i> (Classe des ² Protéobacteria)	

Le genre *Micrococcus* (classe des Actinobacteria), avait également été observé par Zhong *et al.*, (2012), lors de leurs travaux effectués sur l'espèce *Holothuria leucospilota* (Tab. 9). D'autre part, Gao *et al.*, (2017), avaient observé des espèces appartenant à la classe des Actinobactéria, au niveau du tube digestif de l'espèce *Stichopus japonicus*(Tab. 9).

Conclusion

Conclusion

L'étude de la flore bactérienne du tube digestif de l'espèce *Holothuria poli*, révèle un nombre de bactérie très réduit ; ceci est vraisemblablement due au choix du milieu utilisé. Cela dit, le nombre de bactérie (en UFC/ml) obtenu au niveau du Hindgut est plus important, par rapport à celui obtenu au niveau du Forgut d'*Holothuria poli*. Il semble que certaines bactéries survivent au transit intestinal et trouvent au sein du Hindgut un milieu d'incubation assez propice, fournissant des conditions stables pour les bactéries (Plotieau, 2007). Cette charge bactérienne au niveau du Hindgut peut très bien être expulsée avec les excréments des holothuries. Par ailleurs, le nombre de bactéries au niveau du Forgut est plus important par rapport à celui du sédiment du biotope. En plus, la souche obtenue au niveau du Forgut (*Micrococcus sp*) est différente de celle obtenue au niveau du sédiment du biotope (Entérobactériaceae et *Neisseria sp*) ; ce qui nous laisse supposer que *Holothuria poli* sélectionne les sédiments les plus riches en bactéries.

Les souches qui ont été isolées à partir des plus abondantes colonies bactériennes de chaque échantillon, appartiennent au genre *Micrococcus* (à partir du Forgut), famille des Entérobactériaceae (à partir du Hindgut et du sédiment du biotope), ainsi qu'au genre *Neisseria* (à partir du sédiment du biotope). Mis à part le genre *Neisseria*, les autres bactéries sont très largement représentées au niveau du tube digestif de différentes espèces d'holothuries.

Les bactéries présentes dans le tube digestif des holothuries, peuvent avoir un rôle dans la digestion des aliments. En effet, les holothuries peuvent en bénéficier des enzymes libérées par les bactéries (après leurs lyses), afin d'acquérir de nouvelles propriétés digestives. Ces bactéries du tube digestif jouent également un rôle crucial dans l'état de santé des animaux aquatiques (Liu *et al.*, 2011) ; elles favorisent le développement et le maintien du système immunitaire et la défense contre les agents pathogènes (Tannock, 1999).

En perspective, il est très intéressant d'aborder cette étude en utilisant d'autres milieux de cultures ; ce qui permettra d'isoler d'avantage de souches et ainsi avoir une idée assez large sur la microflore du tube digestif des holothuries. Il est primordial de faire d'avantage de tests biochimiques, ce qui nous permettra d'être plus précis dans l'orientation et l'identification des souches isolées. Enfin, on estime qu'il est important voir nécessaire, d'aborder ces expérimentation sur d'autres espèces d'holothuries à intérêt aquacole.

*Références
bibliographique*

Akamine J. (2004). Aperçu historique de l'exploitation, de la consommation et du commerce de l'holothurie au Japon. SPC, Bêche-de-mer Bulletin 19 : 5.

Amaro T., Luna G. M., Danovaro R., Billett, D. S. M., and Cun-ha, M. R. (2012) High prokaryotic biodiversity associated with gut contents of the holothurian *Molpadia musculus* from the Nazaré Canyon (NE Atlantic). *Deep-Sea Res. I*, 63, 82-90.

Awaluddin A. (2001). Pharmaceuticals. p. 18-119. In: Ong, J. E. & Gong, W. K. (eds) *The Encyclopedia of Malaysia: The Seas*. Editions Didier Millet, Kuala Lumpur.

Baker J. H. & Bradnam L. A. (1976). The role of bacteria in the nutrition of aquatic detritivores. *Oecologia*, 24, 95-104

Battaglione S.C. (1999a). Culture of Tropical sea Cucumber for stock Restoration and Enhancement. *Naga, the ICLARM Quarterly* (Vol. 22, No. 4) 11p.

Belbachir N., Mezali K., Soualili D.L., (2014). Selective feeding behaviour in some aspidochirotid holothurians (Echinodermata: Holothuroidea) at Stidia, Mostaganem Province, Algeria. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, (34). Page 34-37.

Benhamidi., (2002). Analyse microbiologique et physique-chimique des deux de rejets de complexe laitier de sidi Saada de Relizane et de l'unité de l'hydrolyse de Mostaganem. Mémoire d'ingénieur d'état en agronomie ; Université de Mostaganem. Algérie.

Bruckner A., (2005). The Proceedings of the Technical workshop on the conservation of sea cucumbers in the family's Holothuridae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR 44, Silver Spring, MD 239 pp.

Chekaba., (2002). Analyses granulométrique et chimique du contenu digestif de cinq espèces d'holothuries spidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) de trois sites littoral : sidi Fredj, Tamentfoust et figuier plage-algerie. *memoir DEA islam, Alger Algérie*, :1-55p

Chen J., (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. p. 25-38. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. & Mercier, A.

(eds) Advances in sea cucumber aquaculture and management. Fisheries Technical Paper No. 463. FAO, Rome

Conand C., (1989). Les holothuries Aspidochirotés du lagon de Nouvelle-Calédonie : biologie, écologie et exploitation. Collection ETUDES et THESES. ORSTOM, PARIS. 393p.

Conand C., Deridder C., (1990). Reproduction asexuée par scission chez *Holothuria atra* (Holothuroidea) dans des populations de platiers récifaux. In: Echinoderm Research. Balkema : Rotterdam. 71-76.

Conand C., (1993). Reproductive biology of characteristic holothurians from the major communities of the New Caledonia lagoon .Marine Biology .116: 439-450

Conand C., (1994). Les holothuries : ressource halieutique des lagons. Rapp. Sci. Tech. Biol. Mar., (65): 1-86

Conand C.,(2006a). Sea cucumber biology: Taxonomy, distribution, biology, conservation status. p. 30-46. In: Bruckner A.W. (eds). Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuridae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR 34, Silver Spring.

Conand C., (2006b). Harvest and trade: Utilization of sea cucumbers, sea cucumber fisheries, current international trade, illegal, unreported and unregulated trade, bycatch, and socio-economic characteristics of the trade in sea cucumbers. p. 47-69. In: Bruckner A.W.(ed). Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuridae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR34, Silver Spring.

Delarras C., (2007). microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire. Paris: Lavoisier

Deming JW, Tabor P S, Colwell RR., (1981) Barophilic growth of bacteria from intestinal tracts of deep-sea invertebrates. Microb Ecol 7:85–94

Deming JW, Colwell RR .,(1982). Barophilic bacteria associated with digestive tracts of abyssal holothurians. Appl Environ Microbiol 44:1222–1230.

Kazzaz W.M., Shabana E.E., Dar M.R., Dewedar A.,(2019) The Influence of *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) on Bacterial Density and Sediment Characteristics of the Red Sea, Hurghada, Egypt. 66-77

Feral J.P. & Massin C., (1982). Digestive systems: Holothuroidea. p. 191-211. In: Jangoux, M. & Lawrence, J. (eds) Echinoderm nutrition. A. A. Balkema.

Jans D, & Jangoux M., (1990). Structure fine des spherulocytes del'holothuride *Holothuria tubulosa* (Echinodermata). In: DeRidder C, Dubois P, Lahaye MC, Jangoux M (eds) Echino-derm research. A.A. Balkema, Rotterdam, pp 261–267.

Joffin J.N & le yral G.,(2006) :Microbiologie technique, Tome 1 :dictionnaire des techniques, 4ème edition CRDP d'aquitaire.

Hampton J.S., (1958). Chemical analysis of holothurian sclerites. Nature, London, 181, 1608-1609

Harris JM .,(1993).The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microb Ecol 25:195–231.

Hatmanti A. & Purwati P., (2011).Bacteria associated Holothurians: The key of habitat preference, diet, and functions. J. IlmudanTeknologiKelautanTropis. 3(1): 73-81(

Hawa L., Zulaikah M., Jamaludin M., Zainal A. A. A., Kaswandi M.A. & Ridzwan B. H.,(1999). The potential of the coelomic fluid in the sea cucumber as an antioxidant. Malaysian journal of Nutrition 5: 55-59.

Holloway E., (1995). Clinical supervision: A systems approach. Thousand Oaks, CA: Sage.

Hyman L.H.:(1955). The invertebrates. Vol 4 : Echinodermata. McGraw-Hill Book Company, New York. 763p.

Gerhardt P., Murray R. G. E., Wood W. A., Krieg N. R., (1994). Methods for General and Molecular Bacteriology. Washington, DC. ASM. P. 791.

Guiraud J.P.,(1998).Microbiologie alimentaire.(Ed).Dunod.Paris:310-321.

Kropp R.K., (1982). Response of five holothurian species to attacks by a predatory gastropod. *Tonna pernix*. *Pacific Sci.*, 36(4): 445-452. Moriarty D.J.W., (1982). Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on bacteria, organic carbon and organic nitrogen in sediments of the Great Barrier Reef. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 33: 255-263.

LALAMI Y., TALEB R., (1970). Facteurs de répartition verticale du phytoplancton au large d'Alger. Thèse de doct. 3^{ème} cycle en Biologie. Université d'Alger : 168p.

Lohrer AM., Thrush SF., Gibbs MM., (2004). Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions. *Nature* 431: 1092–1095.

Mactavish T., Stenton-Dozey J., Vopel K., Savage C., (2012). Deposit feeding sea cucumbers enhance mineralization and nutrient cycling in organically-enriched coastal sediments. *PLoS One*, 7(11): e50031.

Marchal N., Bourdon J.L., (1973). Technique bactériologiques. Edition: Doin. Paris. pp :17-37

Massin C. & Jangoux M., (1976). Observations écologiques sur *Holothuria tubulosa*, *H. poli* et *H. forskali* et comportement alimentaire de *Holothuria tubulosa*. *Cahier de Biologie Marine France* 17:45–59.

Massin C., (1979). Morphologie fonctionnelle du tube digestif d'*Holothuria tubulosa* Gmelin (holothuriodea:echinodarmata) echinodermepresent And balkemarotherdambruxelle 161-176.

Massin C., (1982). Effect of feeding on the environment: Holothuroidea. *In: Echinoderm nutrition. Jangoux M et Lawrence J.M., Balkema A.A., Publ., Rotterdam, Netherlands.* Page 139-197.

Massin C., (1982a). Food and feeding mechanisms: Holothuroidea. *In: Echinoderm nutrition. Jangoux M et Lawrence J.M., Balkema A.A., Publ., Rotterdam, Netherlands,* Netherlands: 43- 55.

Mercier A., Battaglione S.C. & Hamel J. F. (2000b). Periodic movement, recruitment and size-related distribution of the sea cucumbers *Holothuria scabra* in Salomon Islands. *Hydrobiologia* 440 : 81-100

Mezali K., (1998). Contribution à la systématique, la biologie, l'écologie et la dynamique de cinq espèces d'holothuries aspidochirotes [*Holothuria* (*Holothuria*) *tubulosa*, *Holothuria* (*Lessonothuria*) *polii*, *Holothuria* (*Holothuria*) *stellati*, *Holothuria* (*Panningothuria*) *forskali* et *Holothuria* (*Platyperona*) *sanctori*] de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L) Delile de la Presqu'île de Sidi-Fredj. Thèse Magister. Alger, Algérie ,238p.

Mezali K., Chekaba B., Zupo V., (2003). Comportement alimentaire de cinq espèces d'holothuries aspidochirotes (*Holothuroidea* ; *Echinodermata*) de la presqu'île de Sidi Fredj Algérie. *Mer. Soc. Zool. Fr.* Paris, France.

Mezali K., Soualili D.L., (2013). Capacité de selection des particules sédimentaires et de la matière organique chez les holothuries . *La Bèche-de-mer, Bulletin d'information de la CPS* 33. Page 38-43.

Michio K., Kengo K., Yasunori K., Hitoshi M., Takayuki Y., Hideaki Y., Hiroshi S., (2003). Effects of deposit feeder *Stichopus japonicus* on algal bloom and organic matter contents of bottom sediments of the enclosed sea. *Marine Pollution Bulletin*, 47: 118-125.

Miller A. K., Kerr A. M.; Paulay G., Reich M.; Wilson N.G., Carvajal J. I., Rouse, G. W., (2017). Molecular phylogeny of extant *Holothuroidea* (*Echinodermata*).

Millot C., (1987). The circulation in the Levantine intermediate water in the Algerian basin. *J.Geophys. Res.*, 92: 8265-8276.

Moriarty D.J.W., (1982). Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on bacteria, organic carbon and organic nitrogen in sediments of the Great Barrier Reef. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 33: 255-263.

Multon J.L .,(1994). Qu'est ce que la qualité d'un produit alimentaire et quels sont les opérateurs ? In : *Qualité des produits alimentaires ; politique, initiation, gestion et contrôle*. 2^{ème} édition Tec et Doc ;Collection scientifique et technique agroalimentaires, Paris, pp 4-26

Muscat A., (1983). Population dynamics and the effects on the in fauna of the deposit feeding holothurian *Parastichopus parvimensis* (Clark). Ph. D. Thesis, Univ. of Southern California: 1-328

Neghli L. S., (2014). Cycles de reproduction et exploitation des holothuries Aspidochirotés (Holothuroidea : Echinodermata) inféodées aux herbiers à *Posidonia oceanica* de la côte algéroise. Mémoire de Magistère. Univ. Mostaganem, 88p.

Nichols D., (1969). Echinoderms. Second edition. Hutchinson University Library, London, 192 pp.

Paltzat D.L., Pearce C.M., Barnes P.A., McKinley R.S., (2008). Growth and production of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus* Stimpson) co-cultured with suspended Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 275 : 124-137.

Plotieau T.,(2012). Analyse de certains éléments nutritionnels essentiels à *Holothuria scabra* (Echinodermata, Holothuroidea): influence de la qualité du sédiment sur le développement des holothuries en aquaculture et importance des bactéries. Thesis, University of Mons, Belgium

Plotieau T.,(2013). Analyse de certains éléments nutritionnels essentiels à *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea): influence de la qualité du sédiment sur le développement des holothuries en aquaculture et importance des bactéries. PhD thesis. UMONS Presse universitaire: Mons. 125 pp

Poh-Sze C., (2004). Fisheries, trade and utilization of sea cucumbers in Malaysia. p. 57-68. In: Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. & Mercier, A. (eds) *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. Fisheries Technical Paper No. 463. FAO, Rome.

Preston G. L.,(1993). Bêche-de-mer. p. 371-407. In: Wright A. & Hill L. (eds). *Nearshore Marine Resources of the South Pacific*, Suva: Institute of Pacific Studies, Honiara, FFA and Halifax, International Centre for Ocean Development.

Prieur D., (1981). Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. Thèse Océan. ETat, Sc. Nat., BJTut : 266 p.

Purcell S. W., Conand C., Uthicke S., Byrne M. (in press). Ecological roles of exploited sea cucumbers (in press). *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*.

Reichenbach Y. & Hollway S.,(1995). Potential of asexual propagation of several commercially important species of tropical sea cucumbers (Echinodermata). *Journal of World Aquaculture Society* 26 : 272-278.

Reise K.,(2002). Sediment mediated species interactions in coastal waters. *J Sea Res* 48: 127–141

Roberts D., Gebruk A., Levin V., Manship B.A.D., (2000). Feeding and digestive strategies in deposit-feeding Holothurians. *Oceanography and Marine biology : an Annual review*, 38: 257-310

Rowe F.W.E., (1969). A review of the family Holothuroidea (Holothuroidea Aspidochirotida). In *Bull Br Musnat Hist (Zool)*, Vol 18. British Museum (Natural History), LONDON.117-170.

Samyn Y., Vandenspiegel D., Massin C., (2006). Taxonomie des holothuries des Comores. *ABC Taxa Vol.*, 1: 1-130.

Shelley C.,(1985). Growth of *Actinopyga echinites* and *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata) and their fisheries potential (as Bêche-de-mer) in Papua New Guinea. *Proceeding in 5th International Coral Reef Symposium, Tahiti*, 5 : 297-302.

Sloan N.A., (1979). Microhabitat and resource utilization in cryptic rocky intertidal Echinoderms at Aldabra Atoll, Seychelles. *Mar. Biol.*, 54 : 269-279.

Smith D.C., & Douglas A.E.,(1987). *The Biology of Symbiosis*. E. Arnold, Baltimore.

Sun Y., & Chen D.,(1989). Study of in vitro and in vivo physical characters of different types of microbes in sea cucumber. *Oceanologia et Limnologia Sinica* 20:300–307. (in Chinese).

Tanaka H.,(1992). Sea cucumber culture in Japan. SPC, Bêche-de-mer Bulletin 4 : 18-20.

Thomas CA Jr .,Miller OL Jr., Hamkalo BA.,(1970). Visualization of bacterial genes in action 1970 Jul 24;169(3943):392-5.

Tortonese E., & Vadon C.,(1987). Oursin et holothuries (ECHINODERMES) in fiche FAO didification des espèces pour les besoins de pêche Révision I, Méditerranée, Mer noire zone de pêche 37 vol I, végétaux et invertébrés : 715-739.

Uthicke S., (1999). Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria* (*Halodeima*) *atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, Great Barrier Reef. *Bulletin of Marine Science* 64: 129-141.

Uthicke S.,(2001c). The process of asexual reproduction by transverse fission in *Stichopus chloronotus* (greenfish). SPC, Bêche-de-mer Bulletin 14 : 23-25.

Ward-Rainey N., Rainey FA., Stackebrandt E .,(1996). A study of the bacterial flora associated with *Holothuria atra*. *J Exp Mar Bio Ecol* 203:11–26.

Yanagisawa T., (1996). Sea cucumber ranching in Japan and some suggestions for the South Pacific. p. 387-411. In: *Present and Future of Aquaculture Research and Development in the Pacific Island Countries. Proceedings of the International Workshop 20-24th November 1995, Tonga.*

Yingst J.,(1976). The utilization of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit-feeding holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 23: 55-69.

Yuan X., Zhou Y., Mao Y., (2015). *Apostichopus japonicus*: A key species in integrated polyculture systems. In: *The Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*: History, Biology and Aquaculture*, H. Yang et al. (eds.). London: Academic Press, 323-332.

Zhang X., Nakahara T., Miyazaki M., Nogi Y., Taniyama S., Arakawa O., Inoue T., & Kudo T.,(2012). Diversity and function of aerobic culturable bacteria in the intestine of the sea cucumber *Holothuria leucospilota* 447-456.

Zupo V., Fresi E.,(1984). A study of the food web of the *Posidonia oceanica* ecosystem: Analysis of the gut contents of Echinoderms. Page 373–379.

Annexe

La composition des milieux de culture

Gélose Nutritive :

- Extrait de viande 1,0g/L
- Extrait de levure2,5g/L
- Peptone 5,0g/L
- Chlorure de sodium5,0 g/L
- Agar 15,0 g/L
- Eau distillée1000ml
- pH = 7,0

Mannitol-Mobilitéé :

- Peptone:.....10,0 g
- Mannitol:.....7,5 g
- Rouge de phénol:.....0,04 g
- Nitrate de potassium:.....1,0 g
- Agar:.....3,5 g
- Eau distillée1000ml
- pH = 7,6

Bouillon Nutritif :

- Extrait de viande 1g
- Peptone5g
- Chlorure de sodium5g
- Eau distillée 1000ml
- pH=7

L'eau physiologique :

- Chlorure de sodium9g
- Eau distillée1000ml

Viande foie :

- Base viande foie30,0 g
- Glucose2,0 g
- Agar6,0 g
- Eau distillée.....1000ml
- pH = 7,4