

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



جامعة باجي مختار - عنابة  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR - ANNABA



FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE  
LABORATOIRE D'ÉCO-BIOLOGIE DES MILIEUX MARINS ET LITTORAUX

## THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat

Spécialité : Microbiologie environnementale et sanitaire (M.E.S)

### THÈME

**Étude de la contamination bactériologique dans le Golfe d'Annaba : évaluation de la persistance des bactéries pathogènes dans le milieu littoral et détermination des sources de contamination fécale**

Présentée par : M<sup>lle</sup> BOUFAFA MOUNA

Directeur de thèse : M. KADRI Skander El Hadi

MCA., Université Badji Mokhtar, Annaba

Co-directeur de thèse : M. REDDER Peter

Prof., Université Paul Sabatier, Toulouse

Membres de Jury:

Président : M. CHEKIREB Djamel

Prof., Université Badji Mokhtar, Annaba

Examineur : M. MERAD Tarek

Prof., Université Badji Mokhtar, Annaba

Examineur : M. BENOUARETH Djamel Eddine

Prof., Université 8 Mai 1945, Guelma

Examinatrice : M<sup>me</sup>. SAOUDI Amel

MCA., Université Badji Mokhtar, Annaba

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*La réalisation d'une thèse universitaire est loin d'être un travail solitaire. C'est avec un immense plaisir que je tiens à remercier et à exprimer ma gratitude envers toutes les personnes qui m'ont soutenu et qui ont contribué à la réussite de ce travail.*

*Je tiens à remercier fortement Monsieur **CHEKIREB DJAMEL** pour m'avoir honoré d'accepter de présider le jury de ma thèse. J'ai souvent sollicité votre aide et vos conseils lors de mes travaux de master et de thèse, et vous m'avez toujours accueilli avec gentillesse et patience. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude Monsieur.*

*Je souhaite tout particulièrement exprimer mon plus grand respect et ma profonde reconnaissance à mon directeur de thèse Monsieur **KADRI SKANDER**, pour avoir accepté de diriger ce travail. Je vous suis redevable de m'avoir guidé et soutenu tout en me laissant la liberté de gérer de manière autonome de nombreux aspects de ce travail. Je vous remercie vivement pour votre aide inestimable tout au long de mes travaux de master et de thèse, que ce soit sur le terrain ou en laboratoire. Votre soutien constant et vos conseils en même temps que votre gentillesse et amabilité ont grandement contribué à l'aboutissement de ce travail.*

*Je suis également infiniment reconnaissante envers mon co-directeur de thèse Monsieur **REDDER PETER**, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, où une partie de mes travaux de recherche a été réalisé dans d'excellentes conditions scientifiques. Votre rigueur scientifique et votre clairvoyance m'ont été d'une grande aide au cours de ce travail.*

*Mes vifs remerciements s'adressent, également, à Monsieur **BENOUARETH Djamel Eddine** pour l'honneur et le privilège qu'il m'a accordé en acceptant d'être rapporteur. Bien que très sollicité de par ses responsabilités scientifiques, Monsieur a répondu favorablement pour juger ce travail. Qu'il soit assuré de mon plus grand respect.*

*Mes sincères remerciements vont à Madame **SAOUDI AMEL** pour l'honneur et le privilège qu'elle m'a accordé en acceptant d'examiner ce travail. Je lui adresse toute ma gratitude et mes sentiments les plus respectueux.*

*Je tiens particulièrement à remercier et à exprimer toute ma gratitude et mon profond respect à Monsieur **MERAD TAREK** pour sa disponibilité, et d'avoir accepté de faire partie de ce jury.*

*Je ne remerciais jamais assez mon directeur de laboratoire Monsieur **BENSOUILAH MOURAD** pour son soutien constant et son implication remarquable dans ce travail de recherche. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez témoignée en acceptant de m'intégrer dans votre équipe et également pour votre soutien financier ainsi que pour vos conseils forts précieux qui m'ont été d'un grand apport au cours de ce travail.*

*Je suis profondément reconnaissante envers tous **mes collègues et amis**. Merci à tous pour votre gentillesse, vos conseils, vos encouragements, votre bonne humeur, et surtout pour votre soutien moral. Je remercie plus particulièrement Monsieur **TOUATI HASSEN** pour sa contribution au traitement de mes données statistiques.*

*Il me reste l'essentiel, je remercie chaleureusement **mes parents** pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. Merci du fond du cœur pour votre patience, votre amour, vos encouragements et votre soutien inconditionnel pendant toutes ces longues années d'étude, et sans lesquels je n'en serais pas là aujourd'hui. Je vous dédie ce travail.*

***Soutenu par vous tous, j'ai pu achever ce travail. MERCI***

# SOMMAIRE

Résumé –Abstract-ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

**INTRODUCTION GÉNÉRALE** 1

## I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>CHAPITRE 1 : ÉVALUATION DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES EAUX MARINES</b>	<b>6</b>
1. L'importance écologique, économique et sociale des écosystèmes côtiers	6
2. La perturbation des écosystèmes côtiers	7
2.1. La pollution de l'écosystème marin	7
2.1.1. La pollution chimique	7
2.1.2. La pollution physique	7
2.1.3. La pollution microbiologique	8
3. Les principales bactéries incriminées dans la pollution microbiologique	9
3.1. Les bactéries indicatrices de la contamination fécale	9
3.1.1. Les coliformes totaux (CT)	10
3.1.2. Les coliformes fécaux ou thermo-tolérants (CF)	10
3.1.3. La bactérie <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> )	10
3.1.4. Les entérocoques intestinaux (EI)	11
3.2. Les bactéries potentiellement pathogènes dans le milieu marin	11
4. Le devenir des bactéries fécales dans le milieu côtier	13
5. Les méthodes de détection et d'identification des microorganismes	14
5.1. Les méthodes phénotypiques	15
5.1.1. Les tests présomptifs d'orientation	15
5.1.2. Les techniques de microscopie	15
5.1.3. Les tests biochimiques	16
5.2. Les méthodes de biologie moléculaire	16
5.2.1. La réaction en chaîne par polymérase (PCR)	16
5.2.2. Les techniques de séquençage	18
5.2.3. L'analyse phylogénétique	19
6. Les risques sanitaires et économiques associés aux eaux récréatives et à la conchyliculture	19
7. La réglementation sanitaire en zone littorale	21
7.1. La réglementation concernant les eaux de baignade (normes algériennes)	21
7.2. La réglementation concernant les eaux conchylicoles (normes européennes)	22

## CHAPITRE 2 : GÉNÉRALITÉS SUR LES MOLLUSQUES BIVALVES

1. Les caractères généraux	24
2. La valeur nutritionnelle des bivalves mollusques	24
3. Les bivalves comme indicateurs des perturbations environnementales	25
4. La contamination microbiologique des bivalves	25
5. La répartition des bivalves en Méditerranée et en Algérie	26
6. Présentation du matériel biologique utilisé dans le cadre de cette étude	27
6.1. Les moules du genre <i>Perna</i>	27
6.2. La moule de l'espèce <i>Perna perna</i>	27
6.2.1. Répartition géographique	28
6.2.2. Position systématique	29

## CHAPITRE 3 : GÉNÉRALITÉS SUR LES SÉDIMENTS 30

1. Définition	30
2. L'importance écologique des sédiments	30
3. La contamination bactériologique des sédiments	31
4. Le devenir des bactéries entériques dans les sédiments	31
5. L'abondance et la répartition des bactéries et des virus d'origine fécale dans les sédiments	32
6. L'adsorption bactérienne dans les sédiments	33
7. Le rôle des sédiments dans la survie des bactéries entériques	33

## II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Description des sites d'étude et des stratégies d'échantillonnage	35
1.1. Description du Golfe d'Annaba	35
1.2. Description des sites d'échantillonnage	36
1.3. Stratégies et méthodes de d'échantillonnage	37
1.3.1. Stratégie d'échantillonnage	37
1.3.2. Mesures des variables physico-chimiques	37
1.3.3. Échantillonnage	38
2. Identification morphologique des moules collectées dans le Golfe d'Annaba	40
3. Analyse bactériologique des échantillons	40
3.1. Recherche et dénombrement des bactéries indicatrices de la contamination fécale	41
3.1.1. Préparation des dilutions décimales	41
3.1.2. Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux et caractérisation d' <i>Escherichia coli</i>	43

3.1.3.	Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (Norme NF EN ISO 9308- 3, mars 1999)	47
3.2	Recherche et identification des bactéries potentiellement pathogènes	48
3.2.1.	Isolement et purification des isolats bactériens	41
3.2.2.	Caractérisation macroscopique	51
3.2.3.	Caractérisation microscopique	51
3.2.4.	Etude biochimique	51
3.2.5.	Identification par la galerie biochimique miniaturisée Api système (bioMérieux)	52
4.	Analyses statistiques des données	52
5.	Identification moléculaire des moules et des isolats bactériens	53
5.1.	Identification moléculaire des moules	53
5.1.1.	Extraction de l'ADN mitochondrial	53
5.1.2.	Amplification de l'ADNmt par PCR	56
5.2.	Identification moléculaire des isolats bactériens provenant des moules	56
5.2.1.	Extraction de l'ADN génomique	57
5.2.2.	Amplification de l'ADNg par PCR	57
5.2.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose	58
5.2.4.	Séquençage des produits PCR	59
5.3.	Analyses phylogénétique	59
5.4.	Typage moléculaire par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST)	60

### III. RESULTATS ET INTERPRATATIONS

1.	Évaluation de la qualité physico-chimique de l'eau dans le Golfe d'Annaba	62
1.1.	La température de l'eau	62
1.2.	L'oxygène dissous de l'eau	62
1.3.	Le potentiel d'hydrogène (pH) de l'eau	63
1.4.	La salinité de l'eau	63
1.5.	Les matières en suspension (MES) de l'eau	63
2.	Résultats des analyses bactériologiques	64
2.1.	Recherche et dénombrement des bactéries indicatrices de la contamination fécale	64
2.2.	Isolement et identification des isolats potentiellement pathogène	67
3.	Résultats des analyses statistiques	73
3.1.	Étude de la corrélation linéaire simple entre les bactéries fécales et les variables environnementales	73
3.2.	Variation des variables biotiques et abiotiques dans les eaux du Golfe d'Annaba en 2018 par l'analyse en composantes principales (ACP)	75
3.3.	Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) de la variabilité inter-sites	76
4.	Identification des moules collectées dans le Golfe d'Annaba	78
4.1.	Identification morphologique	78
4.2.	Identification moléculaire	79
5.	Caractérisation moléculaire des isolats bactériens isolés de la moule <i>P. perna</i>	82
6.	Analyse de typage des séquences multilocus (MLST)	85

<b>IV. DISCUSSION</b>	
1. Analyses des variables physico-chimiques des eaux du Golfe d'Annaba	88
2. Analyses bactériologiques des eaux du Golfe d'Annaba	90
2.1. La contamination fécale de la moule <i>Perna perna</i>	92
2.2. La contamination fécale dans le sédiment	93
3. Influence des variables environnementales sur les indicateurs fécaux	94
4. Abondance de bactéries potentiellement pathogènes dans le Golfe d'Annaba	95
5. Identification morphologique et moléculaire de la moule <i>Perna perna</i>	97
5.1. Identification morphologique	97
5.2. Identification moléculaire	99
6. Identification biochimique et moléculaire des bactéries isolées des moules <i>P.perna</i>	100
<b>V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b>	102
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	105
<b>ANNEXES</b>	

## Résumé

---

L'identification de la contamination fécale dans les écosystèmes marins côtiers est l'une des principales exigences pour l'évaluation des risques potentiels pour la santé humaine. C'est dans ce contexte que le présent travail a été réfléchi et réalisé, dans le but d'évaluer la présence et la distribution d'indicateurs fécaux et de bactéries potentiellement pathogènes dans les eaux marines, les sédiments et les mollusques bivalves collectés mensuellement sur une période d'un an, à partir de quatre sites différents dans le Golfe d'Annaba (Nord- Est de l'Algérie).

La détection et le dénombrement des bactéries indicatrices ont été effectués par la méthode colimétrique. Les charges bactériennes ont ensuite été corrélées avec différentes variables environnementales de l'eau (température, pH, oxygène dissous, salinité et matières en suspension) mesurées mensuellement sur chaque site d'échantillonnage. La recherche de bactéries potentiellement pathogènes a été effectuée au moyen de différentes analyses biochimiques et moléculaires.

Les résultats des analyses bactériologiques ont révélé une présence assez élevée de charges bactériennes tout au long de la période d'étude, notamment dans les moules et les sédiments de Rezgui Rachid et de Sidi Salem. Ceci est principalement lié à leur localisation à proximité de zones d'activités industrielles, urbaines et côtières. Les résultats ont également montré que les mollusques bivalves étaient significativement plus contaminés que les échantillons d'eau et de sédiment. Par conséquent, les bivalves des sites étudiés seraient impropres à la consommation directe.

L'analyse statistique des données a confirmé l'impact des variables physico-chimiques sur la distribution des polluants fécaux dans les échantillons étudiés. Elle a également révélé que leur implication était beaucoup plus importante dans les sites de Rezgui Rachid et Sidi Salem par rapport aux deux autres sites (Cap de Garde et Lahnaya).

Les analyses biochimiques et moléculaires ont montré que les bactéries isolées à partir des trois échantillons étaient principalement des espèces potentiellement pathogènes comme *E. coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, et *Proteus spp*.

Ces principaux constats démontrent la forte implication des activités anthropiques aussi bien que les variables environnementales sur la qualité bactériologique du Golfe et soulignent le rôle des mollusques bivalves comme bio-indicateurs efficaces de la qualité bactériologique des eaux côtières.

**Mots clés :** contamination fécale ; bivalves ; sédiments ; eaux ; Golfe d'Annaba ; variables environnementales ; bactéries potentiellement pathogènes.

## **Abstract**

---

The identification of fecal contamination in coastal marine ecosystems is one of the main requirements for the assessment of potential risks to human health. It is in this context that the present work was carried out, with the aim of assessing the presence and distribution of faecal indicators and potentially pathogenic bacteria in marine waters, sediments and bivalve molluscs collected monthly over a period of one year, from four different sites in the Gulf of Annaba (North East Algeria).

Detection and enumeration of indicator bacteria were carried out by the colimetric method. The bacterial loads were then correlated with different environmental variables of the water (temperature, pH, dissolved oxygen, salinity and suspended solids) measured monthly at each sampling site. The search for potentially pathogenic germs was carried out by means of various biochemical and molecular analyses.

The results of the bacteriological analysis revealed a fairly high presence of bacterial loads throughout the study period, particularly in the sediments and mussels of Rezgui Rachid and Sidi Salem. This is mainly related to their location near industrial, urban and coastal activity areas. The results also showed that the bivalve molluscs were significantly more contaminated than the water and sediment samples. Therefore, bivalves from the sites studied would be unsuitable for direct consumption.

Statistical analysis of the data confirmed the impact of physico-chemical variables on the distribution of faecal pollutants in the samples studied. It also revealed that their involvement was much more important in the sites of Rezgui Rachid and Sidi Salem compared to the other two sites (Cap de Garde and Lahnaya).

Biochemical and molecular analyses showed that the bacteria isolated from the three samples were mainly potentially pathogenic species such as *E. coli*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp* and *Proteus spp*.

These main findings demonstrate the strong implication of anthropogenic activities as well as environmental variables on the bacteriological quality of the Gulf and underline the role of bivalve molluscs as effective bioindicators of the bacteriological quality of coastal waters.

**Key words :** fecal contamination ; bivalves ; sediments ; waters ; Gulf of Annaba ; environmental variables ; potentially pathogenic bacteria.

يعد تحديد التلوث البرازي في النظم الإيكولوجية البحرية الساحلية أحد المتطلبات الرئيسية لتقييم المخاطر المحتملة على صحة الإنسان. في هذا السياق، تم تنفيذ العمل الحالي، بهدف تقييم وجود وتوزيع المؤشرات البرازية والبكتيريا المحتملة المسببة للأمراض في المياه البحرية والرواسب والرخويات ذات الصدفتين التي تم جمعها شهرياً على مدى فترة زمنية. سنة واحدة، من أربعة مواقع مختلفة في خليج عنابة (شمال شرق الجزائر).

تم إجراء الكشف والتعداد للبكتيريا المؤشر بطريقة القياس الكوليميتري. ثم تم ربط الأحمال البكتيرية مع المتغيرات البيئية المختلفة للمياه (درجة الحرارة، ودرجة الحموضة، والأوكسجين المذاب، والملوحة، والمواد الصلبة العالقة) التي تم قياسها شهرياً في كل موقع أخذ عينات. تم إجراء البحث عن الجراثيم المسببة للأمراض عن طريق العديد من التحليلات البيوكيميائية والجزئية.

كشفت نتائج التحليل البكتريولوجي عن وجود حمولات بكتيرية عالية نسبياً طوال فترة الدراسة، لا سيما في الرواسب وبلح البحر في رزقي رشيد وسيدي سالم. ويرتبط هذا بشكل أساسي بموقعها بالقرب من مناطق النشاط الصناعي والساحلي، والتي تحتوي على خليط من النفايات الحضرية والزراعية والصناعية. كما أظهرت النتائج أن الرخويات ذات الصدفتين كانت أكثر تلوثاً من عينات المياه والرواسب. وبالتالي، فإن ذوات الصدفتين من المواقع التي تمت دراستها ستكون غير صالحة للاستهلاك المباشر.

أكد التحليل الإحصائي للبيانات تأثير المتغيرات الفيزيائية والكيميائية على توزيع الملوثات البرازية في العينات المدروسة. وكشفت أن تورطهم كان أكبر بكثير في موقعي رزقي رشيد وسيدي سالم مقارنة بالموقعين الآخرين (كاب دي غارد ولحنايا).

أظهرت التحليلات البيوكيميائية والجزئية أن البكتيريا المعزولة من العينات الثلاث كانت بشكل رئيسي من الأنواع المسببة للأمراض مثل *E.coli* و *Salmonella spp* و *Staphylococcus spp* و *Klebsiella spp* و *Pseudomonas spp* و *Proteus spp*.

توضح هذه النتائج الرئيسية التأثير القوي للأنشطة البشرية وكذلك المتغيرات البيئية على الجودة الميكروبيولوجية للخليج وتؤكد دور الرخويات ذات الصدفتين كمؤشرات بيولوجية فعالة للجودة البكتريولوجية للمياه الساحلية.

**الكلمات المفتاحية:** تلوث برازي؛ ذوات الصدفتين. الرواسب. مياه؛ خليج عنابة؛ المتغيرات البيئية؛ يحتمل أن تكون مسببة للأمراض.

## **LISTE DES ABRÉVIATIONS**

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

AFNOR : Agence de Normalisation française

API : Appareils et Procédés d'Identification

ATCC : American Type Culture Collection

BLAST : Basic Local Alignment Tool

CAH : Classification Ascendante Hiérarchique

CF : Coliformes fécaux

CT : Coliformes totaux

FAO : Food and Agriculture Organisation

EC : *Escherichia coli*

EDTE : Éthylène diamine tétraacétique

EI : Entérocoques intestinaux

JORA : Journal Officiel de la République Algérienne

MLST : Multi Locus Sequence Typing

NGS : Next-Generation Sequencing

O.M.S : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

SDS : Sodium dodecyl sulfate

SF : Streptocoques fécaux

ST : Streptocoques totaux

TBE : Tris-Borate-EDTA

## LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Numéro de page
<b>Figure 1</b>	Les services des écosystèmes côtiers	6
<b>Figure 2</b>	Les principales origines et vecteurs de risque des contaminations bactériologiques des eaux littorales (d'après Kischel 2018)	9
<b>Figure 3</b>	<i>Clostridium perfringens</i> ( <a href="https://www./media.sciencephoto.com/image">https://www./media.sciencephoto.com/image</a> )	11
<b>Figure 4</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ( <a href="https://www.biomerieuxindustry.com">https://www.biomerieuxindustry.com</a> )	12
<b>Figure 5</b>	<i>Vibrio cholerae</i> ( <a href="https://www.media.istockphoto.com/photos/vibrio">https://www.media.istockphoto.com/photos/vibrio</a> )	12
<b>Figure 6</b>	<i>Salmonella enterica</i> ( <a href="https://www.allaboutfeed.net/wpcontent/uploads/2020">https://www.allaboutfeed.net/wpcontent/uploads/2020</a> )	12
<b>Figure 7</b>	<i>Shigella sonnei</i> ( <a href="https://www.2Fvideohive.shigella-sonnei">https://www.2Fvideohive.shigella-sonnei</a> )	13
<b>Figure 8</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i> ( <a href="https://www.healthjade.net/yersinia-enterocolitica-infection">https://www.healthjade.net/yersinia-enterocolitica-infection</a> )	13
<b>Figure 9</b>	Le devenir des bactéries entériques dans le milieu côtier (d'après Courtois 1993)	14
<b>Figure 10</b>	Le séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel (© 2020 Parlons sciences à partir d'une image d'Estevezj [CC BY-sa] via Wikimedia Commons).	18
<b>Figure 11</b>	Les différentes espèces de bivalves ( <a href="https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Bivalves">https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Bivalves</a> )	24
<b>Figure 12</b>	La moule <i>Perna perna</i> . a. Morphologie de la coquille externe, b. Morphologie de la coquille interne	28
<b>Figure 13</b>	La répartition géographique de la moule <i>Perna perna</i> (d'après Gardner et al. 2016)	29
<b>Figure 14</b>	Les différentes fractions constitutives d'un sédiment (d'après Rusch 2010)	30
<b>Figure 15</b>	Le devenir des bactéries dans les sédiments (d'après Thupaki et al. 2013)	32
<b>Figure 16</b>	Localisation géographique du Golfe d'Annaba et des différents sites de prélèvements. S1 : Cap de Garde, S2: Rezgui Rachid, S3: Sidi Salem, S4: Lahnaya	35
<b>Figure 17</b>	Prélèvement de l'eau	39
<b>Figure 18</b>	Prélèvement des sédiments	39
<b>Figure 19</b>	Récolte des moules	39
<b>Figure 20</b>	Schéma des étapes de l'analyse bactériologique des échantillons	41
<b>Figure 21</b>	Schéma des étapes de la préparation des dilutions décimales (pour l'eau de mer)	42
<b>Figure 22</b>	Schéma des étapes de la préparation de la dilution mère et des dilutions décimales (pour les sédiments)	42
<b>Figure 23</b>	Schéma des étapes de la préparation e la dilution mère et des dilutions décimales (pour les moules) : 1. désinfection superficielle de la moule, 2. Préparation de la dilution mère, 3. Préparation des dilutions décimales	43
<b>Figure 24</b>	Schéma du dénombrement des coliformes totaux et fécaux et caractérisation d' <i>Escherichia coli</i>	46

<b>Figure 25</b>	Schéma de la recherche et dénombrement des streptocoques fécaux	48
<b>Figure 26</b>	Schéma de l'isolement et la purification des isolats potentiellement pathogènes	50
<b>Figure 27</b>	Schéma du protocole d'extraction d'ADN des moules	55
<b>Figure 28</b>	Schéma de l'extraction de l'ADN génomique	57
<b>Figure 29</b>	Variations spatio-temporelles de la température de l'eau du Golfe d'Annaba	62
<b>Figure 30</b>	Variations spatio-temporelles de l'oxygène dissous de l'eau du Golfe d'Annaba	62
<b>Figure 31</b>	Variations spatio-temporelles du pH de l'eau du Golfe d'Annaba	63
<b>Figure 32</b>	Variations spatio-temporelles de la salinité de l'eau du Golfe d'Annaba	63
<b>Figure 33</b>	Variations spatio-temporelles des MES de l'eau du Golfe d'Annaba	63
<b>Figure 34</b>	Variations spatiotemporelles des teneurs en coliformes totaux enregistrés dans le Golfe d'Annaba (CT : coliformes totaux ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule)	65
<b>Figure 35</b>	Variations spatiotemporelles des teneurs en <i>E. coli</i> enregistrés dans le Golfe d'Annaba ( <i>E.coli</i> : <i>Escherichia coli</i> ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule)	66
<b>Figure 36</b>	Variations spatiotemporelles des teneurs en streptocoques fécaux enregistrés dans le Golfe d'Annaba (SF : streptocoques fécaux ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule)	67
<b>Figure 37</b>	Aspects macroscopiques des colonies sur les différents milieux de cultures utilisés	68
<b>Figure 38</b>	Aspect microscopique des bactéries : a. à Gram positif ; b. à Gram négatif	70
<b>Figure 39</b>	Répartition des bactéries isolées dans le Golfe d'Annaba : a. Selon les échantillons étudiés ; b. Selon les sites d'échantillonnage. (S1) Cap de Garde, (S2) Rezgui Rachid, (S3) Sidi Salem, and (S4) Lahnaya	71
<b>Figure 40</b>	Les différences saisonnières dans la diversité des isolats potentiellement pathogènes dans les échantillons de moule, de sédiment, et de l'eau de mer	71
<b>Figure 41</b>	Abondance relative des bactéries potentiellement pathogènes dans l'eau de mer (bleu), les sédiments (orange), et les moules (vert). (S1) Cap de Garde, (S2) Rezgui Rachid, (S3) Sidi Salem, and (S4) Lahnaya	72
<b>Figure 42</b>	Abondance relative des bactéries potentiellement pathogènes selon les classes Alphaprotéobactérie, Betaprotéobactéries, Gammaprotéobactéries, Bacilli et Actinobactéries	73
<b>Figure 43</b>	Analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur des données provenant d'échantillons d'eau de mer. a Corrélation des variables environnementales avec les deux premiers axes de l'ACP. b Corrélation des variables environnementales avec le premier et troisième axes de l'ACP. Les variables principales sont indiquées par des flèches pleines, et les variables supplémentaires par des flèches en pointillés. OD : oxygène dissous ; Sal : salinité ; T : température de l'eau ; MES : matières en suspension ; EC : <i>Escherichia coli</i> ; CT : coliformes totaux ; et SF : streptocoques fécaux. ; T, température de l'eau ; SS, matières en suspension ; EC, <i>Escherichia coli</i> ; TC, coliformes totaux ; et FS, streptocoques fécaux.	75
<b>Figure 44</b>	Projections des mois et des sites d'échantillonnage.a. Projection des mois d'échantillonnage sur les deux premiers axes de l'ACP. b. Projection des sites d'échantillonnage sur les deux premiers axes de l'ACP	76
<b>Figure 45</b>	Classification ascendante hiérarchique de la variabilité inter-sites selon la variation des variables biotiques et abiotiques (Golfe d'Annaba 2018).	77

<b>Figure 46</b>	Caractéristiques morphologiques de la moule brune <i>Perna perna</i> collectée dans le Golfe d'Annaba : A. Morphologie externe de la coquille, B. Morphologie interne de la coquille : papilles lisses de la coquille et du manteau de <i>P. perna</i> , C. Cicatrices des muscles rétracteurs sur la valve gauche nettoyée : la présence de deux cicatrices de rétracteur séparées sur la coquille est indiquée, D. Muscles rétracteurs du byssus	79
<b>Figure 47</b>	Résultat de la migration du produit de la PCR sur gel d'agarose. M : marqueur de tailles de l'ADN	79
<b>Figure 48</b>	Arbre phylogénétique montrant la position taxonomique de la moule <i>P. perna</i> . Les séquences d'ARNr 16S mitochondrial de 25 espèces de mytilidés, sont comparées par un alignement de séquences multiples Clustal X (Kumar et al. 2016). <i>Perna perna</i> S3 du Golfe d'Annaba est représentée en gras. Les numéros d'accèsion des séquences représentatives sont entre parenthèses et la séquence de l'espèce <i>Geukensia demissa</i> est utilisée pour enraciner l'arbre	81
<b>Figure 49</b>	Résultats de la migration des produits de la PCR sur gel d'agarose. M, marqueur de tailles de l'ADN ; les lignes (EM18-BM4) représentent les produits amplifiés (environ 1500 pb) des isolats bactériens	82
<b>Figure 50</b>	Phylogénie des 25 isolats avec identification moléculaire. Les séquences d'ARNr 16S des 25 isolats sélectionnés, ainsi que le meilleur résultat de la base de données GenBank pour chacune des séquences, sont comparés dans un alignement de séquences multiples Clustal X (Kumar et al. 2016). Les numéros d'accèsion des séquences de référence sont entre parenthèses, et <i>Halobacterium</i> sp. A1 <sup>T</sup> est utilisée pour enraciner l'arbre.	84
<b>Figure 51</b>	Amplification par PCR de sept gènes d' <i>E. coli</i> EM97. Les bandes des gènes <i>trpA</i> à <i>putB</i> représentent les produits PCR amplifiés à partir de l'isolat EM97 ( <i>E. coli</i> ). M, échelle d'ADN	85
<b>Figure 52</b>	Arbre phylogénétique montrant les distances entre les cinq isolats d' <i>E. coli</i> analysés de S3, comparées aux souches d' <i>E. coli</i> de la base de données NCBI (numéros d'accèsion entre parenthèses). L'arbre a été enraciné en utilisant <i>Salmonella enterica</i> .	86
<b>Figure 53</b>	Principales sources de pollution à Sidi Salem. a. source de pollution animale (animaux domestiques et oiseaux). b. rejet direct des eaux usées. c. Oued Sybouse	90
<b>Figure 54</b>	Principales sources de pollution à Rezgui Rachid. A. Rejet direct des déchets liquides et solides, b. source de pollution animale par les oiseaux .c. source de pollution humaine par les baigneurs	91
<b>Figure 55</b>	Principales sources de pollution : a. au Cap de Garde (source de pollution animale).b. à Lahnaya (rejets des déchets solides et liquides : photo prise par l'associatin Green Bike en 2018).	92
<b>Figure 56</b>	Disposition des insertions musculaires sur la coquille de <i>Perna perna</i> (a) et de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (b) : ma = muscle adducteur antérieur. mp= muscle adducteur postérieur. rab=rétracteur antérieur du byssus. rmb = rétracteurs moyens du byssus. rpb rétracteurs postérieurs du byssus .rp= rétracteur du pied	98

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Titre	N° du tableau
<b>Tableau 1</b>	Les agents pathogènes microbiens associés aux maladies liées aux eaux récréatives ou aux mollusques et crustacés (d'après <i>Malham et al. 2014</i> )	20
<b>Tableau 2</b>	La qualité requise des eaux de baignades (paramètres microbiologiques) (J.O. N°46 – Décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993)( <i>JORA 1993</i> )	22
<b>Tableau 3</b>	Les exigences réglementaires microbiologiques issues du classement des zones conchylicoles (Règlement (CE) n° 854/2004 et arrêté du 06/11/2013) fixant les conditions sanitaires de transfert et de traçabilité des coquillages vivants	23
<b>Tableau 4</b>	Les caractéristiques des sites d'échantillonnage dans le Golfe d'Annaba	36
<b>Tableau 5</b>	Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour l'identification des moules)	56
<b>Tableau 6</b>	Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour l'identification moléculaire des isolats bactériens)	58
<b>Tableau 7</b>	Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour MLST)	60
<b>Tableau 8</b>	Tableau récapitulatif des amorces utilisées pour l'amplification des gènes de MLST	61
<b>Tableau 9</b>	Matrice de corrélation de Spearman des variables de la qualité des eaux marines en 2018. OD : oxygène dissous ; Sal : salinité ; T : température de l'eau ; MES : matières en suspension ; EC : <i>Escherichia coli</i> ; CT : coliformes totaux ; et SF : streptocoques fécaux	74
<b>Tableau 10</b>	Caractéristiques morphologiques des espèces de moules <i>Perna perna</i> du Golfe d'Annaba	78
<b>Tableau 11</b>	Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes de l'ARNr 16S par BLAST	83
<b>Tableau 12</b>	Résultats de la comparaison entre l'identification biochimique par API système et l'identification moléculaire de 25 isolats isolés de <i>P. perna</i> / : Non analysé.	87
<b>Tableau 13</b>	Caractères distinctifs entre la musculature de <i>M. galloprovincialis</i> et de <i>P. perna</i> (Linnaeus, 1758).	98

---

# ***INTRODUCTION GÉNÉRALE***

### **Introduction générale**

Depuis plusieurs décennies, les écosystèmes marins côtiers sont constamment menacés par plusieurs activités anthropiques telles que le déversement des eaux usées non traitées, les ruissellements urbains et les rejets massifs d'effluents agricoles et industriels (*Ghozzi et al. 2017 ; Damak et al. 2020*). Les eaux côtières sont souvent le milieu récepteur de toutes sortes de rejets d'eaux usées contenant de nombreux microorganismes nocifs pour la santé humaine et les organismes marins, en particulier dans les plages de baignade et les zones conchylicoles (*Perkins et al. 2014*). Ainsi, l'impact sur la santé est plus que préoccupant, plaçant la pollution microbiologique comme un problème majeur de santé publique.

De nombreuses bactéries pathogènes pour l'homme sont présentes dans les eaux côtières. Elles peuvent être classées comme des bactéries allochtones, provenant des bassins versants, ou comme des bactéries autochtones telles que les vibrions (*Leight et al. 2018*).

Les bactéries d'origine fécale sont des colonisatrices naturelles du tube digestif des mammifères et se retrouvent donc souvent dans les environnements estuariens et côtiers. Bien que ces bactéries ne soient pas nécessairement pathogènes elles-mêmes, mais leur présence dans l'eau indique un risque de contamination par des bactéries pathogènes (*Nevers et al. 2016 ; NSSP 2017*). En effet, les agents pathogènes bactériens préoccupants comprennent la souche entéro-hémorragique *E. coli* O157:H7 responsable le plus souvent de colites hémorragiques chez l'homme ainsi que *Salmonella* non typhoïde, principale cause d'hospitalisation et de décès par gastro-entérite aux États-Unis (*Labbé et Garcia 2013*).

La contamination fécale des eaux côtières est souvent due à des sources ponctuelles de rejets d'eaux usées non traitées, en particulier en présence de systèmes combinés d'eaux usées et d'eaux pluviales, tandis que les diverses sources non ponctuelles comprennent les écoulements terrestres, agricoles et pluviaux (*Barberi et al. 2020*). L'augmentation du ruissellement de surface des bassins versants est liée aux grandes précipitations, ce qui entraîne un effet saisonnier de la pollution fécale qui peut également être associé à une utilisation accrue des côtes en période estivale (*Tilburg et al. 2015*).

Les variations spatio-temporelles de l'abondance des bactéries d'origine fécale dans les milieux marins côtiers sont contrôlées par les interactions de paramètres biologiques, physiques et chimiques tels que la disponibilité des éléments nutritifs, la matière organique, la granulométrie des sédiments, la teneur en argile, la prédation par les protozoaires, la compétition parallèlement aux variations environnementales telles que la température, la salinité, l'intensité de

l'ensoleillement et les variations saisonnières (*Pote et al. 2009 ; Garzio-Hadzick et al. 2010 ; Perkins et al. 2014*).

Ainsi, les particules et les sédiments offrent plusieurs avantages en termes de survie et de persistance aux bactéries d'origine fécale, comme par exemple une protection contre les rayons ultraviolets, un abri contre la prédation, et une plus grande teneur en matière organique par rapport à la colonne d'eau (*Hassard et al. 2016*). Cependant, les processus hydrodynamiques (les marées et les tempêtes), les activités récréatives et les perturbations mécaniques telles que le dragage commercial, sont autant de facteurs à même de remettre en suspension les particules de sédiments et les bactéries qui leur sont associées dans la colonne d'eau, entraînant des niveaux élevés de pollution (*Luna et al. 2012*).

Aussi, les bivalves mollusques, invertébrés sessiles, résistants aux facteurs de stress environnementaux et doués d'une grande capacité de filtration de l'eau, ont été largement utilisés comme bio-indicateurs de la pollution côtière (*Ozkan et al. 2017 ; Jia et al. 2018*). Ces invertébrés, en particulier les moules, ont le potentiel d'accumuler de grandes quantités de microorganismes provenant des eaux qui les entourent, notamment des bactéries opportunistes (*Aeromonas spp, Vibrio spp*), des parasites protozoaires (*Cryptosporidium, Giardia*), des virus (adénovirus, hépatovirus), ainsi que des bactéries pathogènes (*E. coli, Salmonella spp*) (*Ghozzi et al. 2017*). Leur consommation en tant que fruits de mer est un risque de santé publique (*Vincy et al. 2017*).

De nombreuses études ont rapporté que plusieurs maladies graves telles que la gastro-entérite aiguë et les infections par le virus de l'hépatite E sont liées à la présence de microorganismes pathogènes dans les bivalves, en particulier lorsqu'ils sont consommés crus ou insuffisamment cuits (*O'Hara et al. 2018 ; Kobayashi et al. 2019 ; Fouillet et al. 2020*).

La moule brune *Perna perna* (Linnaeus, 1758) est un mollusque bivalve appartenant à la famille des *Mytilidae*. Elle est largement distribuée dans plusieurs régions de la mer Méditerranée, ainsi que dans les océans, Atlantique et Indien (*dos Santos et al. 2018 ; Neves et al. 2019*). Cette large distribution géographique rend également cette espèce appropriée pour la détermination des niveaux de pollution, en particulier dans les régions qui ne sont pas économiquement et techniquement préparées à contrôler la contamination aquatique par des analyses plus sophistiquées (*Sokolowski et al. 2004 ; Francioni et al. 2004*).

En raison de son importance en tant que source précieuse pour l'alimentation humaine, *P. perna* est aussi considérée comme l'une des espèces aquacoles clés dans le monde (*FAO 2019 ; Krampah et al. 2020*).

## ***Introduction générale***

En Algérie, la moule *P. perna* est présente au niveau des plages rocheuses des régions côtières. Cette espèce est largement utilisée comme bio-indicateur de la pollution côtière pour identifier et classer les sites les plus appropriés pour la mytiliculture (***Belabed et al. 2013 ; Boudjema et al. 2014 ; Kadri et al. 2017 ; Kerdoussi 2018 ; Abderrahmani et al. 2020***). Comme tous les pays d'Afrique du Nord, la mytiliculture le long des côtes algériennes fait face à d'importantes contraintes telles que sa faible commercialisation, la faible disponibilité de bons sites, le manque de personnel qualifié et les contraintes financières. Cependant, les universités Algériennes (d'Oran, de Mostaganem, d'Alger et d'Annaba) font des efforts importants pour développer ce secteur (***Kara et al. 2018***).

Le Golfe d'Annaba est l'une des régions côtières les plus précieuses du Nord de l'Algérie, en raison de sa grande importance touristique et économique (***Ouali et al. 2018***). Cependant, il est très vulnérable à plusieurs types de polluants, principalement liés aux rejets agricoles et industriels intensifs et à la présence de déchets domestiques, notamment en périphérie de la ville où se concentre une forte population (***Amri et al. 2017 ; Ouali et al. 2018***). D'autres sources de contaminants environnementaux naturels, tels que le lessivage des sols, les excréments des animaux et les rejets des rivières, ainsi que les problèmes liés aux changements climatiques, sont également responsables de la pollution dans le Golfe d'Annaba. Selon Barreras et al. (***2019***), l'augmentation des températures de la surface de la mer est une conséquence du changement climatique attendu, et cela prolongera la période pendant laquelle les bactéries fécales peuvent survivre, ce qui entraînera une augmentation de la charge bactérienne.

Lors d'activités récréatives, la présence de contaminants fécaux présente un risque important pour la santé humaine, car de nombreux agents pathogènes entériques sont souvent associés à des matières fécales (***Oliveira et al. 2016***). Aussi le contact direct ou indirect avec l'eau, peut provoquer diverses maladies hydriques, des affections des oreilles, des yeux et de la peau (***Chávez-Díaz et al. 2020***).

En dépit de cette pression croissante de la pollution et des dangers qu'encourt la population, peu d'études ont été menées sur le sujet (***Kerdoussi 2010 ; Kadri et al. 2015, 2017***), car la contamination fécale et son impact sur la santé humaine dans le Golfe d'Annaba est très préoccupante à juste titre ; aussi, nous nous sommes intéressés à cette problématique à travers les objectifs suivants :

- Évaluer l'occurrence et la distribution des indicateurs fécaux et des bactéries potentiellement pathogènes dans les trois compartiments, eau, sédiment et moule, tout en mettant en œuvre une stratégie d'échantillonnage spatio-temporelle.
- Évaluer l'impact des variables physico-chimiques de l'eau, telles que la température, la salinité, le pH, l'oxygène dissous ainsi que les matières en suspension, sur l'abondance des bactéries indicatrices fécales.
- Déterminer les foyers de fortes contaminations et les différentes sources de pollutions qui peuvent influencer la qualité des eaux du Golfe.

Il faut également souligner que la présente étude est la première en Algérie à identifier et le bio-indicateur (la moule) et les contaminants (les bactéries potentiellement pathogènes) à travers une analyse moléculaire réalisée au niveau de Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM), Toulouse-France.

### **Organisation du manuscrit**

L'ensemble des données obtenues dans cette étude est présenté dans ce manuscrit sous forme de quatre parties :

La première partie est essentiellement consacrée à une étude bibliographique récente. Son objectif principal est d'avoir une vision claire sur la thématique et sur le contexte dans lequel elle s'inscrit. Elle vise également à apporter des réponses aux questions suivantes : quelles sont les principales causes de la contamination bactériologique dans les milieux marins ? Quelles sont les bactéries impliquées dans cette contamination ? Quels sont les enjeux liés à la contamination bactériologique dans les milieux côtiers ? Quels sont les risques sanitaires et économiques associés aux eaux récréatives et à la conchyliculture ? En outre, cette partie synthétise également des informations générales sur les sédiments côtiers et les mollusques bivalves ainsi que des données relatives à la moule de l'espèce *Perna perna*.

La deuxième partie est un chapitre méthodologique, présentant la zone et les sites d'étude ainsi que les stratégies d'échantillonnage. Elle décrit également les différentes procédures expérimentales réalisées : analyses des variables physico-chimiques (température, salinité, pH, oxygène dissous, matières en suspension), analyses bactériologiques (dénombrement des bactéries indicatrices et recherches des germes potentiellement pathogènes), analyses statistiques et enfin des analyses moléculaires.

## ***Introduction générale***

La troisième et la quatrième partie sont consacrées à une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus, aux traitements des données ainsi qu'à leurs interprétations.

Enfin nous terminons par une conclusion générale incluant des recommandations et des perspectives, ainsi que toutes les références bibliographiques consultées dans cette étude.

## ***I. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE***

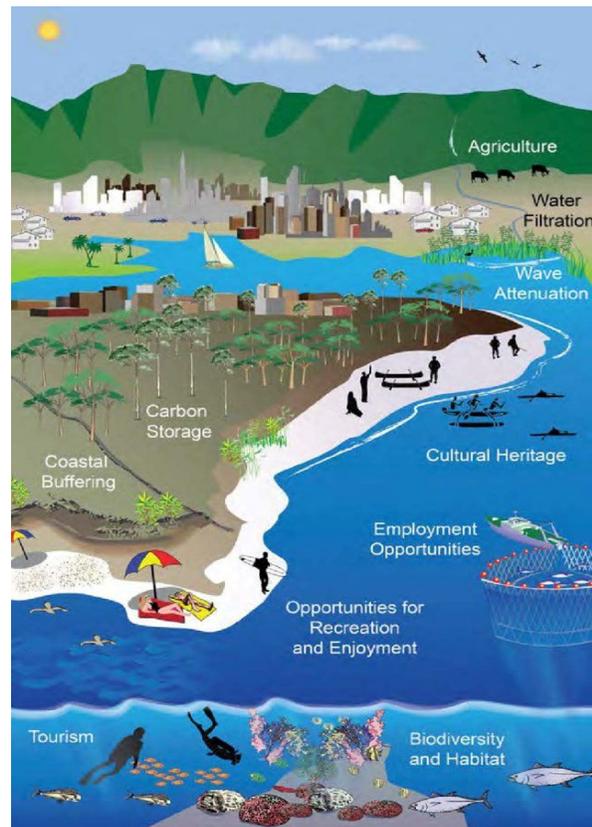
## CHAPITRE 1 : ÉVALUATION DE LA QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE DES EAUX MARINES

### 1. L'importance écologique, économique et sociale des écosystèmes côtiers

La planète Terre est une planète côtière. Elle comprend 361,13 millions de km<sup>2</sup> d'eau (71 % de la surface totale de la planète) et 148,94 millions de km<sup>2</sup> de terre (29 % de la surface totale de la planète). Terre et mers interagissent tous les deux de manière intensive et extensive le long des 1 634 701 km de littoral de la planète (*Burke et al. 2001*).

Les zones côtières qui sont situées à l'interface entre la mer et la terre représentent des zones de transition qui sont considérées comme les milieux les plus riches les plus productifs de la planète. Les apports en nutriments provenant du ruissellement des bassins versants constituent un enrichissement naturel des eaux côtières. Ces nutriments sont incorporés dans les réseaux alimentaires et soutiennent ainsi une productivité élevée (*Laffaille et al. 2002 ; Kerambrun 2011*). Les écosystèmes marins côtiers ont la particularité de pouvoir stocker du carbone pendant des milliers d'années, lorsqu'ils sont en bonne santé, ils peuvent réduire les impacts négatifs de la prolifération de certains végétaux, notamment les algues planctoniques.

(<https://www.biodiversite.gouv.fr>).



**Figure 1** : Les services des écosystèmes côtiers (<http://nca2014.globalchange.gov/report/regions/coasts/graphics/coastal-ecosystemservices>).

Les zones côtières fournissent des services très précieux pour la société humaine. Les biens provenant des habitats marins et côtiers comprennent la nourriture pour les humains et les animaux, les minéraux, ainsi que les matériaux de construction (sable, roche et bois).

## ***I. Synthèse bibliographique***

Les produits de la conchyliculture et de la pêche contribuent à la sécurité alimentaire en fournissant des apports nutritionnels essentiels, voire en assurant la subsistance de certaines populations des zones côtières (Fig.1) (*Martínez et al. 2007*).

La beauté et la richesse des zones côtières, associée à une accessibilité plutôt élevée et aux nombreux services offerts par ces écosystèmes, font des côtes un pôle d'attraction pour la population humaine mondiale. Les gens se dirigent vers les côtes pour y vivre, mais aussi pour les loisirs, les activités récréatives ou encore pour faire du tourisme (Fig. 1). Il est intéressant de noter que les estimations de la densité démographique le long des côtes ont évolué au fil du temps. Small et Nicholls (*2003*) ont indiqué qu'en 1990, 30 % (1,2 milliard) de la population humaine mondiale vivait sur ou près de la côte, alors que ce chiffre était passé à 41% (2,5 milliards) en 2002.

### **2. La perturbation des écosystèmes côtiers**

Les écosystèmes marins et côtiers ont été sérieusement menacés, en particulier au cours des dernières années, par des activités anthropiques, telles que les rejets massifs d'effluents urbains, agricoles et industriels. Cette pollution accrue a eu des effets négatifs considérables, tels que la perte de la biodiversité marine et la perturbation des fonctions écologiques.

#### **2.1 La pollution de l'écosystème marin**

##### **2.1.1 La pollution chimique**

La pollution chimique est l'introduction de contaminants chimiques d'origine domestique et industrielle. Les polluants d'origine humaine les plus courants qui atteignent le milieu marin sont les pesticides, les engrais, les détergents, le pétrole, et les produits chimiques industriels (*Benkaddour 2018*).

Ce type de pollution se produit lorsque les activités humaines, notamment l'utilisation d'engrais dans les exploitations agricoles, entraînent le ruissellement de produits chimiques dans les cours d'eau qui se jettent finalement dans la mer. La concentration accrue de produits chimiques, comme l'azote et le phosphore, dans le milieu côtier favorise la prolifération d'algues, qui peuvent être toxiques pour la faune et dangereuses pour les humains (<https://www.nationalgeographic.org/>).

##### **2.1.2 La pollution physique**

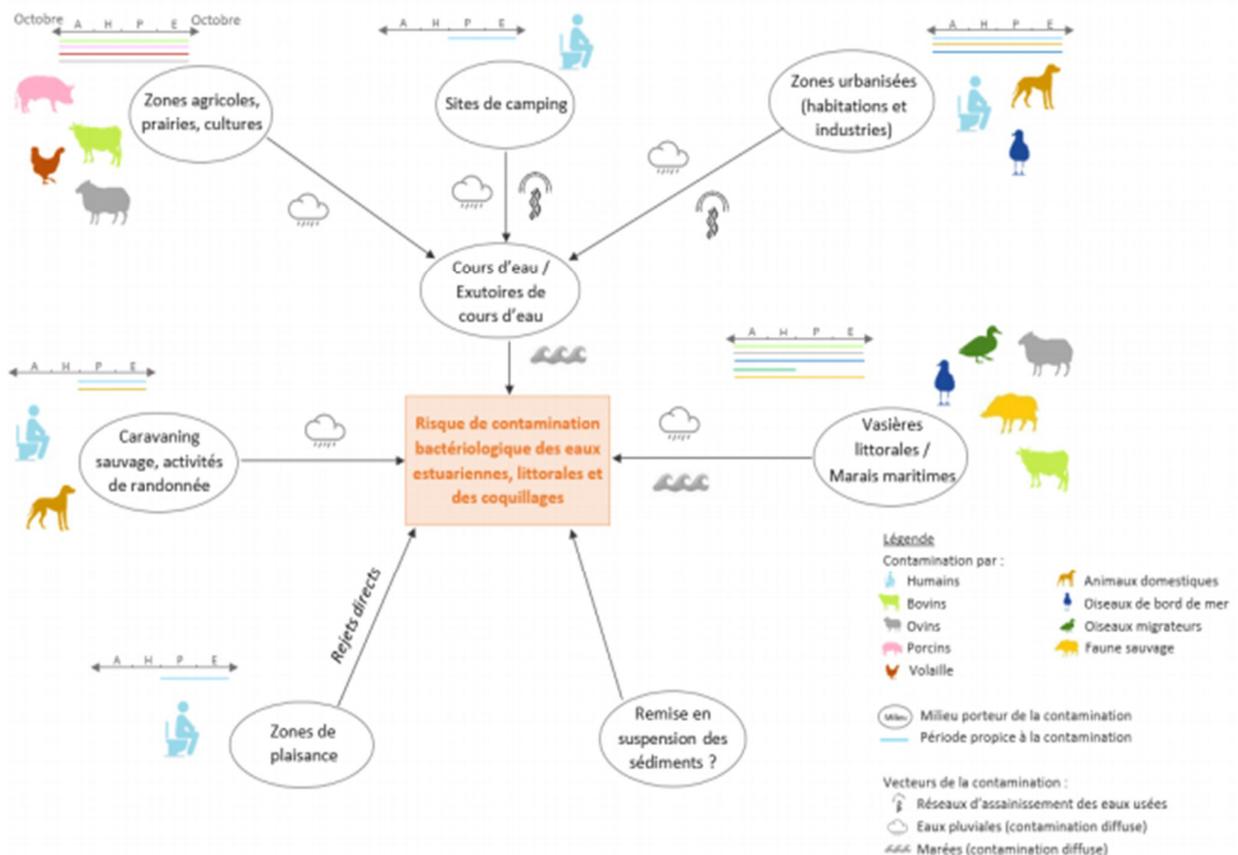
La pollution physique est la modification de la structure physique du milieu marin par divers facteurs. Elle peut provenir d'un rejet d'eau refroidie ou réchauffée (par une usine de regazéification de gaz liquide ou une centrale électrique), des rejets d'eaux douces qui fera baisser la salinité d'un

lieu (par une centrale hydroélectrique), des rejets liquides ou solides de substances modifiant la turbidité du milieu (macro-déchets, limon, boue), des rejets des éléments radioactifs par les usines de traitement de déchets radioactifs ainsi que par les centrales nucléaires (*Taghezout 2015*).

### **2.1.3 La pollution microbiologique**

La pollution microbiologique est un grave problème écologique et de santé publique dans les zones côtières marines, en particulier celles situées à proximité des zones fortement polluées (*Devlin et al. 2020*). Les activités humaines peuvent accélérer le rythme de l'apport de nutriments dans les écosystèmes aquatiques. Une fois déversés dans la mer, les écoulements de surface et les déchets urbains, municipaux, domestiques et industriels insuffisamment traités peuvent favoriser l'apparition d'une pollution microbiologique, qui est souvent de nature fécale et liée à l'homme, aux animaux domestiques (*Jung et al. 2014*). Les principales origines de la contamination microbiologique des ressources aquatiques sont les rejets des stations d'épuration, des hôpitaux et des industries qui sont considérées comme des sources ponctuelles (Fig. 2).

L'abondance des agents pathogènes dans l'eau dépend de plusieurs facteurs tels que le niveau de contamination, la persistance des agents pathogènes dans les masses d'eau, et les réservoirs biologiques (y compris les plantes aquatiques et les sédiments).



**Figure 2 :** Principales origines et vecteurs de risque des contaminations bactériologiques des eaux littorales (d'après *Kischel 2018*).

### 3. Les principales bactéries incriminées dans la pollution microbiologique

#### 3.1 Les bactéries indicatrices de la contamination fécale

Toutes les communautés et les régions côtières tentent actuellement de résoudre les problèmes de qualité de l'eau liés à des sources de pollution essentiellement diffuses. L'eau de mer, fortement polluée par les effluents d'eaux usées non traitées, l'évacuation des eaux usées municipales et les activités de loisirs, est contaminée par des bactéries fécales. Les bactéries isolées sont principalement des microorganismes pathogènes, notamment *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia enterocolitica* et certaines souches d'*E.coli* (*Kilinc et Besler 2014*).

Bien que plusieurs bactéries soient actuellement utilisées comme des bactéries indicatrices de la contamination fécale, la bactérie indicatrice idéale devrait être :

- ✓ Présente dans le tractus intestinal des animaux à sang chaud.
- ✓ Présente en présence d'agents pathogènes et absente dans les échantillons non contaminés.

- ✓ Présente en plus grand nombre que l'agent pathogène.
- ✓ Capable de survivre de la même manière que les agents pathogènes dans l'environnement.
- ✓ Incapable de se multiplier dans l'environnement.
- ✓ Détectée et quantifiée par des méthodes faciles, rapides et peu coûteuses.
- ✓ Non pathogène (*Ishii et Sadowsky 2008, McKee et Cruz 2021*).

### 3.1.1 Les coliformes totaux (CT)

Les coliformes totaux sont classiquement définis comme étant les bactéries aérobies ou anaérobies facultatives, à Gram négatif, oxydase négative, non sporulées, en forme de bâtonnets, et qui fermentent le lactose en acide et en gaz pendant 24 à 48 heures à 35 à 37 °C d'incubation (*Molina et al. 2015*). La pertinence des coliformes totaux en tant qu'indicateurs est très contestée car tous les bactéries incluses dans ce groupe ne sont pas toujours spécifiques de la flore intestinale des animaux à sang chaud. Certaines bactéries sont en effet d'origine terrestre ou aquatique et sont capables de se développer dans les milieux aquatiques (*Clarke et al. 2017*).

### 3.1.2 Les coliformes fécaux ou thermo-tolérants (CF)

Les coliformes fécaux ou thermo-tolérants sont des coliformes qui fermentent le lactose et produisent du gaz à 44,5°C. On pensait à l'origine que la croissance à des températures élevées sélectionnait les coliformes d'origine purement fécale et ces organismes étaient donc appelés coliformes « fécaux ». Ils sont considérés comme étant présents spécifiquement dans l'intestin et les matières fécales des animaux à sang chaud.

Comme les origines des CF sont plus spécifiques que celles des CT, ils sont considérés comme des indicateurs plus précis de la contamination fécale que les coliformes totaux (*Mishra et al. 2018*). Les études de caractérisation des matières fécales humaines et animales montrent que la bactérie *E. coli* représente plus de 94 % des coliformes thermo-tolérants isolés directement des matières fécales humaines, tandis que les autres coliformes thermo-tolérants ne représentent que 3,2 à 7,4% (*Tallon et al. 2005*).

### 3.1.3 La bactérie *Escherichia coli* (*E.coli*)

*E. coli* est la principale espèce du groupe des coliformes thermo-tolérants qui produisent de l'indole à partir du tryptophane et possédant l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase (*Scheutz et Strockbine 2015*). C'est un membre indigène de la flore intestinale des humains et des animaux à sang chaud (*Leclerc et al. 2001*). Par conséquent, *E. coli* est considéré comme le meilleur indicateur de la pollution fécale et de la présence éventuelle d'agents pathogènes.

## I. Synthèse bibliographique

Seul un petit nombre de souches d'*E. coli* provoque des maladies infectieuses ; les souches responsables des maladies diarrhéiques chez l'homme peuvent être classées dans l'un des six groupes suivants : *E. coli* entéropathogène (EPEC), *E. coli* entérotoxigène (ETEC), *E. coli* entéro-invasif (EIEC) ; *E. coli* entérohémorragique (EHEC) ; *E. coli* entéroagrégative (EAaggEC) ; et *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) (Lara et al. 2017).

### 3.1.4 Les entérocoques intestinaux (EI)

Le genre *Enterococcus* comprend des cocci anaérobies facultatives à Gram positif, catalase négative, oxydase négative et qui se produisent généralement seuls, par paires ou en chaînettes. Ils sont largement répandus dans l'environnement et habitent principalement le tractus gastro-intestinal humain et animal (Selleck et al. 2019). Ils diffèrent des coliformes par leur tolérance au sel et leur capacité à se développer en présence de 6,5 % de NaCl, ainsi que par leur résistance relative aux températures de congélation. Auparavant, les espèces d'*Enterococcus* étaient classées comme streptocoques fécaux (SF) ou streptocoques du groupe D. Les 5 espèces les plus connues parmi les SF sont : *S. bovis*, *S. equinus*, *S. avium*, *S. faecalis* et *S. faecium* de la famille des *Streptococcaceae* (Robinson et Richard 2014).

### 3.2 Les bactéries potentiellement pathogènes dans le milieu marin

Les agents pathogènes bactériens sont l'une des principales causes de gastro-entérite dans le monde (Rincé et al. 2018). Certains présents dans l'environnement marin ont été identifiés : *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*, etc.

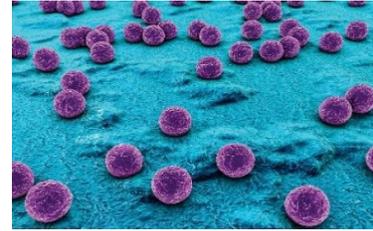
*Clostridium perfringens* est un indicateur microbiologique de la contamination fécale, car il est d'origine intestinale (Fig. 3) (Curiel et al. 2012). Les spores de cette espèce survivent plus longtemps que les coliformes. Dans une étude précédente, un nombre élevé de *C. perfringens* a été détecté dans les sédiments marins près de l'émissaire des eaux usées ; les zones avec des niveaux élevés de *C. perfringens* étaient associées à des déversements connus de boues d'épuration (Kilinc et Besler 2014).



**Figure 3:** *Clostridium perfringens* (<https://www.media.sciencephoto.com/image>).

## I. Synthèse bibliographique

*Staphylococcus aureus* (Fig. 4) est considéré comme un indicateur supplémentaire pour la surveillance de la qualité des eaux côtières (Topić et al. 2021). La présence de *S. aureus* dans les environnements marins côtiers a été liée au nombre de baigneurs et peut être considérée comme un indicateur de risque pour les maladies de la peau, des yeux et des oreilles (Gabutti et al. 2000).



**Figure 4 :** *Staphylococcus aureus* (<https://www.biomerieuxindustry.com>).

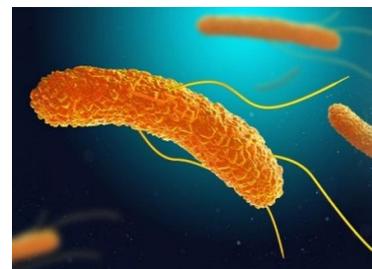
*Vibrio cholerae* peut constituer un risque grave pour la santé publique lorsqu'il est ingéré via de l'eau non traitée, des fruits de mer contaminés (crus ou mal cuits) ou l'exposition de plaies cutanées à l'eau de mer (Okeyo et al. 2018). La bactérie *V. cholerae* (Fig. 5) est l'agent causal du choléra, une maladie diarrhéique grave qui reste une cause majeure de décès dans les pays en développement (Whittman et Flick 1996 ; Chavez et al. 2005).



**Figure 5 :** *Vibrio cholerae* (<https://www.media.istockphoto.com/photos/vibrio>).

Les salmonelles (Fig. 6) sont considérées comme des microorganismes typiquement intestinaux, étant capables de coloniser le tractus gastro-intestinal des animaux et des humains (Khan 2014). Elles peuvent être présentes dans les eaux usées agricoles et domestiques, les eaux douces, ainsi que dans les eaux marines.

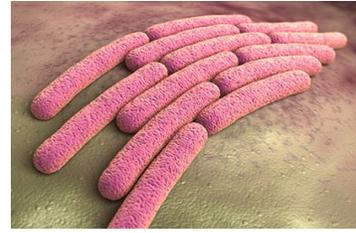
*Salmonella enterica* est la principale cause de maladies d'origine alimentaire aux États-Unis. La consommation de mollusques crus contaminés par cette bactérie pathogène est une source fréquemment impliquée dans les maladies gastro-intestinales (Morrison et al. 2011).



**Figure 6 :** *Salmonella enterica* (<https://www.allaboutfeed.net/wpcontent/uploads/2020>).

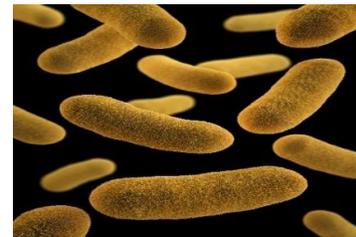
## I. Synthèse bibliographique

**Shigella** est l'agent causal de la maladie de la shigellose ou dysenterie bacillaire, qui se transmet naturellement par l'eau ou des aliments contaminés par des matières fécales (*Magana-Arachchi et Wanigatunge 2020*). Les humains sont les principales sources de *Shigella sonnei* (Fig. 7), qui serait la cause prédominante des épidémies de shigellose (*Sahlstrom et al. 2004*).



**Figure 7 :** *Shigella sonnei* (<https://www.2Fvideohive.shigella-sonnei>).

*Yersinia enterocolitica* est isolée du sol, de l'eau, des animaux et de divers aliments. Cette bactérie est principalement un agent pathogène zoonotique fréquemment associé à une gastro-entérite humaine (Fig. 8) (*Sahlstrom et al. 2004 ; Rakin et al. 2015*). Selon une étude récente, cette bactérie a été signalée dans des échantillons d'huîtres (13%), de crevettes (3-4%) et de crabes bleus (21%) (*Li et al. 2018*).



**Figure 8:** *Yersinia enterocolitica* (<https://www.healthjade.net/yersinia-enterocolitica-infection>).

### 4. Le devenir des bactéries fécales dans le milieu côtier

Dès leur arrivée dans le milieu marin côtier, les bactéries fécales disparaissent rapidement de la colonne d'eau (Fig. 9). La capacité des eaux marines à éliminer ces bactéries est le résultat de divers processus biotiques, hydrodynamiques et physiologiques.

- **Les processus hydrodynamiques :** selon les conditions hydrodynamiques rencontrées, les bactéries d'origine fécale vont être plus au moins diluées en arrivant dans les eaux littorales. Les mouvements liés aux apports des bassins versants entraînent la dispersion de ces bactéries. La dilution est moins importante lorsque le rejet a eu lieu dans une zone fermée, alors qu'elle est plus importante en zone ouverte exposée aux courants. Les bactéries attachées à des particules, vont sédimenter sur les fonds vaseux qui sont plus favorables à leur survie. Ils peuvent éventuellement être remis en suspension lors des marées, des opérations de dragage ou des tempêtes (*Pommepeuy et al. 2001*).

- **Les processus physiologiques et biotiques :** incluent la prédation par des protozoaires, la compétition avec les flores autochtones, la lyse bactérienne induite par des virus bactériophages,

la carence en nutriments et les variables physicochimiques comme la température de l'eau, la salinité, et la lumière solaire (Baudart et Paniel 2014).

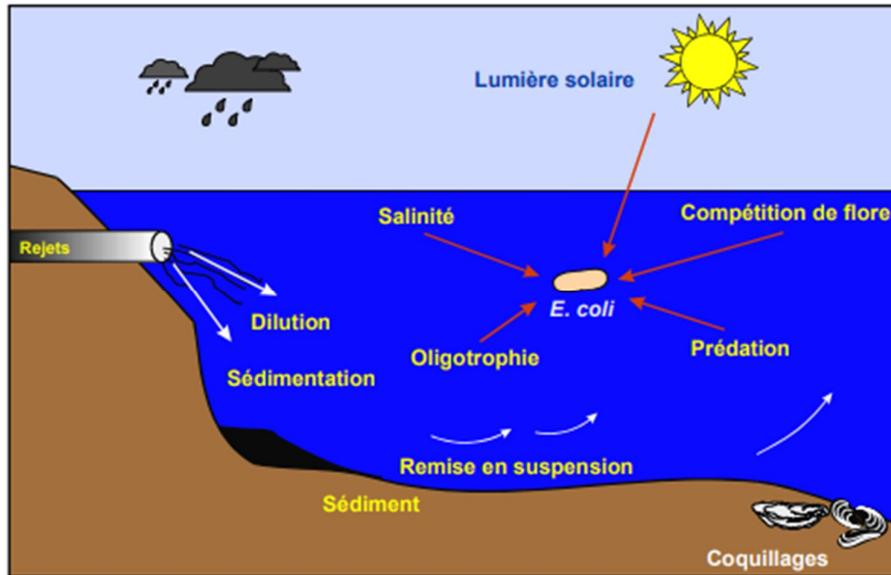


Figure 9 : Le devenir des bactéries entériques dans le milieu côtier (d'après Courtois 1993).

##### 5. Les méthodes de détection et d'identification des microorganismes

Le temps nécessaire à l'identification des microorganismes selon l'approche traditionnelle qui comprend la morphologie, la physiologie, et la caractérisation biochimique est estimé à au moins 2-5 jours, et jusqu'à une douzaine de jours dans le cas des moisissures. En outre, la plupart des méthodes phénotypiques utilisées dans les laboratoires de microbiologie nécessitent une main-d'œuvre et des équipements importants. Les méthodes phénotypiques ne permettent pas toujours d'identifier sans ambiguïté le microorganisme au niveau de l'espèce ou, plus souvent, au niveau de la souche (Bochner 2009).

Pour réduire le temps d'identification microbienne, on utilise des techniques de biologie moléculaire. Chaque méthode a ses avantages et ses inconvénients, et l'approche de recherche la plus récente implique l'utilisation d'une compilation de techniques multi-variées. Une telle mise en œuvre semble avoir un grand potentiel pour l'avenir.

Afin d'obtenir une bonne identification des microorganismes, il est extrêmement important de choisir les techniques appropriées, ainsi que d'avoir une compréhension approfondie des mécanismes de leur action.

## **5.1 Les méthodes phénotypiques**

En microbiologie, les méthodes d'identification traditionnelles reposent principalement sur des procédures de culture utilisant divers milieux de culture pour isoler, dénombrer, et identifier des microorganismes spécifiques.

Pendant de nombreuses années, ces méthodes ont été largement utilisées et le sont encore de nos jours, notamment dans certaines routines de laboratoire où une espèce bactérienne doit être identifiée rapidement. Bien qu'elles soient peu coûteuses et qu'elles permettent d'obtenir des informations quantitatives et qualitatives sur la diversité des microorganismes présents dans un échantillon, ces méthodes sont toutefois laborieuses et longues (préparation du milieu, dilution, ensemencement, incubation, comptage, isolement et caractérisation) (*Juste et al. 2008*), et les résultats ne sont observés qu'après plusieurs jours. En plus, de faux résultats sont souvent obtenus, surtout lorsqu'on considère des espèces microbiennes similaires (*Buszewski et al. 2017*).

Un autre problème associé aux méthodes basées sur la culture est le fait qu'elles ne peuvent pas identifier les cellules non cultivables.

### **5.1.1. Les tests présomptifs d'orientation**

Il s'agit de tests rapides et faciles à réaliser, comme la détermination de l'aspect des colonies observées dans divers milieux de culture, l'examen microscopique effectué après la coloration de Gram ou de Ziehl-Neelsen, la production des enzymes oxydase et catalase, la fermentation du glucose, la production de spores et la mobilité. Grâce à ces tests, il est généralement possible de placer l'agent pathogène, provisoirement, dans certains des principaux groupes bactériens. Par la suite, d'autres méthodes avec un plus grand pouvoir discriminatoire, peuvent être utilisées, pour être en mesure de discerner entre les microorganismes présentant un aspect très similaire dans les analyses macro et microscopiques.

### **5.1.2 Les techniques de microscopie**

Le microscope est un outil essentiel d'identification des microorganismes présents dans un échantillon naturel. Les images de microscopie permettent l'analyse de la forme, le suivi du mouvement et la classification des échantillons biologiques. L'observation au microscope est encore fréquemment appliquée pour déterminer les différences morphologiques de bactéries intéressantes, telles que les streptocoques, les staphylocoques, les bacilles (par exemple, *E. coli* ou *Salmonella spp.*), et les vibrions (*Rajwa et al. 2010*).

## ***I. Synthèse bibliographique***

Néanmoins, la microscopie seule n'est pas suffisante pour l'identification des microorganismes, et ce pour plusieurs raisons :

- ✓ Les petites cellules généralement présentes sont difficiles à identifier.
- ✓ Lors de l'observation d'échantillons naturels, ces cellules peuvent facilement passer inaperçues, en particulier si l'échantillon contient une grande quantité de particules ou un grand nombre de cellules plus grandes.
- ✓ Il est souvent difficile de différencier les cellules vivantes des cellules mortes ou des cellules des matériaux inanimés présents dans les échantillons naturels.

En outre, la principale limite liée à la microscopie est qu'aucune d'entre elles ne révèle la diversité phylogénétique des microorganismes présents dans l'habitat étudié (*Madigan et al. 2012*).

### **5.1.3 Les tests biochimiques**

Après l'isolement, on procède à l'identification au niveau du genre et de l'espèce, et pour laquelle on utilise fréquemment des tests biochimiques disponibles dans le commerce ; ces tests comprennent généralement des sucres pour détecter l'acidification (par oxydation ou fermentation) à l'aide d'un indicateur de pH.

D'autres tests peuvent cibler les enzymes impliquées dans le métabolisme des acides aminés (par exemple, les décarboxylases, la désaminase, la tryptophanase) ou les enzymes hydrolases, comme l'uréase et la  $\beta$ -galactosidase. L'inoculation et la lecture des tests biochimiques peuvent être réalisées manuellement à l'aide de kits commerciaux tels que les kits Analytical Profile Index (API système).

Ces tests sont de plus en plus automatisés, et il existe une variété d'instruments disponibles dans le commerce qui réalisent l'inoculation et la lecture automatisées de panels biochimiques, tels que l'instrument Vitek 2. Pour certaines espèces, ces systèmes automatisés peuvent permettre l'identification bactérienne en 6 à 12 heures (*Benkova et al 2020*).

## **5.2 Les méthodes de biologie moléculaire**

### **5.2.1 La réaction en chaîne par polymérase (PCR)**

L'invention de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) a marqué un tournant dans l'histoire des sciences biologiques et médicales. Les applications de la PCR ont non seulement complètement révolutionné la recherche dans le domaine de la génétique moléculaire et de la biotechnologie animale et végétale, mais la technique a également prouvé sa pertinence et son ingénieuse utilité dans d'autres domaines tels que les sciences médico-légales, la systématique

moléculaire, l'épidémiologie moléculaire, l'archéologie, l'anthropologie, la génétique évolutive, etc. La PCR classique a conduit à l'émergence de la RT-PCR, de la qPCR et de la combinaison RT-PCR/q-PCR. Les variantes de la PCR sont maintenant utilisées avec succès dans la plupart des progrès récents réalisés dans les sciences de l'ère moderne (*Singh et al. 2014*).

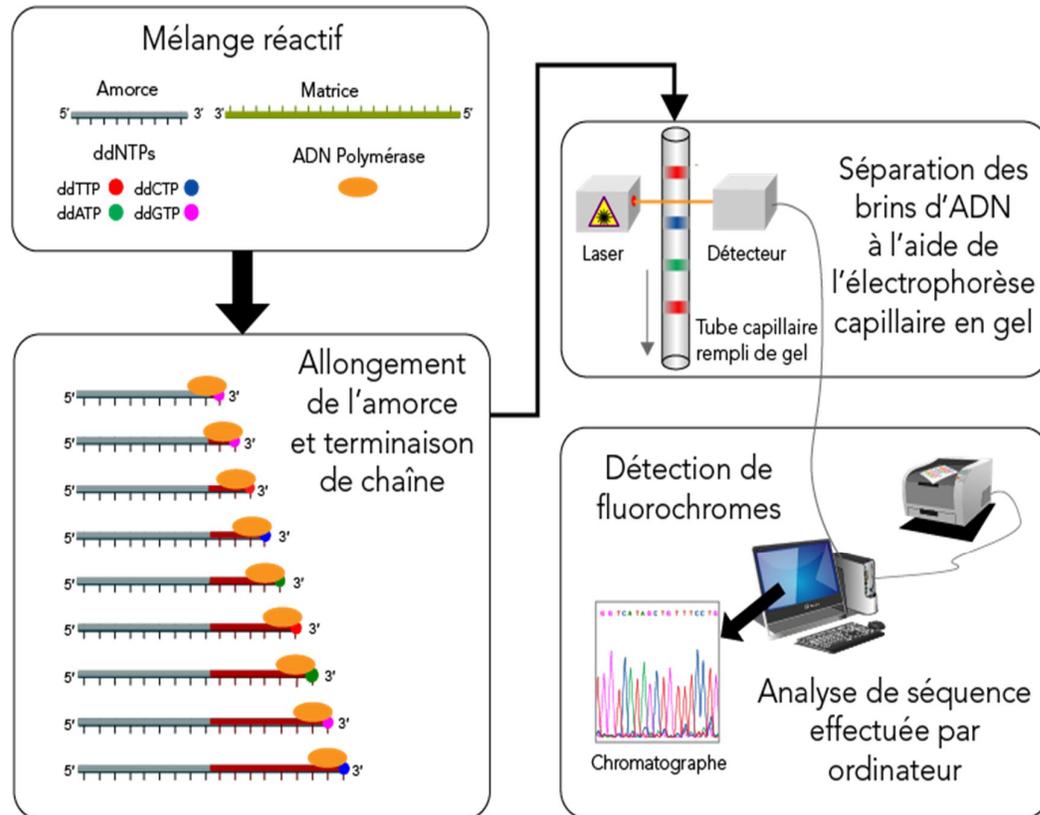
### 5.2.2 Les techniques de séquençage

- **Le séquençage par la méthode Sanger**

En 1975, Sanger a présenté sa méthode de séquençage de l'ADN. La clé de cette découverte est l'utilisation de gels de polyacrylamide pour séparer les produits de la synthèse initiée par l'ADN polymérase par ordre croissant de longueur de chaîne (*Hutchison 2007*).

Dans les réactions de séquençage, les amorces qui s'hybrident à une matrice d'ADN simple brin sont allongées par l'ADN (Taq) polymérase. Les désoxynucléotides sont introduits un par un, et l'amorce est allongée de manière dépendante de la matrice. Dans la même réaction, la Taq polymérase ajoute à l'ADN dénaturé des di-désoxynucléotides marquées par fluorescence qui mettent fin à la formation d'un nouveau brin d'ADN lorsqu'ils rencontrent leurs nucléotides complémentaires dans la séquence cible (*McCombie-Richard et al. 2019*). Il en résulte des brins d'ADN de longueurs variables, séparés sur un gel par électrophorèse et reflètent la séquence analysée.

Chaque capillaire est calibré séparément pour les colorants utilisés dans les réactions de séquençage afin que le logiciel puisse effectuer l'analyse multi-composants pour identifier chacun des fragments marqués par un colorant (Fig.10). Ces réactions de séquençage sont ensuite analysées à l'aide d'un logiciel spécial (*Zhang et al. 2014*).



**Figure 10** : Le séquençage de l'ADN à l'aide d'électrophorèse capillaire en gel (© 2020 Parlons sciences à partir d'une image d'Estevezj [CC BY-sa] via Wikimedia Commons).

- **Le séquençage à haut débit (Next-Generation Sequencing NGS)**

Les plateformes NGS effectuent un séquençage à haut débit, au cours duquel des millions de fragments d'ADN ou d'ARN d'un seul échantillon sont séquencés simultanément. Cette technique permet de séquencer un génome entier plus rapidement et à moindre coût que le séquençage Sanger utilisé auparavant, ce qui a révolutionné l'étude de la génomique et de la biologie moléculaire (*Tyagi et Bhide 2020*).

La création de plateformes NGS a rendu la technique de séquençage accessible à un plus grand nombre de laboratoires, augmentant ainsi le nombre d'investigations et de diagnostics effectués (*Grada et Weinbrecht 2013*). À l'heure actuelle, plusieurs approches prometteuses sont à divers stades de développement (*Pettersson et al. 2009 ; Reis-Filho 2009*).

- **Le typage par séquençage MLST (Multi Locus Sequence Typing)**

Le typage des séquences par le séquençage MLST a été récemment développé pour l'étude des relations clonales au sein des populations bactériennes ; il a été utilisé avec succès pour la

génétique des populations et l'analyse épidémiologique globale des germes pathogènes (*Bleidorn et Gerth 2018*). Cette méthode consiste à obtenir les séquences de fragments internes de sept gènes conservés pour chaque souche d'une espèce particulière (*Lemee et al. 2004*).

Les séquences de chaque fragment sont comparées à toutes les séquences précédemment identifiées (allèles) pour ce locus et, par conséquent, des numéros d'allèles sont attribués à chacun des sept loci (*Aanensen et Spratt 2005*). La combinaison des sept numéros d'allèles définit le profil allélique de la souche et chaque profil allélique différent est attribué comme un type de séquence, utilisé pour décrire la souche bactérienne (*Maiden et al. 1998 ; Bleidorn et Gerth 2018*).

### **5.2.3 L'analyse phylogénétique**

La phylogénie moléculaire est l'étude de la parenté évolutive entre divers groupes de microorganismes. Le but de cette analyse est de recueillir des informations sur la diversité biologique, les classifications génétiques, ainsi que de connaître les événements de développement qui se produisent au cours de l'évolution (*Patwardhan et al. 2014*). Même si nous ne connaissons jamais avec certitude la véritable phylogénie d'un organisme, l'analyse phylogénétique fournit les meilleures hypothèses, offrant ainsi un cadre aux différentes disciplines de la microbiologie.

La phylogénie moléculaire consiste à analyser la similarité entre des séquences biologiques (ADN et protéines). Les résultats sont représentés par un diagramme connu sous le nom d'arbre phylogénétique.

## **6. Les risques sanitaires et économiques associés aux eaux récréatives et à la conchyliculture**

Un grand nombre d'agents pathogènes bactériens, protozoaires et viraux sont responsables des maladies d'origine hydrique (*Rincé et al. 2018*) (Tab 1). Ces microorganismes présents dans les environnements côtiers proviennent principalement des fèces humaines ou animales. Ils peuvent être transportés de sources en amont vers les eaux côtières, notamment lors de fortes pluies, affectant ainsi les eaux récréatives et les zones conchylicoles.

La pratique d'activités aquatiques comme la baignade, la navigation de plaisance et autres sports nautiques dans des eaux contaminées par des matières fécales peut présenter un risque pour la santé humaine. Cependant, les excréments des baigneurs peuvent également être une source de microorganismes potentiellement pathogènes dans les eaux côtières (*Malham et al. 2014*).

Les mollusques bivalves sont des filtreurs qui peuvent accumuler de grandes quantités d'agents pathogènes provenant des eaux côtières contaminées par des matières fécales et peuvent

## I. Synthèse bibliographique

par conséquent présenter un risque pour la santé lorsqu'ils sont consommés crus ou légèrement cuits (Fouillet et al. 2020).

Outre le risque sanitaire, les contaminations microbiologiques de l'eau présentent également un impact économique car elles peuvent conduire au déclassement, voire à la fermeture de zones récréatives et donc avoir un impact plus ou moins important sur le tourisme. Elles peuvent aussi conduire au déclassement ou à la fermeture de zones de production conchylicole, entraînant des investissements coûteux pour décontaminer les coquillages (Kischel 2018).

**Tableau 1** : Les agents pathogènes microbiens associés aux maladies liées aux eaux récréatives ou aux mollusques et crustacés (d'après Malham et al. 2014).

<i>Agent pathogène</i>	<i>Incubation</i>	<i>Symptômes / maladie</i>	<i>Source de contamination de l'eau</i>
<b>Les bactéries</b>			
<i>Campylobacter spp</i>	2 à 4 jours	Crampes, douleurs abdominales, diarrhée, frissons et fièvre	Fèces d'animaux / lisier
<i>E. coli O157</i>	1 à 8 jours	Crampes et sensibilité abdominales et diarrhée sanglante, une insuffisance rénale et la mort	Fèces animales / lisier
<i>Salmonella typhi</i>	1 à 14 jours	Fièvre typhoïde : maux de tête, malaise, anorexie, provoquent parfois une septicémie	Fèces humaines / eaux usées
<i>Salmonella enterica</i>	6 à 72 heures	Diarrhée, fièvre et crampes abdominales	Fèces humaines / eaux usées ou excréments / lisier
<i>Vibrio vulnificus</i>	16 heures	Septicémie : malaise, frissons, fièvre, prostration, lésions cutanées, décès	Estuaires et eaux marines
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2 à 48 heures	Douleurs abdominales, diarrhée, nausées, vomissements, frissons, maux de tête	Estuaires et eaux marines

## I. Synthèse bibliographique

<i>Sérotypes de Vibrio cholerae O1 et O139</i>	1 à 5 jours	Diarrhée abondante et aqueuse, vomissements, douleurs abdominales, déshydratation	Fèces humaines / eaux usées
<i>Shigella spp</i>	1 à 3 jours	Douleurs abdominales, diarrhée, selles sanglantes et mucoïdes, fièvre	Fèces humaines / eaux usées

### Les protozoaires

<i>Cryptosporidium parvum</i>	7 à 10 jours	Diarrhée abondante et aqueuse, perte de poids, nausées ; fièvre légère	Fèces humaines / eaux usées
<i>Giardia duodenalis</i>	5 à 25 jours	Diarrhée, malabsorption et perte de poids	Fèces humaines / eaux usées

### Les virus

<i>Adénovirus</i>	~10 jours	Fièvre, symptômes des voies respiratoires supérieures et inférieures, conjonctivite, gastro-entérite, infection oculaire	Eaux usées
<i>Norovirus</i>	24 à 48 heures	Diarrhée, nausées, vomissements, douleurs abdominales, crampes abdominales	Eaux usées
<i>Hépatite A</i>	15 à 50 jours	Fièvre, malaise, lassitude, anorexie, nausées, douleurs abdominales, jaunisse,	Eaux usées
<i>Échovirus</i>	2 à 4 jours	Gastro-entérite, encéphalite, méningite	Eaux usées
<i>Virus Coxackie</i>	2 à 12 jours	Méningite, pharyngite, conjonctivite, encéphalite	

## 7. La réglementation sanitaire en zone littorale

### 7.1. La réglementation concernant les eaux de baignade (normes algériennes)

Le contrôle sanitaire des eaux de baignade est actuellement défini par la directive algérienne n° 93-164 du 10/07/1993 JORA n° 46 (*JORA 1993*) basée sur la détection des indicateurs de

## I. Synthèse bibliographique

contamination fécale à savoir : les coliformes totaux (CT), les *E.coli* (EC) et les streptocoques fécaux (SF).

Le décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993 ayant pour objet de définir la qualité requise des eaux de baignade et précisément en son troisième article, définit que la qualité des eaux de baignade doit satisfaire aux paramètres microbiologiques indiqués à l'annexe du même décret et qui sont reportés dans le tableau 2.

Les concentrations inférieures ou égales aux valeurs guides indiquent une eau de bonne qualité, et celles comprises entre les valeurs guides et les valeurs impératives sont de qualité acceptable et doivent faire l'objet d'une surveillance continue. Au-delà de ces concentrations, les eaux sont considérées de mauvaise qualité.

**Tableau 2** : La qualité requise des eaux de baignades (paramètres microbiologiques) (J.O. N°46 – Décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993) (*JORA 1993*).

	<i>Norme guide (a)</i>	<i>Norme impérative (b)</i>
<i>Coliformes totaux</i>	500 /100 ml	10000 /100 ml
<i>E. coli</i>	100 /100 ml	2000 /100 ml
<i>Streptocoques fécaux</i>	100 /100 ml	

### 7.2. La réglementation concernant les zones conchyliques (normes européennes)

Les zones conchyliques (zones d'élevage et de pêche professionnelle) sont classées selon le règlement no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 et l'arrêté du 21 mai 1999 relatif au classement sanitaire des zones de production conchylicole.

Ces textes établis sur la base d'analyses des coquillages présents dans ces zones, introduisent le classement des zones conchyliques en fonction du dénombrement de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli* selon 4 classes dans le but de limiter les risques sanitaires liés à la consommation de coquillages et de déterminer les contraintes de distribution liées à ces classements (Tab 3).

## I. Synthèse bibliographique

**Tableau 3** : Les exigences réglementaires microbiologiques issues du classement des zones conchylicoles (Règlement (CE) n° 854/2004 et arrêté du 06/11/2013) fixant les conditions sanitaires de transfert et de traçabilité des coquillages vivants.

<i>E.coli / 100g de chair et de liquide intervalvaire</i>	<i>Zones</i>	<i>Exploitation</i>	<i>Exploitation</i>
<b>Seuils microbiologiques</b>	Classement	Elevage	Pêche professionnelle, gisement naturel
<i>Au moins 90% des résultats &lt;230 E.C. Aucun &gt;1000 E.C.</i>	A	Autorisé pour une consommation directe	Autorisé pour une consommation directe
<i>Au moins 90% des résultats &lt;4600 E.C. Aucun &gt;4600 E.C.</i>	B	Autorisé à être consommé après reparcage ou purification.	Autorisé mais après reparcage ou purification nécessaire avant commercialisation
<i>Au moins 90% des résultats &lt;46000 E.C. Aucun &gt;46000 E.C.</i>	C	Autorisé à la consommation après reparcage (sur une longue période) ou après purification intensive.	Autorisé à la consommation après reparcage (sur une longue période) ou après purification intensive
<i>Au moins 90% des résultats &gt;46000 E.C.</i>	D	Impossible de récolter des coquillages pour la consommation humaine.	Impossible de récolter des coquillages pour la consommation humaine.

## CHAPITRE 2 : GÉNÉRALITÉS SUR LES MOLLUSQUES BIVALVES

### 1. Les caractères généraux

Le phylum des mollusques (latin : mollusca nux, noix à coquille molle), qui compte plus de 200 000 espèces vivantes, est le deuxième plus grand groupe d'invertébrés. La plus grande partie des mollusques de la classe des Bivalvia se trouve dans les environnements marins et d'eau douce (*Moreira et al. 2018*), et comprend les palourdes, les huîtres, les moules, les coquilles Saint-Jacques et de nombreuses autres familles de coquillages (Fig. 11).

Les bivalves ou lamellibranches (~ 15000 espèces) possèdent une coquille externe à deux valves unies par un ligament adducteur (conchylien) et des branchies en forme de lamelles. Le corps est comprimé latéralement et enveloppé dans le manteau qui est marginalement attaché à la coquille par des faisceaux de muscles (*Kerdoussi 2018*).

Les bivalves ne sont pas très mobiles et sont même fixes. Certains habitent des substrats durs comme les rochers sur lesquels ils se fixent.

Ils sont extraordinairement bien adaptés aux conditions environnementales défavorables comme les températures élevées et basses, les changements de salinité et même la pollution (*Plazzi et Passamonti 2010*).

### 2. La valeur nutritionnelle des bivalves mollusques

Les bivalves, en tant que composants alimentaires, sont généralement des aliments faciles à digérer, sans additifs et peu transformés. Ces caractéristiques font d'eux un produit qui répond presque entièrement aux exigences des consommateurs (*Oliveira et al. 2011*). Ces animaux ont également une teneur en protéines animales de haute qualité, similaire à celle du lait et des œufs, ce qui en fait un aliment nutritif et un composant important du régime alimentaire humain dans le

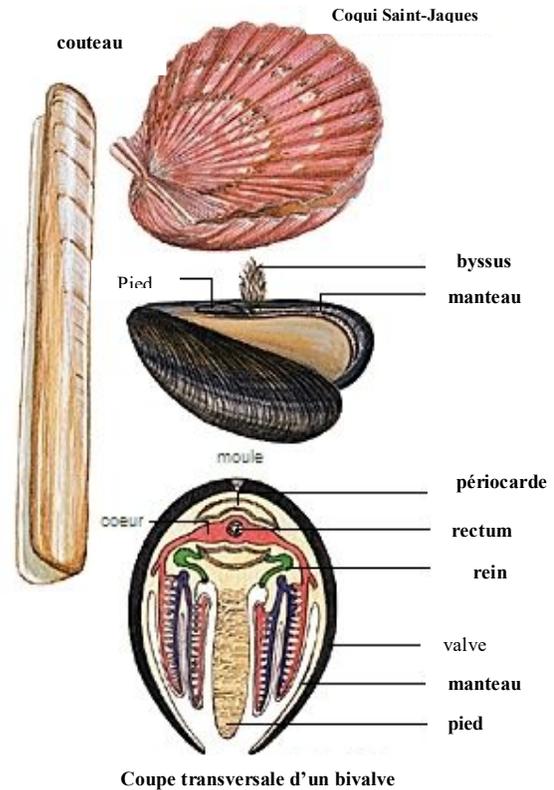


Figure 11 : Les différentes espèces de bivalves (<https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Bivalves>).

monde entier (*Murchie et al. 2005*). Ceci est particulièrement pertinent dans les pays en développement où les produits aquatiques sont souvent la seule source de protéines animales (*Fauconneau 2002*).

### **3. Les bivalves comme indicateurs des perturbations environnementales**

Grâce à leur capacité à filtrer de grands volumes d'eau, à retenir et à concentrer les microorganismes dans leurs tissus, les bivalves sont considérés comme les meilleurs indicateurs biologiques de la qualité des milieux marins (*Chaffai 2014*). Ils sont largement utilisés dans le monde pour contrôler et surveiller la pollution des milieux aquatiques, ce qui permet de gagner du temps, de la main d'œuvre et de l'argent, par rapport aux méthodes d'analyse de l'eau (*Palos Ladeiro et al. 2014*).

Les bivalves peuvent accumuler plusieurs agents pathogènes d'origine anthropique et/ou zoonotique. Ceux qui suscitent le plus d'inquiétude sont les virus et les bactéries pathogènes, mais aussi les parasites protozoaires. La détection de ces pathogènes fournit une bonne indication de la pollution biologique des écosystèmes marins, et identifie ainsi les risques éventuels pour la santé humaine (*Ghozzi et al. 2017*).

### **4. La contamination microbiologique des bivalves**

La consommation de fruits de mer a augmenté au cours de la dernière décennie. On estime que 2,9 milliards de personnes dans le monde consomment quotidiennement des fruits de mer, notamment des mollusques bivalves (*Gyawali et Joanne 2020*). Pour répondre à la demande des consommateurs, la production commerciale mondiale de bivalves est passée de 1,18 à 13,5 millions de tonnes par an entre 1970 et 2015 (*FAO 2016*).

Les eaux des environnements côtiers constituent un habitat approprié pour les bivalves et sont largement utilisées pour l'élevage commercial de ces organismes sentinelles. Cependant, ces eaux peuvent être contaminées par des matières fécales humaines provenant d'une évacuation incontrôlée des eaux usées, d'une défaillance ou d'une dérivation du système d'égouts lors d'un débit d'eau élevé, de déchets fécaux humains provenant de rejets de navires (*Devane et al. 2018*).

La consommation des bivalves contaminés par des pathogènes infectieux peut entraîner des maladies et/ou des épidémies chez l'homme (Tab 1). Les épidémies de bivalves attribuées à des bactéries peuvent être généralement classées en deux catégories : celles associées à une contamination fécale et celles associées à des bactéries pathogènes allochtones telles que *Vibrio*

## ***I. Synthèse bibliographique***

*spp.* La famille Vibrionaceae, en particulier *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *Vibrio cholerae* sont responsables de la majorité des épidémies d'origine bactérienne (**Rincé et al. 2018**).

Parmi les agents pathogènes fécaux, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli* entéro-toxinogène, *Salmonella spp* sont généralement à l'origine de la majorité des maladies infectieuses. Ces bactéries sont les principales causes des gastro-entérites bactériennes dans de nombreux pays. Avec les norovirus et le virus de l'hépatite A, elles représentent plus de 70% des maladies et hospitalisations associées à des agents pathogènes d'origine alimentaire en France (**Van Cauteran et al. 2017**).

Avec plus de 229 000 cas humains par an, la campylobactériose est la maladie d'origine alimentaire la plus fréquemment signalée en Europe, principalement due à *Campylobacter jejuni*, suivi de loin par *C. coli* et *C. lari* (**Rincé et al. 2018**). Ces bactéries sont respectivement présentes chez les volailles et les bovins, chez les volailles et les porcs, et chez les goélands et les oiseaux de rivage (**Pitkanen and Hanninen 2017**).

En ce qui concerne les parasites, *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium spp*, *Toxoplasma gondii* et *Cyclospora cayetanensis*, ont été détectés dans les bivalves dans les lagunes et autres environnements marins (**Robertson 2007**). En Méditerranée, plusieurs bivalves comestibles et non comestibles étaient porteurs d'agents pathogènes protozoaires, seuls et/ou en association. Il s'agit notamment de *Cryptosporidium spp* détectés en Espagne, en Italie et au Portugal (**Gianguaspero et al. 2014**).

Outre des parasites et des agents pathogènes bactériens humains, des virus entériques comme le norovirus humain (HuNoV) ont également été détectés dans des bivalves contaminés. Ces virus sont les pathogènes les plus infectieux car ils sont la principale cause de gastro-entérites dans le monde (**Atmar et al. 2014 ; Rincé et al. 2018**).

### **5. La répartition des bivalves en Méditerranée et en Algérie**

Les bivalves sont présents dans plusieurs pays méditerranéens comme l'Espagne, la France, l'Italie, la Tunisie et l'Algérie. Sur un total d'environ 10 000 espèces vivant dans le monde, environ 400 espèces de bivalves sont signalées en Méditerranée, dont 103 présentent un réel intérêt économique (**Kaddouri 2016**).

Sur la côte algérienne, la moule brune *Perna perna* et la moule bleue *Mytilus galloprovincialis* sont largement distribuées. Ces espèces sont utilisées comme bio-indicateurs de la pollution côtière, notamment de la pollution bactériologique et celle des métaux lourds (**Belabed et al. 2013 ; Boudjema et al. 2014 ; Kadri et al. 2017 ; Drif et al. 2019 ; Abderrahmani et al. 2020**).

## **6. Présentation du matériel biologique utilisé dans le cadre de cette étude**

### **6.1 La moule du genre *Perna***

Les moules du genre *Perna* sont des membres famille des *Mytilidae* (Mollusca ; Bivalvia ; Lamellibranchia ; Mytiloida ; *Mytilidae*). Elles sont couramment utilisées comme bio-indicateurs dans les études de surveillance du milieu marin (**Kadri et al. 2017**), et elles sont également reconnues comme une source précieuse de nourriture humaine.

Selon Siddall (**1980**), ce genre comprend trois espèces reconnues : la moule verte *P. viridis* (Linnaeus, 1758), la moule brune *P. perna* (Linnaeus, 1758) et la moule à lèvres vertes *P. canaliculus* (Gmelin, 1791). On les trouve dans les eaux du sud de l'Inde, de l'Amérique du Nord, de la côte atlantique de l'Amérique du Sud (Brésil, Venezuela et Uruguay), du Sri Lanka et du sud de l'Europe (**Vakily 1989 ; de Oliveira et al. 2017**). Elles sont également présentes le long des deux côtes du continent africain, y compris à Madagascar, et dans le sud de la Méditerranée (**Siddall 1980**).

Pendant longtemps, la grande distribution et les variations morphologiques de ces espèces ont produit une histoire taxonomique confuse au sein du genre *Perna* (**Siddall 1980; Gardner et al. 2016**). De nombreuses études ont par exemple rapporté que la moule *P. picta*, que l'on trouve généralement le long de la côte atlantique de l'Afrique du Nord, est synonyme de la moule brune *P. perna*, alors que, dans le sud de l'Inde et au Sri Lanka, le synonyme utilisé pour cette espèce est *P. indica* (**Silva et al. 2018**). En outre, les moules bleues du genre *Mytilus* ont également été confondues avec le genre *Perna* (**Vakily 1989**).

### **6.2 La moule de l'espèce *Perna perna***

La moule africaine *Perna perna* est un mollusque bivalve appartenant à la famille des *Mytilidae*. La coquille de cette espèce est oblongue, trigone et solide, et son sommet antérieur est pointu. Elle est reconnue par sa couleur brune (d'où le nom de moule brune) (Fig. 12), et sa meilleure caractéristique d'identification est une cicatrice interne divisée du muscle rétracteur postérieur (Fig. 12). La coquille de *P. perna* est mince sur les bords et s'épaissit postérieurement (**Kadri 2015**).

En mer Méditerranée, la moule atteint une taille maximale de 90 mm dans les zones intertidales, et une taille maximale de 120 mm dans les zones sub-littorales. L'intérieur de la coquille est de couleur blanche nacré plus ou moins violacée (**Kerdoussi 2018**). Le muscle rétracteur postérieur du byssus a une empreinte plus visible que celle du muscle adducteur

## I. Synthèse bibliographique

postérieur. La couleur du manteau permet de distinguer les deux sexes : blanchâtre chez les mâles et rose saumon à orange chez les femelles (Fig. 12).

Les moules *P. perna* sont caractérisées par une forte tolérance vis-à-vis des conditions du milieu ; ainsi elles supportent des températures de 13°C en hiver, et entre 27 et 28°C en été (*Kerdoussi 2018*).



**Figure 12 :** La moule *Perna perna*. a. Morphologie de la coquille externe, b. Morphologie de la coquille interne.

### 6.2.1 Répartition géographique

La répartition géographique de *P. perna* est très vaste, elle est largement répandue dans les régions tropicales et subtropicales des océans Atlantique et Indien ainsi qu'en Méditerranée (fig.13).

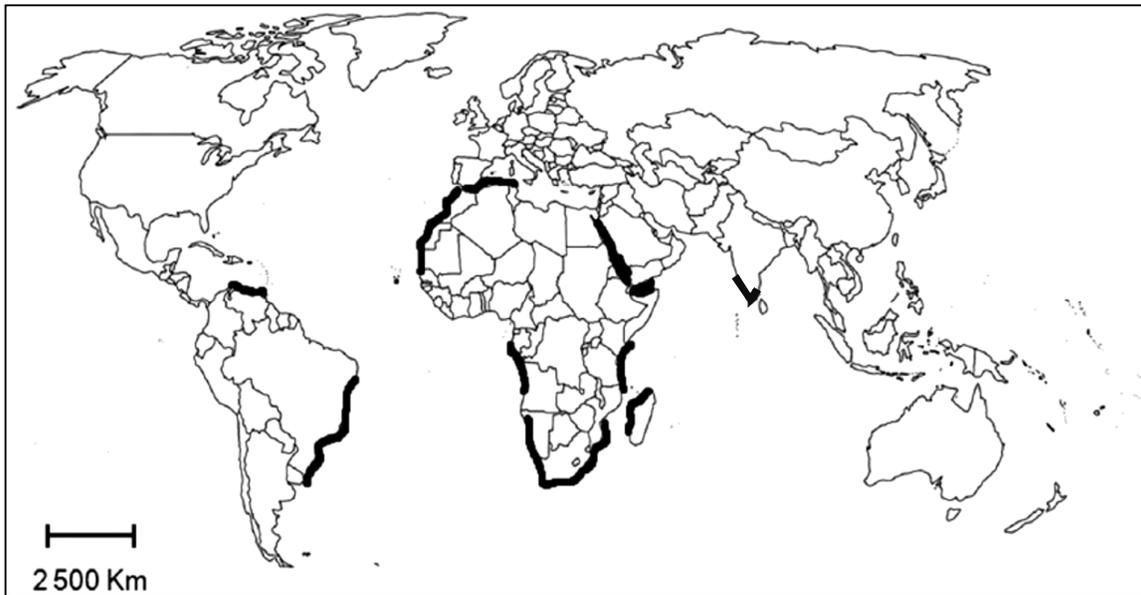
Elle se trouve le long de Madagascar, de la côte Est de l'Afrique (du centre de la fausse baie du Mozambique), de la côte Ouest de l'Afrique (de la baie de Luderiz au Nord de la Méditerranée) et du détroit de Gibraltar (côté africain) au Golfe de Tunis (*Gardner et al. 2016*). Elle est également présente au Sri Lanka, dans le Sud de l'Inde et sur la côte atlantique de l'Amérique du Sud, où elle se trouve communément sur les rivages rocheux du Golfe du Mexique. Au Venezuela, son aire de répartition s'étend sur la côte Nord de la péninsule de Paria et Araya, et on la trouve également dans les îles Margarita au Brésil (*Kerdoussi 2018*).

En Algérie Elle vit en cohabitation avec la moule bleue *Mytilus galloprovincialis* (*Abada-Boudjema et Dauvin 1995*).

Les premiers travaux signalés sur la biologie et la dynamique des populations naturelles de ces deux espèces sur la côte Algérienne datent du début des années 1980 (*Abada-Boudjema et*

## I. Synthèse bibliographique

*Moueza 1981 ; Abada-Boudjema et al. 1984*). Ces travaux ont été menés simultanément sur les deux espèces en raison de leur coexistence constatée beaucoup plus tôt par Pallary (1921) sur le littoral Algérien et par Zaouali (1973) sur le littoral Tunisien.



**Figure 13** : La répartition géographique de la moule *Perna perna* (d'après *Gardner et al. 2016*).

### 6.2.2 Position systématique

- Embranchement : Mollusques
- Classe : Bivalves
- Sous-classe : Ptériomorphia (Beurlen, 1944)
- Ordre : Mytiloida (Ferussac, 1822)
- Famille : *Mytilidae* (Rafinesque, 1815)
- Genre : *Perna* (Philipsson, 1788)
- Espèce : *Perna perna* (Linnaeus, 1758).

## CHAPITRE 3 : GÉNÉRALITÉS SUR LES SÉDIMENTS

### 1. Définition

Le terme sédiment désigne les dépôts marins ou continentaux constitués de particules fines (limons, argiles) à grossières (sables) provenant de la désagrégation ou de l'altération de roches et de la précipitation de matières en suspension qui passent dans la colonne d'eau (*Lesven 2008*). Ces particules organiques ou minérales sont ensuite transportées dans l'eau et finissent par se déposer ou par précipiter dans un milieu propice à leur sédimentation (*Coulon 2014*).

Le sédiment est principalement composé d'une fraction solide constituée d'eau, de substances organiques comme les colloïdes humiques, de débris végétaux et animaux et de microorganismes, ainsi que de particules minérales comme les hydroxydes métalliques, le quartz, les carbonates, les argiles, et les oxydes (Fig. 14) (*Mechaymech 2002*).

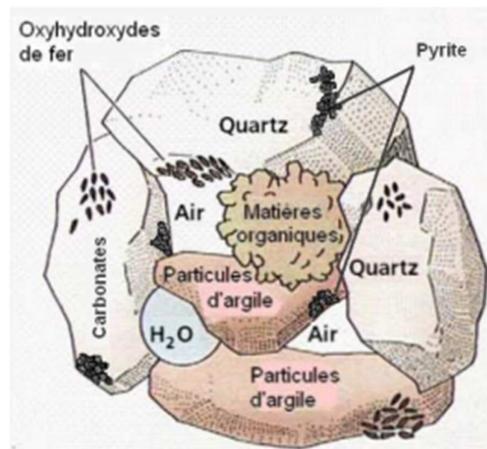


Figure 14 : Les différentes fractions constitutives d'un sédiment (d'après *Rusch 2010*)

### 2. L'importance écologique des sédiments

Les sédiments constituent un milieu de fixation et d'accumulation de micropolluants à long terme, et leur analyse est une étape importante dans la détermination du degré de la pollution dans les régions côtières.

Les concentrations des micropolluants dans les sédiments sont généralement plus élevées que dans la colonne d'eau. Ainsi, il a été montré qu'il pouvait y avoir 10 à 1000 fois plus de bactéries dans les sédiments que dans l'eau surnageante (*Le Guyader 1989*). Cela permet, sur un premier

plan, de délimiter les zones de contamination et d'en évaluer l'intensité et, sur un second plan, de déterminer et de localiser les foyers des différentes pollutions.

### **3. La contamination bactériologique des sédiments**

La qualité bactériologique des sédiments n'est pas soumise à une réglementation en Algérie. Cependant, la présence de bactéries pathogènes au niveau des sédiments superficiels peut avoir des conséquences sur la qualité des eaux de baignade ou conchylicoles à proximité par la remise en suspension de ces sédiments dans la colonne d'eau.

Les sédiments marins constituent un réservoir de bactéries d'origine fécale (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia* et *Enterococcus*), y compris des souches pathogènes et virulentes (*Luna et al. 2010*). Par exemple, dans les environnements hautement contaminés, l'abondance de *Salmonella spp* peut atteindre des valeurs supérieures à  $10^5$  de cellules par gramme de sédiment (*Nagvenkar et Ramaiah, 2009*).

La présence de ces bactéries fécales pose de sérieux problèmes sur la qualité de l'environnement et la santé humaine, surtout lorsque les sédiments subissent une remise en suspension, naturelle (lors de tempêtes, de phénomènes de marées, de fortes pluies), ou anthropique (lors d'opérations de dragage) qui peut exacerber leur transport vers les zones marines adjacentes (*Luna et al. 2012*).

### **4. Le devenir des bactéries entériques dans les sédiments**

La remise en suspension des bactéries liées aux sédiments peut, dans des conditions favorables, augmenter les niveaux de contamination bactérienne dans la colonne d'eau. La clarté de l'eau contrôle la pénétration de la lumière et, par conséquent, l'inactivation bactérienne due aux dommages directs causés à l'ADN par le rayonnement ultraviolet. Ainsi, les conditions environnementales dans la colonne d'eau et dans la couche des sédiments influencent les processus clés (tels que la sédimentation) qui déterminent le devenir des bactéries indicatrices dans la région littorale (Fig. 15) (*Thupaki et al. 2013*).

La sédimentation des bactéries fixées aux particules en suspension représente un mécanisme d'élimination temporaire de la colonne d'eau. Le sédiment, avec sa forte concentration en nutriments, son faible ensoleillement et l'absence relative de prédateurs, constitue un environnement favorable à la survie et à la croissance potentielle des bactéries (*Desmarais et al. 2002*).

## I. Synthèse bibliographique

La remise en suspension des sédiments permet d'introduire des bactéries et des sédiments profonds dans la colonne d'eau (*Eadie et al. 1997*). Ce phénomène naturel est généralement à l'origine d'une re-distribution importante des bactéries indicatrices d'origine fécale dans les eaux marines et douces (*Phillips et al. 2011 ; Ge et al. 2012*).

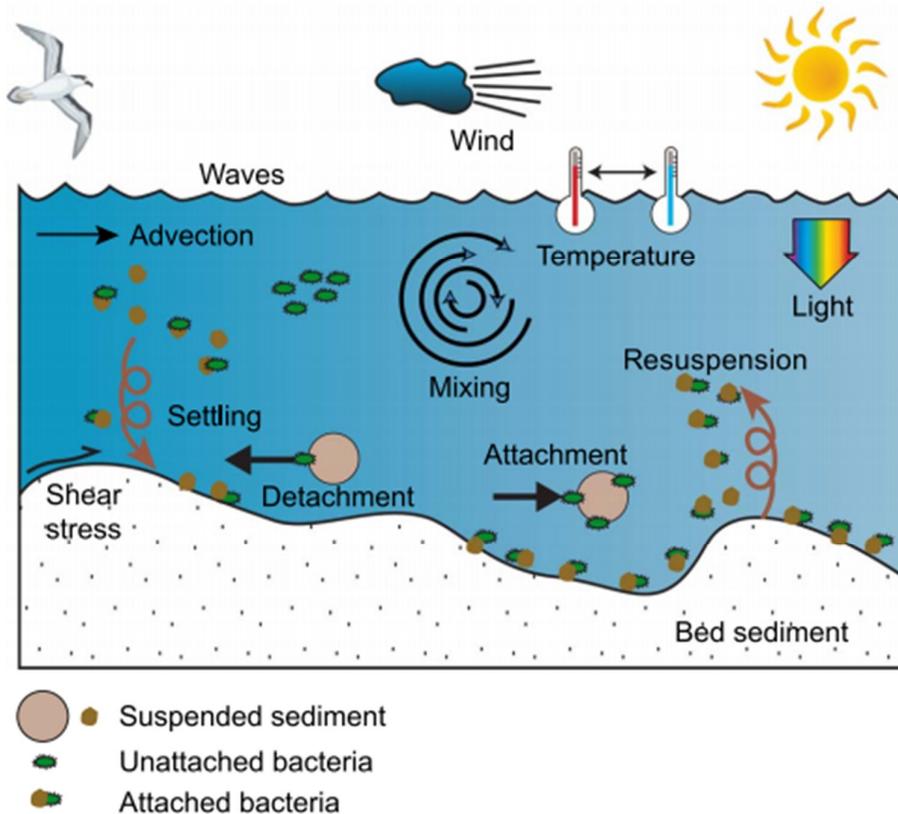


Figure 15 : Le devenir des bactéries dans les sédiments (d'après *Thupaki et al. 2013*).

### 5. L'abondance et la répartition des bactéries et des virus d'origine fécale dans les sédiments

Pour déterminer efficacement le risque sur la santé humaine associé aux sédiments côtiers, il est important de quantifier le nombre d'agents pathogènes. L'abondance des bactéries fécales comme *Escherichia coli* et *Enterococcus spp* a été bien étudiée ; cependant, une attention supplémentaire est nécessaire pour les agents pathogènes tels que *Campylobacter spp*, *Salmonella spp*, *E. coli O157 : H7* et les norovirus, responsables des différentes maladies (*Hassard et al. 2016 ; Malham et al. 2014*).

## ***I. Synthèse bibliographique***

Le nombre de bactéries associées aux matières fécales dans l'environnement côtier et estuarien est généralement compris entre 0 et  $10^4$  UFC (unités formant colonie) par 100 ml d'eau, et  $10^1$  à  $10^6$  UFC par 100 g de poids humide de sédiments. Anderson et al. (2005) ont constaté que les sédiments présentaient une plus grande variabilité spatiale de l'abondance bactérienne que l'eau et que les populations d'organismes entériques peuvent persister dans l'environnement.

De nombreuses études ont rapporté une diminution du nombre de bactéries et de virus avec la profondeur des sédiments (Filippini et Middelboe 2007 ; Berthe et al. 2008). Des recherches récentes ont montré une réduction de deux log des *E. coli* cultivables de la surface des sédiments (1 cm supérieur) à 4 cm de profondeur (Pachepsky et Shelton 2011). En règle générale, les 2 premiers cm de sédiment sont considérés comme ayant une abondance élevée en bactéries fécales, tandis qu'en dessous de 2 cm, l'abondance est significativement plus faible (Drummond et al. 2014a, Fiskal et al. 2021).

### **6. L'adsorption bactérienne dans les sédiments**

Les coliformes fécaux comme *E. coli* se fixent principalement aux petites particules ( $<2 \mu\text{m}$ ), facilitant ainsi leur transport et leur dispersion dans l'environnement (Goldscheider et al. 2010).

Les bactéries d'origine fécale sont plus fréquemment associées à des sédiments et à des particules plus fines qu'à une suspension libre dans la colonne d'eau (Ferguson et al. 1996). L'association des particules est importante pour les processus de transport : les cellules attachées à des particules plus grosses se déposent sur le lit du cours d'eau, tandis que les cellules non attachées, ou celles attachées à de petites particules flottantes, sont susceptibles d'être transportées plus loin, en particulier pendant les tempêtes (Jamieson et al. 2005).

Des recherches antérieures ont défini les sédiments côtiers ou estuariens comme des puits de bactéries d'origine fécale (Deloffre et al. 2005 ; Berthe et al. 2008 ; Perkins et al. 2014). Le réentraînement ultérieur des sédiments pendant les tempêtes, l'utilisation de l'eau à des fins récréatives, les perturbations mécaniques et la remise en suspension des marées sur les vasières peuvent donc entraîner une détérioration de la qualité microbiologique de l'eau (Crabill et al. 1999).

### **7. Le rôle des sédiments dans la survie des bactéries entériques**

Les sédiments marins jouent un rôle clé dans le devenir des bactéries entériques contaminants importants des eaux côtières. Les sédiments peuvent favoriser la persistance des bactériens entériques en les protégeant des rayons ultraviolets, des fluctuations de température et de la prédation par les microorganismes de la colonne d'eau sus-jacente, mais aussi en leur fournissant

## *I. Synthèse bibliographique*

des nutriments assimilables (*Zimmer-Faust et al. 2017 ; Mika et al. 2009 ; Wanjugi et al. 2016*). Dans des conditions sédimentaires favorables, les bactéries indicatrices fécales présentent une survie prolongée, ce qui peut conduire à des indications faussement positives de pollution fécale récente dans la surveillance de la qualité de l'eau (*Garzio-Hadzick et al. 2010 ; Byappanahalli et al. 2012*).

Plus le séjour des bactéries dans l'eau est court, meilleure est leur survie, la population de streptocoques fécaux et de coliformes fécaux dans les sédiments est plus élevée lorsque le rejet se fait le plus souvent dans les sédiments que dans l'eau.

## ***II. MATÉRIEL ET MÉTHODES***

---

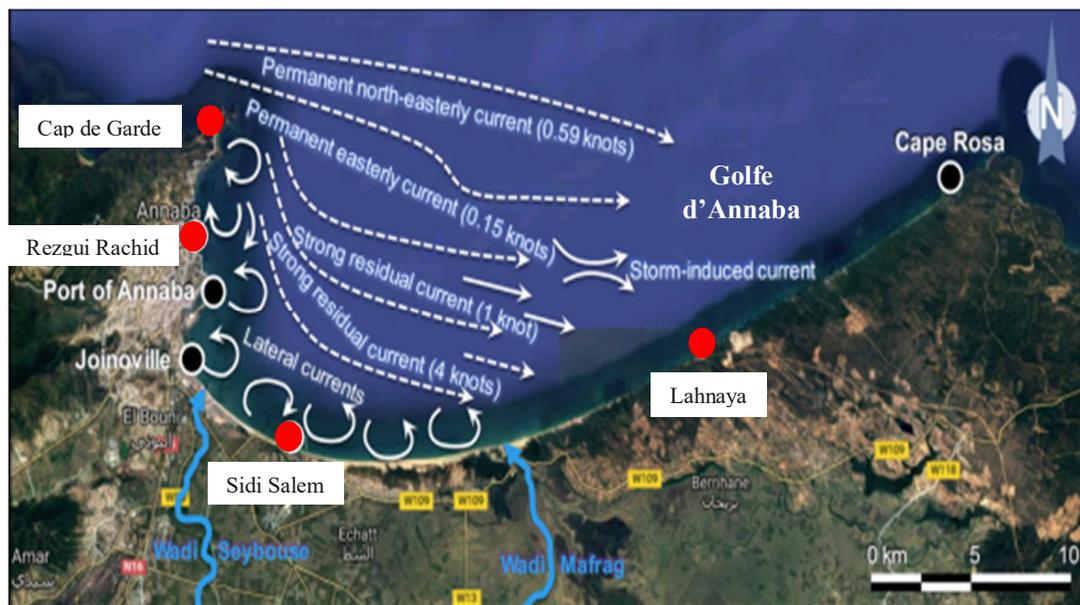
## 1. DESCRIPTION DES SITES D'ÉTUDE ET DES STRATÉGIES D'ÉCHANTILLONNAGE

### 1.1 Description du Golfe d'Annaba

Le Golfe d'Annaba est situé à l'extrême Nord-Est de l'Algérie entre deux Caps distants d'environ 40 km l'un de l'autre, le Cap de Garde à l'Ouest ( $7^{\circ}16'E - 36^{\circ}68'N$ ) et le Cap Rosa à l'Est ( $8^{\circ}15'E - 36^{\circ}38'N$ ) (Fig. 16).

Il a une profondeur maximale de 65 m et reçoit la plupart des apports d'eaux douces de deux principaux Oueds : Oued Seybouse, deuxième plus long fleuve d'Algérie avec un bassin versant d'environ 6470 km<sup>2</sup> et Oued Bedjima (*Ouali et al. 2018*). Ces deux Oueds reçoivent les rejets directs des effluents urbains, agricoles et industriels de plusieurs usines installées sur la côte, en particulier les fertilisants et les produits phytosanitaires de l'usine de fabrication d'engrais (FERTIAL). Ils drainent aussi les eaux de refroidissement, ainsi que les rejets domestiques des agglomérations sous forme d'eaux usées non traitées vers la mer (*Abdenmour et al. 2000*).

Le Golfe d'Annaba a un climat méditerranéen typique (chaud-tempéré) avec une température annuelle moyenne de 18,4°C et des précipitations annuelles allant de 650 à 1000 mm, principalement distribuées en hiver (60-70% des précipitations totales). Les étés sont assez chauds et secs, tandis que les hivers sont généralement froids et humides (*Belabed et al. 2013*).



**Figure 16** : Localisation géographique du Golfe d'Annaba et des différents sites de prélèvements. S1 : Cap de Garde, S2 : Rezgui Rachid, S3 : Sidi Salem, S4 : Lahnaya (*Ouali et al. 2018*).

1.2 Description des sites d'échantillonnage

Les quatre sites retenus dans le cadre de cette étude (Fig. 16) ont été stratégiquement choisis en fonction : de leur proximité des différentes sources de pollution, leur accessibilité, ainsi que la présence permanente du matériel biologique (les moules). Les caractéristiques de ces quatre sites d'échantillonnage sont représentées dans le tableau suivant 4 :

**Tableau 4** : Les caractéristiques des sites d'échantillonnage dans le Golfe d'Annaba.

<i>Position des sites de prélèvements</i>	<i>Localisation dans le Golfe</i>	<i>Caractéristiques</i>	<i>Vue générale des sites de prélèvement</i>
<b>Cap de Garde (S1)</b> (36°96'N, 7°79'E)	Extrême Nord-Ouest du Golfe à environ 9,8 km du centre-ville	Très fréquenté en saison estivale par les baigneurs et les pêcheurs	
<b>Rezgui Rachid (S2)</b> (36°91'N, 7°76'E)	Zone urbaine d'une longueur d'environ 700m	Reçoit les rejets domestiques de la zone centre Ouest de la ville charriés par plusieurs égouts sans traitement préalable	
<b>Sidi Salem (S3)</b> (36°86'N, 7°76'E)	Coté Est de la ville à proximité de l'embouchure de Oued Seybouse	Reçoit les déchets agricoles, industriels et les rejets d'eaux usées non traitées d'une de la ville d'Annaba et de sa périphérie déversés directement dans la mer via Oued Bedjima.	
<b>Lahnaya (S4)</b> (36°93'N, 8°20'E)	Zone rurale à 45 km de la ville d'Annaba (à El Kala)	Forte présence de baigneurs et de pêcheurs en été. Présence d'animaux	

### 1.3 Stratégies et méthodes de d'échantillonnage

#### 1.3.1 Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage est effectué à fréquence mensuelle afin de disposer d'un maximum de données. Chaque mois, la date du prélèvement est choisie aléatoirement en fonction des conditions d'échantillonnage (ex : météo, niveau de l'eau, circonstances inhabituelles). La collecte des échantillons, et leurs analyses physico-chimiques et bactériologiques ont été réalisées dans la période s'étalant de Janvier à Décembre 2018.

#### 1.3.2 Mesures des variables physico-chimiques

- **Mesures *in situ***

L'évaluation de la qualité des eaux marines repose sur la mesure des variables physico-chimiques ainsi que sur la présence ou l'absence d'organismes et de microorganismes indicateurs de la qualité des eaux. Une mesure des variables physico-chimiques *in situ* permet d'estimer les conditions du milieu au moment du prélèvement et ainsi d'expliquer certains résultats physico-chimiques.

Quatre variables physico-chimiques sont mesurés *in situ* à l'aide d'un multi paramètre de terrain (modèle Multi 340i/SET-82362, WTW®, Allemagne) ; il s'agit de la température (T°C), de la salinité (Sal), du pH, de l'oxygène dissous (OD).

Dans chaque site, la date et l'heure du prélèvement, les conditions météorologiques (houle, direction des vents), ainsi que d'éventuelles sources visibles de pollution, sont notées.

#### **Remarque**

Les sondes électrochimiques fournissent des signaux de mesure extrêmement sensibles et nécessitent une calibration et un entretien réguliers. Le procédé QSC (Quality Sensor Control) sert à évaluer l'état effectif de l'électrode des sondes. On réalise pour cela une calibration initiale avec les tampons de précision contenus dans le kit QSC. Chaque calibration ultérieure est ensuite comparée à la calibration initiale, et le résultat représenté graphiquement sous forme de barre colorée variant du vert au rouge. Cet indicateur permet de déterminer à tout ([https://www.humeau.com/media/blfa\\_files/CO\\_Catalogue-WTW\\_FR\\_300810.pdf](https://www.humeau.com/media/blfa_files/CO_Catalogue-WTW_FR_300810.pdf)).

- **Détermination de la matière en suspension (MES)**

Dès l'arrivée au laboratoire, la détermination de la MES dans l'eau est réalisée par la méthode de division de la masse du poids sec présente sur le filtre (WHATMAN GF/C de 47µm de diamètre) par le volume d'eau filtré (*Aminot et Kérouel 2004*).

### Principe

L'eau est filtrée et le poids des matières retenues par le filtre est déterminé par pesées différentielles.

### Mode opératoire

1. Peser chaque filtre sur la balance jusqu'à obtention d'un poids stable (=P1).
2. Placer le filtre dans la rampe de filtration.
3. Verser le volume d'eau (100 ml) jusqu'à filtration complète.
5. Récupérer le filtre et le mettre à l'étuve à 70°C jusqu'à évaporation totale de l'eau.
4. Après refroidissement total, peser le filtre (=P2).

### Expression des résultats

La teneur de l'eau en matières en suspension (mg/l) est donnée par l'expression :

$$\text{MES} = (\text{P2}-\text{P1}) / \text{V}$$

**P1** : poids du filtre avant filtration (mg). **P2** : poids du filtre après filtration (mg). **V** : volume d'eau filtrée (litre).

### 1.3.3 Échantillonnage

L'étape d'échantillonnage influence directement la qualité des résultats obtenus. Des précautions élémentaires doivent être prises pour obtenir un échantillon représentatif afin de minimiser les risques associés à la contamination de l'échantillon par le préleveur. Les échantillons peuvent être contaminés par un manque de soins dans l'application des techniques d'échantillonnage. Ainsi, il incombe au préleveur de s'assurer de la qualité du prélèvement, de la conservation et du transport adéquat des échantillons avant leur acheminement au laboratoire. L'échantillonnage a lieu la matinée, pour permettre le lancement des analyses bactériologiques dans les plus brefs délais.

## II. Matériel et méthodes

- **Prélèvement de l'eau**

L'eau destinée aux analyses bactériologiques est prélevée dans des flacons en verre de 250 ml préalablement stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 15 à 20 minutes. Afin d'éviter toute contamination éventuelle de l'échantillon d'eau lors de sa prise, le flacon stérile est débouché et immergé à une profondeur d'environ 50 cm de la surface de l'eau, puis ouvert dans le sens contraire du courant (Fig. 17). Une fois rempli, il est refermé sous l'eau pour éviter la formation de bulles d'air et tout risque de contamination lors du transport (Rodier et al. 2009).



**Figure 17 :** Prélèvement de l'eau.

Une fois le prélèvement effectué, les flacons sont conservés dans une glacière à l'abri de la lumière à basse température (4°C à 6°C), puis transportés au laboratoire pour analyse dans les 2 à 3 heures qui suivent (Rodier et al. 2009).

- **Prélèvement des sédiments**

Des échantillons de 300-500g de sédiments sont prélevés en raclant les premiers centimètres de la surface (2-5 cm), puis recueillis dans des bocaux en verre stériles (Fig. 18). Ils sont ensuite transportés et conservés dans une glacière à une température de 4°C jusqu'à leur analyse.



**Figure 18 :** Prélèvement des sédiments

- **Récolte des moules**

Les moules sont prélevées manuellement à partir des rochers sur lesquels elles sont fixées (Fig. 19). Selon la taille, dix à quinze individus sont mis dans des sacs propres et étiquetés (on note date et site) puis entreposés dans des glacières à une température comprise entre 4°C à 10°C pour être acheminés au



**Figure 19 :** Récolte des moules.

## **2. IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES MOULES COLLECTÉES DANS LE GOLFE D'ANNABA**

Pendant longtemps, la systématique des bivalves mollusques était essentiellement basée sur l'utilisation de plusieurs critères morphologiques. Celle-ci est établie à partir des nombreux ouvrages et références en matière de systématique (*Siddall 1980 ; Rajagopal et al. 2006*).

Les moules sont collectées à partir des quatre sites d'échantillonnage puis transportées dans une glacière maintenue à basse température jusqu'au laboratoire où elles sont triées, nettoyées et débarrassées des organismes incrustés. Une première identification morphologique, basée sur la morphologie externe et interne de la coquille et les empreintes musculaires (leurs formes et leur disposition) est réalisée, puis, les échantillons de tissus de chaque moule sont stockés à -20C° jusqu'à l'extraction de l'ADN.

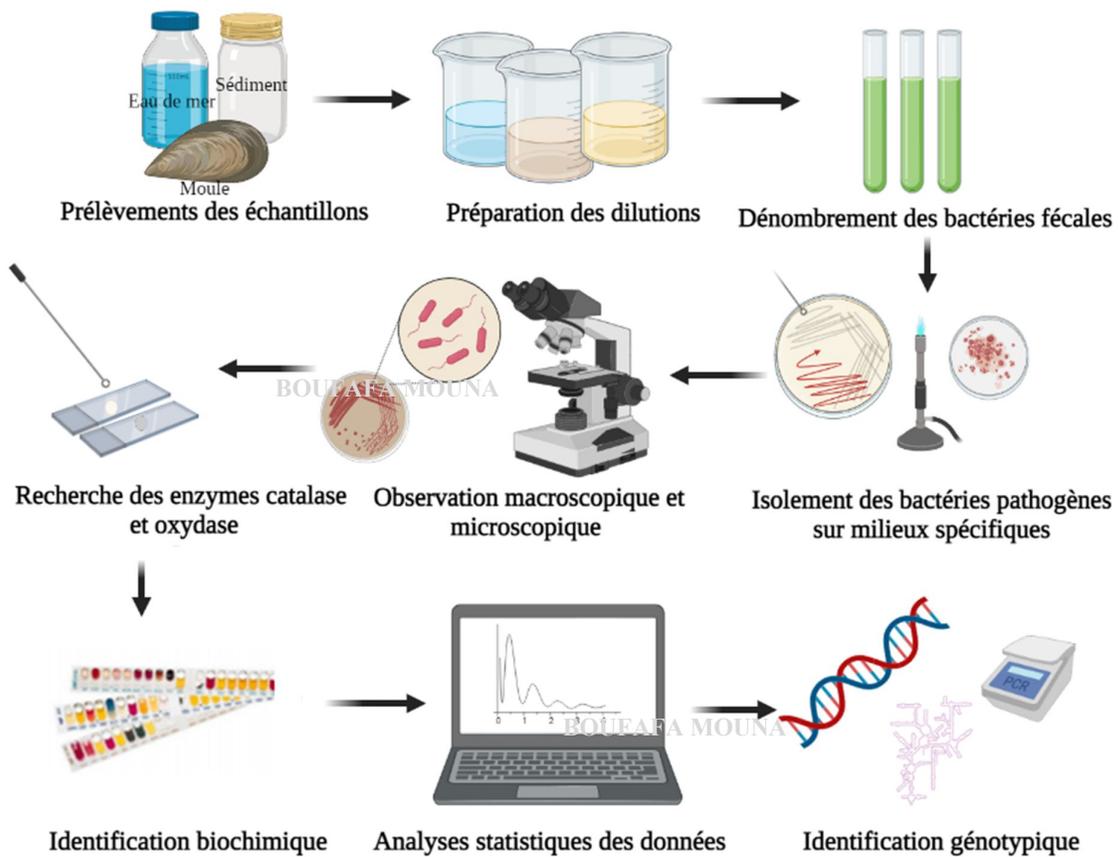
La mesure des paramètres linéaires est réalisée à l'aide d'un pied à coulisse à 1/20 mm de précision :

- La longueur totale correspondant à la plus grande distance ; séparant le bord antérieur du bord postérieur de la coquille.
- La largeur qui va de la charnière dorsale au bord ventral.
- L'épaisseur maximale qui est la largeur maximale de la convexité des deux valves réunies.

## **3. ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DES ÉCHANTILLONS**

L'analyse bactériologique d'un échantillon contaminé détermine le degré de contamination par les bactéries. Notre présente étude vise à évaluer la qualité bactériologique des eaux marines, des bivalves mollusques et des sédiments par le dénombrement des bactéries indicatrices de contamination fécale et la détection des bactéries potentiellement pathogènes, en utilisant des méthodes validées de microbiologie classique. Par la suite, d'autres méthodes sont appliquées avec un plus grand pouvoir discriminatoire pour discerner les bactéries qui présentent un aspect très similaire dans les analyses macro et microscopiques. Les étapes de notre travail sont résumées dans la figure suivante :

## II. Matériel et méthodes



**Figure 20** : Schéma des étapes de l'analyse bactériologique des échantillons.

### 3.1 Recherche et dénombrement des bactéries indicatrices de la contamination fécale

#### 3.1.1 Préparation des dilutions décimales

La préparation de la suspension/dilution mère et des dilutions décimales appliquées à tous les échantillons sont réalisées selon les normes AFNOR NF VO8- 010 et ISO 6887-1. Les dilutions suivent des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométriques : 0.1 - 0.01 ;...etc.

- Pour l'eau de mer, la solution mère consiste à la prise directe de 100 ml d'eau de mer (Fig. 21). La préparation des dilutions décimales est réalisée en ajoutant 1 ml des dilutions précédentes dans des tubes à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile.

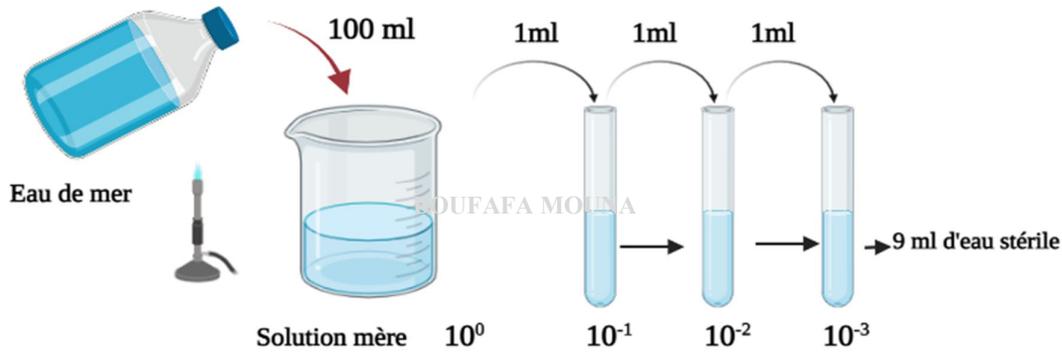
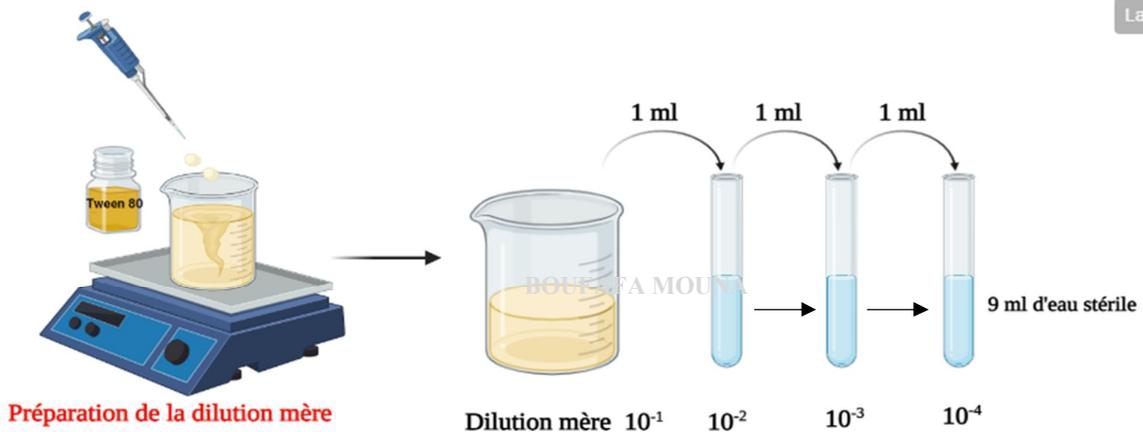


Figure 21 : Schéma des étapes de la préparation des dilutions décimales (pour l'eau de mer).

➤ **Sédiment**

- **Dilution mère 10<sup>-1</sup>** : Les sédiments (10 g) sont directement broyés, homogénéisés et dilués dans 90 ml d'eau distillée stérile supplémentée de 1 ml de Tween 80. Une agitation continue du mélange est assurée pendant 10 à 15 min (Fig. 22).



**Préparation de la dilution mère**

10g de sédiment + 90ml d'eau stérile+ 1 ml de Tween 80 (Agitation pendant 15 à 20 minutes)

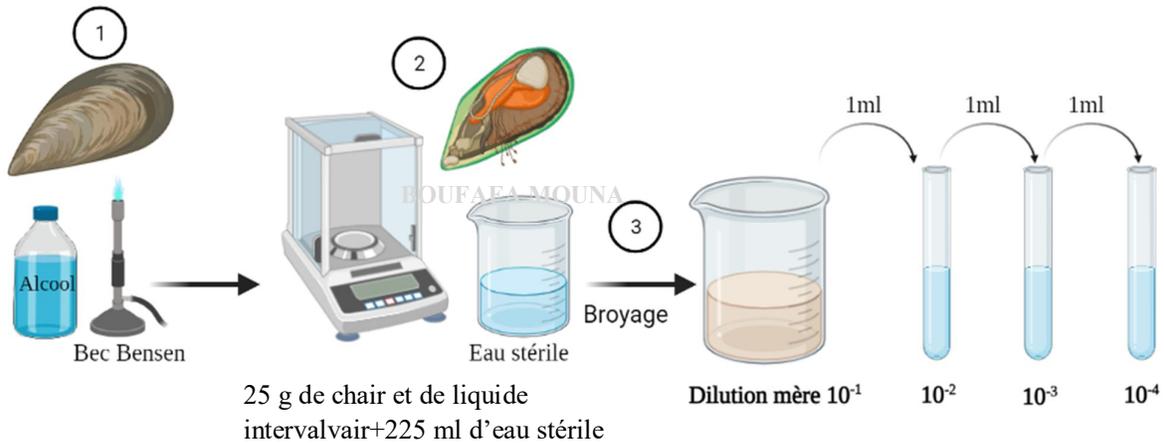
Figure 22 : Schéma des étapes de la préparation de la dilution mère et des dilutions décimales (pour les sédiments).

➤ **Moule**

Une fois au laboratoire, les moules sont nettoyées, brossées sous l'eau du robinet, puis désinfectées superficiellement par un jet d'alcool et flambage rapide.

- **Dilution mère  $10^{-1}$**  : Après ouverture aseptique, 25 g du contenu entier (chair et liquide inter-valvaire) est mélangé et recueilli stérilement, puis dilué dans 225 ml d'eau stérile, et soumis au broyage (15 000 t/mn pendant 30 secondes) à l'aide d'un broyeur homogénéiseur (Ultra-Turrax), afin d'obtenir un broyat homogène considéré comme la dilution mère de l'échantillon à tester (Fig. 23) (O.M.S 1983).

**Remarque** : L'agitation du contenu est nécessaire avant de préparer chaque dilution.



**Figure 23** : Schéma des étapes de la préparation de la dilution mère et des dilutions décimales (pour les moules) : 1. désinfection superficielle de la moule, 2. Préparation de la dilution mère, 3. Préparation des dilutions décimales.

### 3.1.2 Recherche et dénombrement des coliformes totaux et caractérisation d'*Escherichia coli*

#### • Principe

La recherche et le dénombrement des coliformes sont effectués selon la technique du NPP (Nombre le Plus Probable). Cette technique standard (Rodier *et al.* 2009) en milieu liquide fait appel à deux tests consécutifs à savoir :

- ✓ **Un test présomptif** : réservé à la recherche des coliformes totaux (CT), réalisé sur bouillon lactosé. Sa fermentation se manifeste par un trouble et un dégagement de gaz observé dans la cloche de Durham.
- ✓ **Un test confirmatif** : réservé à la recherche des coliformes fécaux (CF) dits coliformes thermo tolérants, et des *Escherichia coli* (EC) présumées à une température de 44°C, à partir des tubes positifs du test précédent.

- **Mode opératoire**

✓ **Test présomptif** : réalisé sur Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB). Tous les tubes sont munis de cloches de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu.

- On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9 ml de BLBVB simple concentration S/C munis de cloches de Durham.
- Pour les échantillons d'eau de mer, chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ . Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution  $10^{-2}$  et 1 ml de la dilution  $10^{-3}$ .
- Pour les échantillons de sédiments et de moules, chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution  $10^{-2}$ . Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution  $10^{-3}$  et 1 ml de la dilution  $10^{-4}$ .
- Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham.
- L'ensemble des tubes ainsi préparés est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures (Fig. 24).

- **Lecture**

Considérer comme positifs (c à d présence de coliformes totaux) les tubes présentant un trouble bactérien accompagné d'un virage au jaune de l'indicateur coloré (fermentation du lactose), et un dégagement gazeux dans la cloche de Durham.

✓ **Test confirmatif**

Chacun des tubes positifs du bouillon lactosé (BLBVB) de la première étape est repiqué (2 à 3 gouttes) dans un nouveau tube du bouillon lactosé (BLBVB), et éventuellement dans un second tube du milieu d'eau peptonée exempte d'indole, puis les deux tubes sont incubés à 44.5°C pendant 24h à 48h.

- **Lecture**

Sont considérés comme positifs (c à d présence de coliformes thermo-tolérants) les tubes présentant une pousse bactérienne sur milieu eau peptonée exempte d'indole, un trouble bactérien accompagné d'un virage au jaune de l'indicateur coloré (fermentation du lactose), et un dégagement gazeux dans la cloche de Durham sur milieu BLBVB.

Les tubes positifs du milieu eau peptonée exempte d'indole, additionnés de 2 à 3 gouttes du réactif de KOVACS, donnant un anneau rouge témoignent de la production d'indole, et donc la caractérisation d'*Escherichia coli* (Fig. 24).

- **Dénombrement**

On note le nombre des tubes positifs et on exprime le résultat selon la table de Mac Grady (voir annexe 1) pour déterminer le nombre le plus probable (NPP) de chaque groupe (coliformes totaux et *E.coli*) par 100 ml d'échantillon. Le nombre de coliformes ou d'*E.coli* pour 100 ml d'échantillon est déterminé par la formule suivante : **NPP\*Fd/V<sub>ensemencé</sub>**.

**NPP** : le nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady

**Fd** : le facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique.

**V<sub>ensemencé</sub>** : 1 ml.

## II. Matériel et méthodes

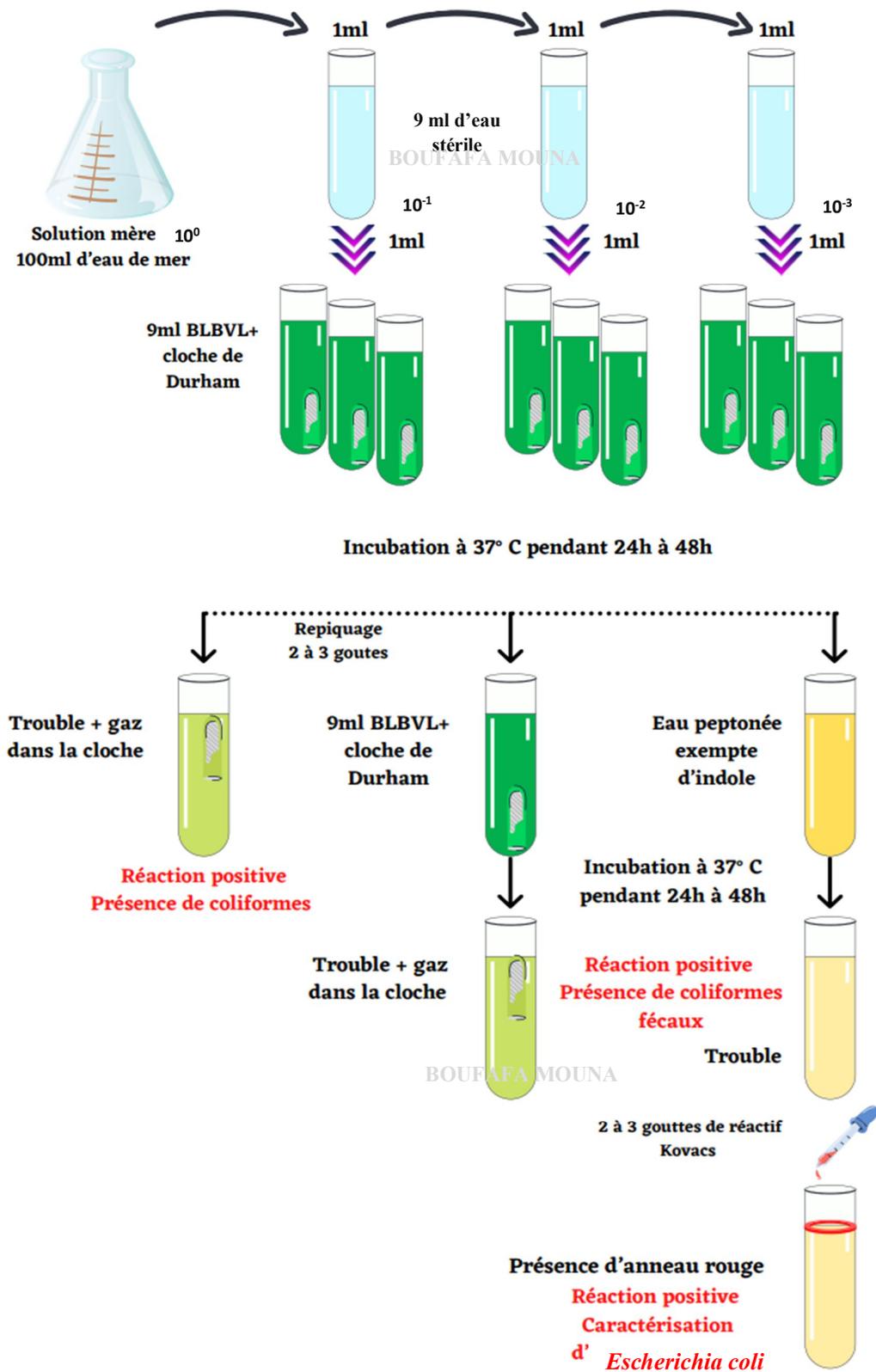


Figure 24 : Schéma du dénombrement des coliformes totaux et fécaux et caractérisation d'*Escherichia coli*.

### 3.1.3 Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux (Norme NF EN ISO 9308- 3, mars 1999)

Les principes de cette technique sont ceux décrits dans la partie concernant la colimétrie en milieux liquides. Elle fait appel à deux tests consécutifs :

- ✓ **Test présomptif** : réservé à la recherche présomptive des streptocoques totaux (ST), réalisé sur milieu Rothe simple concentration.
- ✓ **Test confirmatif** : réservé à la confirmation réelle des streptocoques fécaux (SF), réalisé sur milieu Eva-Litsky (milieu inhibiteur avec une forte concentration en azide de sodium et de cristal violet).

- **Mode opératoire**

- ✓ **Test présomptif**

- On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9 ml du milieu Rothe simple concentration.
- Pour les échantillons d'eau de mer, chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution  $10^{-1}$ . Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution  $10^{-2}$  et 1 ml de la dilution  $10^{-3}$ .
- Pour les échantillons de sédiments et de moules, chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution  $10^{-2}$ . Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution  $10^{-3}$  et 1 ml de la dilution  $10^{-4}$ .
- Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham.
- L'ensemble des tubes ainsi préparés est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures (Fig. 25).

- **Lecture :**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant un trouble bactérien.

- ✓ **Test confirmatif**

Chacun des tube positifs du milieu Rothe de la première étape est repiqué (2 à 3 gouttes) dans un tube contenant 9 ml du milieu Eva-Litsky, puis incubé à 37°C pendant 24h à 48h (Fig. 25).

- **Lecture**

Sont considérés comme positifs, les tubes présentant un trouble bactérien. Il arrive que la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette ayant la même signification que le trouble (Fig. 25).

- **Dénombrement**

La lecture finale s'effectue également selon les prescriptions de la table de Mac Grady (Annexe 1).

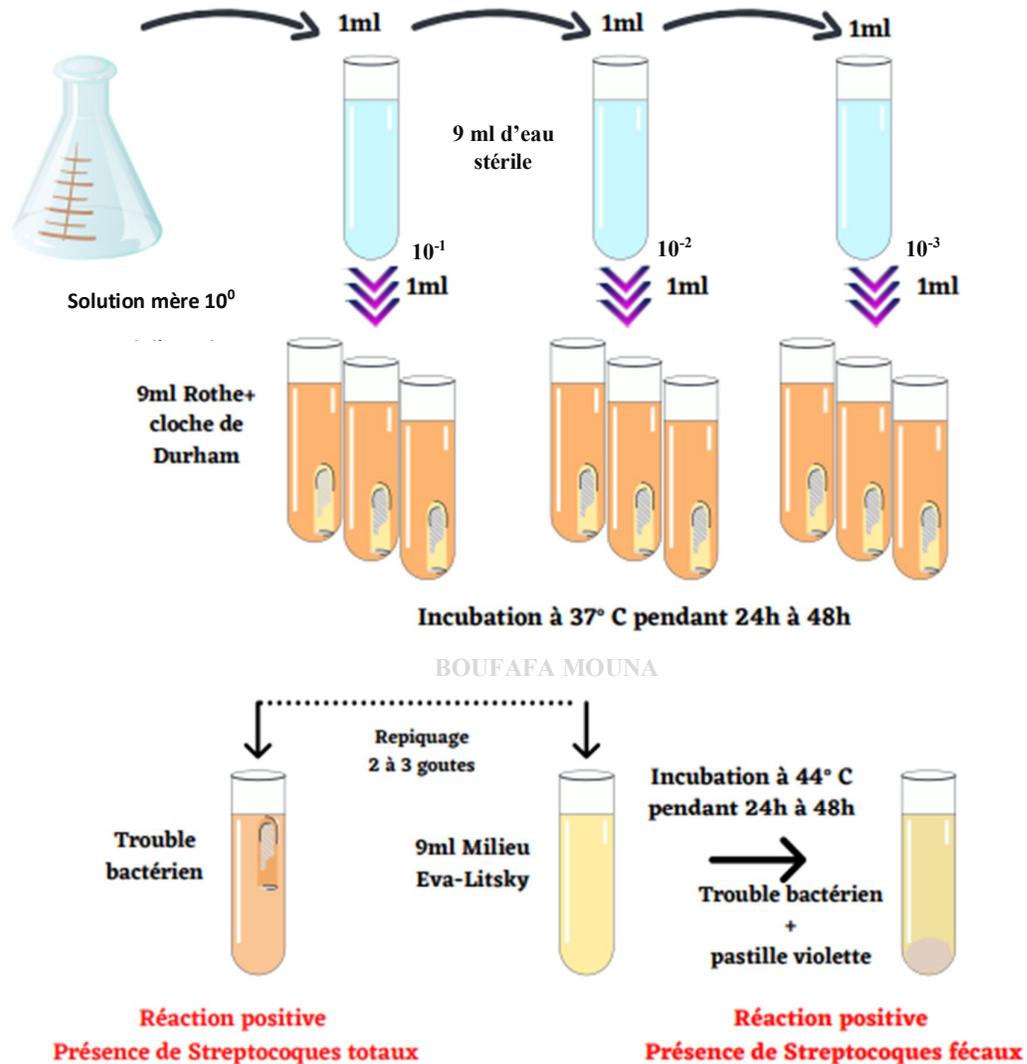


Figure 25 : Schéma de la recherche et dénombrement des streptocoques fécaux.

### 3.2 Recherche et identification des bactéries potentiellement pathogènes

La recherche des bactéries potentiellement pathogènes n'est pas effectuée de manière systématique dans le cadre des analyses de routine de l'eau de mer ; elle revêt une importance particulière dans les enquêtes épidémiologiques. Dans la présente étude, nous nous sommes intéressés à la recherche de certaines bactéries potentiellement pathogènes responsables d'infections hydriques, afin d'évaluer les niveaux de contamination possibles et éventuellement d'évaluer l'impact de la contamination des trois compartiments étudiés sur la santé humaine.

L'étude de la morphologie bactérienne est la première procédure effectuée pour identifier les bactéries. Elle permet une orientation préliminaire du diagnostic.

### 3.2.1 Isolement et purification des isolats bactérie

#### ➤ Isolement des entérobactéries

##### • Mode opératoire

- Introduire 1 ml de la solution/dilution mère de chaque échantillon dans 10 ml de bouillon nutritif (BN) et incuber à 37°C pendant 24h.
- Introduire 1 ml de la solution/dilution mère de chaque échantillon dans 10 ml de bouillon sélénite-cystéine et incuber à 37°C pendant 24h. Cette étape est réalisée spécifiquement pour la recherche des Salmonelles.
- Les géloses : Mac Conkey, EMB (gélose éosine bleu de méthylène), et SS (gélose *Salmonella-Shigella*) sont ensemencés avec 0.1 ml de culture prélevé du milieu d'enrichissement et mis en incubation à 37° C pendant 18 à 48 h.

#### ➤ Isolement des vibrio

La recherche de ces bactéries est réalisée selon la méthode décrite par Dellarras (2000).

##### • Mode opératoire

- Ajouter 1 ml de la solution/dilution mère de chaque échantillon dans un tube de 10 ml d'eau peptonée alcaline (E.P.A). Incuber à 37°C pendant 3h.
- Après incubation, prélever en surface une anse de culture et ensemencer un nouveau tube contenant 10 ml E.P.A. Incuber à 37°C pendant 3 heures.

##### • Isolement

- Ensemencer une boîte de TCBS (gélose à base de thiosulfate-citrate-sels biliaires-saccharose) à partir du dernier milieu d'enrichissement et incuber à 37° C pendant 24h.

#### ➤ Isolement des Pseudomonas

L'isolement des bactéries du genre *Pseudomonas* est réalisé sur la gélose au cétrimide, selon la méthode décrite par Delarras (2000). La gélose au cétrimide est utilisée pour l'isolement sélectif des *Pseudomonas* et notamment de *Pseudomonas aeruginosa*. Sur ce milieu, de nombreuses bactéries telle que les bactéries à Gram négatif, sont inhibées par la présence de l'ammonium quaternaire (le cétrimide) ainsi que par la présence de l'acide nalidixique (un antibiotique).

- Étaler 0,5 ml de la solution/dilution mère de chaque échantillon à la surface de la gélose au cétrimide puis incuber à 37°C pendant 24 heures.

➤ **Isolement des Staphylocoques**

À partir de la solution/dilution mère de chaque échantillon, on effectue des isolements sur milieu de Chapman. Les boîtes sontensemencées sur la surface par stries et incubés à 37°C pendant 24 à 48h.

❖ **Purification des isolats bactériens**

Après isolement, les colonies des isolats sont repiquées sur milieu solide jusqu'à purification. La pureté de chaque isolat doit être vérifiée par une observation macroscopique (aspect des colonies sur milieux de cultures : forme, couleur, taille), et une observation microscopique après coloration de Gram.

- Les étapes de l'isolement des bactéries potentiellement pathogènes sont résumées dans la figure 26.
- La composition des différents milieux de culture, des réactifs et des colorants utilisés dans cette étude sont présentée dans l'annexe

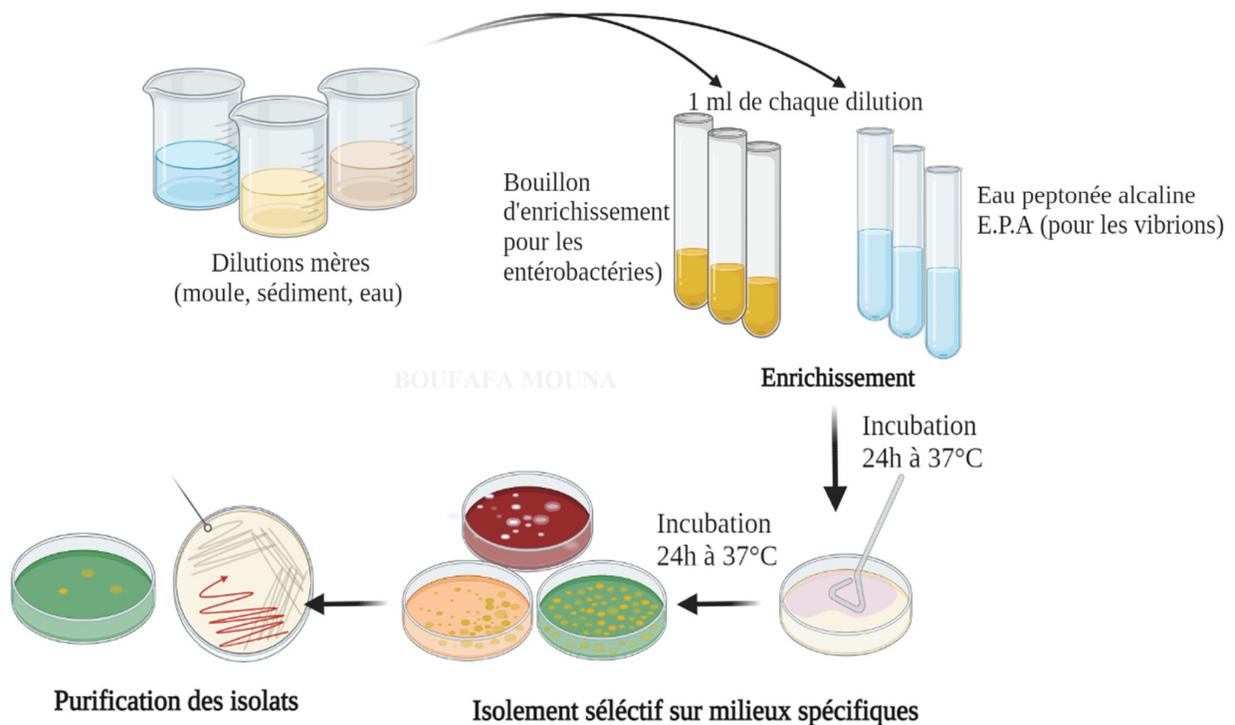


Figure 26 : Schéma de l'isolement et la purification des isolats potentiellement pathogènes.

### 3.2.2 Caractérisation macroscopique

L'examen macroscopique des cultures bactériennes est la première étape effectuée dans l'identification des souches bactériennes. Il permet de déterminer l'aspect des colonies comme la forme, la taille, la couleur, le contour, le relief, la consistance et la présence d'un pigment diffusant dans la gélose. L'aspect de ces colonies dépend du milieu utilisé, de la température et de la durée de l'incubation.

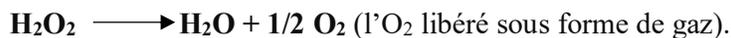
### 3.2.3 Caractérisation microscopique

L'observation microscopique est réalisée après la coloration de Gram ; elle permet de distinguer le type morphologique des cellules bactériennes (taille et forme), le mode de regroupement et le type de Gram. Cette coloration permet de déterminer deux grands groupes appelés Gram positif et Gram négatif. Les bactéries Gram positif gardent leur coloration violette après décoloration à l'alcool et les bactéries Gram négatif décolorées par l'alcool, sont teintées par la fuchsine et apparaissent roses.

### 3.2.4 Étude biochimique

#### ➤ Test de la catalase

La catalase est détectée par émulsion de la colonie bactérienne à tester sur une lame propre et sèche, dans du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) à 10 volumes. La présence de cette enzyme, se manifeste par l'apparition d'un dégagement d'oxygène sous forme de bulles gazeuses dans l'émulsion. La réaction biochimique effectuée est la suivante :



#### ➤ Test de l'oxydase

Ce test à la base de l'identification présomptive des bactéries à Gram (-), permet de mettre en évidence la phénylène diamine oxydase, une enzyme capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine (*Dellarras 2002*).

Ce test consiste à déposer une colonie pure sur un disque d'oxydase imbibée avec une goutte d'eau physiologique stérile. L'apparition d'une coloration violette signifie que le test est positif et que la souche possède l'enzyme oxydase.

### 3.2.5 Identification des isolats par la galerie biochimique miniaturisée Api système (bioMérieux)

- **Api 20E** : l'identification des bactéries non oxydatives (entérobactéries) est réalisée grâce la galerie biochimique API 20 E. C'est un système standardisé comprenant 20 tests biochimiques miniaturisés dans des microtubes contenant des substrats déshydratés pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux. . Les micro-tubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les tests.
- **API 20 NE** : (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) c'est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non entérobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.), combinant 8 tests conventionnels et 12 tests d'assimilation (<http://www.biomerieux.com>).
- **Api Staph** : c'est un système d'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*, comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans API Staph Medium qui reconstitue les tests.

Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du tableau de lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou du logiciel d'identification (Api Web-bioMérieux) fournis par le fabricant.

## 4. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNÉES

Toutes nos analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel R (R Development Core Team, 2014 Version 3.1.2), développé par Ihaka et Gentleman (1996). Ce logiciel est utilisé pour tracer des graphiques et pour effectuer des analyses statistiques (univariées jusqu'aux multivariées) à partir de données introduites.

Concernant nos données, une première analyse statistique est appliquée à travers le test de Shapiro-Wilk dans le but de tester la normalité de la distribution. Les différences inter-sites et inter-mois sont déterminées quant à elles par un test non- paramétrique : le Kruskal-Wallis.

Les corrélations entre les variables physico-chimiques et bactériologiques sont évaluées par le coefficient de corrélation linéaire simple de SPEARMAN `r` (non-paramétrique) pour analyser l'intensité des relations entre nos variables.

De plus, l'analyse en composantes principales ACP est également utilisée en tant que méthode descriptive dont l'objectif est de caractériser par une approche multivariée, la structuration des quatre sites d'échantillonnage dans le Golfe d'Annaba. Par la suite, un arbre de classification (analyse hiérarchique) est tracé afin de mieux visualiser les similitudes inter-sites et inter-mois.

### 5. IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES MOULES ET DES ISOLATS BACTÉRIENS

Cette étude a été effectuée au « Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires (LMGM) » au sein du centre de biologie interactive (UMR 5100, CNRS - Université Paul Sabatier), Toulouse, France. La recherche porte sur l'identification de notre bio-indicateur sentinelle, et les contaminants recensés à partir de ce compartiment dans les sites étudiés.

#### 5.1 Identification moléculaire des moules

Les mitochondries sont des organites importants dans les cellules eucaryotes et sont impliquées dans divers processus, dont la génération d'ATP par phosphorylation oxydative. L'origine endosymbiotique de ces organelles représente une étape fortement discutée de l'évolution eucaryotique qui a contribué à l'émergence de la complexité cellulaire qui caractérise les eucaryotes modernes. L'ADN mitochondrial est issu du domaine de la vie eubactérien, et plus spécifiquement, les  $\alpha$ -protéobactéries qui sont les plus proches parents identifiés des mitochondries (*Margulis 1970*).

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses séquences complètes du génome mitochondrial ont été déterminées, et plusieurs études récentes ont résumé divers aspects de la structure, du contenu génétique, et de l'expression du génome mitochondrial (*Paquin et al. 1997*). Ces données ont permis de dégager un certain nombre d'idées spécifiques sur l'évolution du génome mitochondrial. La première et la principale idée est que la production d'ATP, couplée au transport d'électrons, et la traduction des protéines mitochondriales représentent l'essence de la fonction mitochondriale : ces fonctions sont communes à tous les génomes mitochondriaux et peuvent être retracées sans ambiguïté et directement à un ancêtre  $\alpha$ -protéobactérien (*Gray et al. 1999*).

Dans la présente étude, nous avons utilisé des séquences mitochondriales de la sous-unité 16S du ribosome (ARNr 16S) pour identifier les moules collectées dans le Golfe d'Annaba.

##### 5.1.1 Extraction de l'ADN mitochondrial

- **Protocole**
  - Préparer 700  $\mu$ L de tampon de lyse (50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS) avec 50  $\mu$ L de Protéinase K (tampon de stock (10mg/ml) et 0.5g du tissu de la moule.

## ***II. Matériel et méthodes***

- Incuber toute la nuit à 37°C.
- Après Incubation, ajouter quelques billes de zirconium de 0,1 mm, agiter le tube pendant environ 3 min, puis centrifuger pendant 1 min à vitesse maximale.
- Transférer environ 700 µL de surnageant dans un nouveau tube.
- Ajouter le 300 µL Phénol- Chloroforme- Alcool isoamylique (25:24:1) puis vortexer.
- Transférer le surnageant dans un tube contenant une Phase Lock Gel™ (PLG) et centrifuger pendant 5 min à 14000rcf.
- Ajouter 300 µL de Phénol- Chloroforme- Alcool isoamylique (25:24:1) dans le même tube et centrifuger pendant 5 min à 13000rcf.
- Transférer un volume connu de surnageant (≈300 µL) dans un nouveau tube et ajouter 33 µL d'acétate de sodium [3M].
- Précipiter la phase aqueuse avec 1000 µL d'isopropanol.
- Incuber à -20°C pendant 2h.
- Après incubation, centrifuger à 4°C pendant 30min à 20800 rcf
- Jeter le surnageant et laver le culot avec l'éthanol 75% et centrifuger pendant 15min à 13000rcf.
- Répéter l'étape une autre fois.
- Jeter le surnageant et le reste de l'éthanol et sécher le culot à température ambiante (10 minutes maximum).
- Re-suspendre le culot dans 30 µL de TE 1X (10 mM Tris-HCl ; pH 8, 1 mM EDTA) (Fig. 27).

## II. Matériel et méthodes

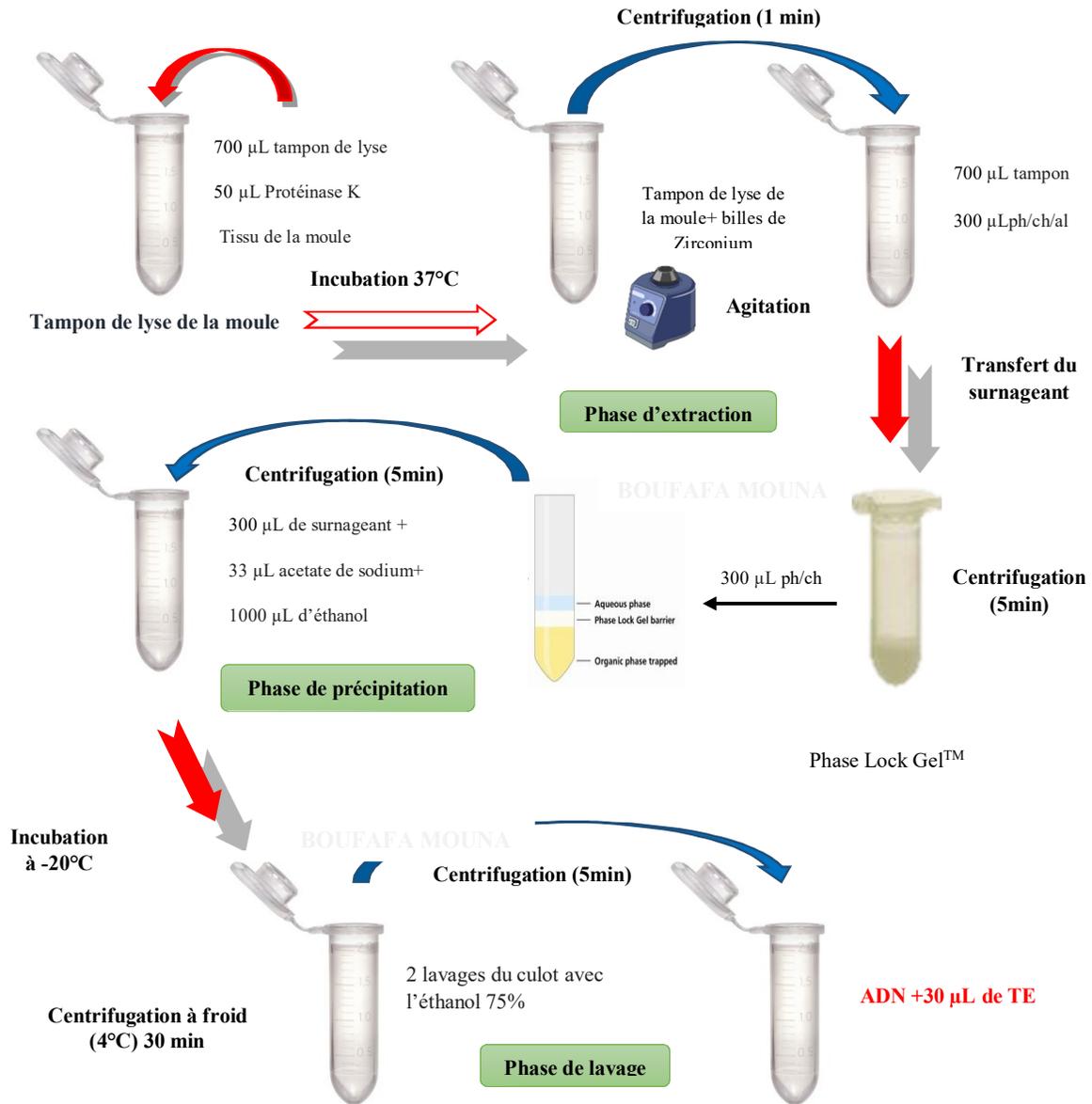


Figure 27 : Schéma du protocole d'extraction d'ADN des moules.

### 5.1.2 Amplification de l'ADNmt par PCR

- **Amorces utilisées pour la PCR**

Dans la mise au point de la réaction PCR standard, le choix des amorces est crucial. Les amorces utilisées dans cette étude ont été commandées auprès de la société EUROFINS. Dès réception, elles ont été mises en solution, selon les instructions du fabricant, et congelées à -20°C.

- **Protocole**

Le gène mitochondrial de l'ARNr 16S est amplifié par PCR, en utilisant les amorces AR 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' et BR 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3' (*Weber et al. 2009*).

Pour chaque réaction de PCR, un volume total de 25µL est utilisé contenant 0.5 µl de la Go Taq DNA polymérase (Promega), 1.5 µl de dNTPs (2.5 mM), 1.5 µl (10 µM) de chaque amorce, 10 µl (5x) du tampon et de l'eau ultra pure.

30 cycles de PCR sont réalisés en utilisant 1 µL d'ADN purifié.

La réaction d'amplification est effectuée dans le thermocycleur Master Cycler Personal. Le programme de la PCR est le suivant (Tab. 5) :

**Tableau 5 :** Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour l'identification des moules)

<i>Étape</i>	<i>Température</i>	<i>Temps</i>	
<i>Dénaturation initiale</i>	94 C°	3mn	
<i>Dénaturation des brins</i>	94 C°	20sc	} 30 cycles
<i>Hybridation</i>	51 C°	20sc	
<i>Élongation</i>	72 C°	45sc	
<i>Élongation finale</i>	72 C°	3mn	

### 5.2 Identification moléculaire des isolats bactériens provenant des moules

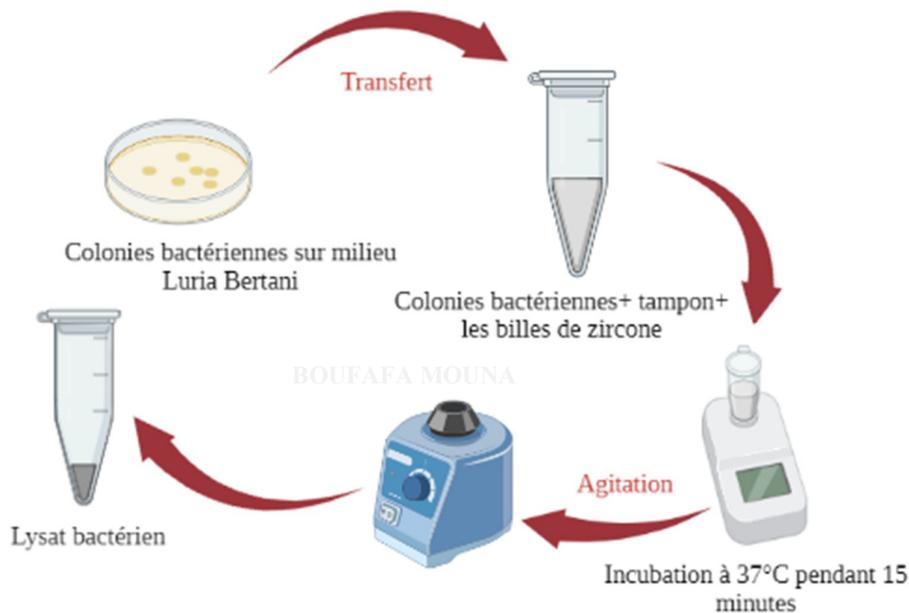
Le marqueur moléculaire choisi dans cette étude est le gène ribosomal 16S.

### 5.2.1 Extraction de l'ADN partiel des isolats bactériens

L'ADN génomique (ADNg) de 25 isolats sélectionnés, est extrait à partir de quelques colonies isolées sur milieu de culture Luria Bertani après 24 heures d'incubation.

- **Protocole**

- Transférer quelques colonies bactériennes dans des tubes Eppendorf de 1,5 ml contenant 50 µl de tampon TE 1X (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) complété par environ 100 mg de billes de zirconium de 0,1 mm.
- Incuber le tube à 37°C pendant 15 minutes.
- Secouer vigoureusement le tube pendant 3 minutes pour perturber les cellules.
- Le lysat bactérien obtenu est prêt à être utilisé comme matrice pour l'amplification du gène de l'ARNr 16S (Fig. 28).



**Figure 28** : Schéma de l'extraction de l'ADN génomique.

### 5.2.2 Amplification de l'ADNg par PCR

Le gène de l'ARNr 16S ( $\approx 1500$  pb) de 25 isolats isolés à partir des moules collectées sur le site Sidi Salem est amplifié.

Le mélange PCR de 25 µl contient 0,5 µl de matrice d'ADN, 2,5 µl de tampon DreamTaq (10x), 1,5 µl de dNTP (2,5 mM chacun), 0,5 µl d'ADN polymérase Dream Taq (Thermo Scientific™) et 1,5 µl (10 µM) de chaque amorce universelle 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' et 1492R 5'-CGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (*Lane 1991*).

## II. Matériel et méthodes

35 cycles de PCR sont réalisés en utilisant 0.5 µL du lysat bactérien. Le programme de la PCR est comme suit :

**Tableau 6 :** Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour l'identification moléculaire des isolats bactériens).

<i>Étape</i>	<i>Température</i>	<i>Temps</i>
<i>Dénaturation initiale</i>	94 C°	2mn
<i>Dénaturation des brins</i>	94 C°	1mn
<i>Hybridation</i>	55 C°	1.5mn
<i>Élongation</i>	72 C°	1mn
<i>Élongation finale</i>	72 C°	3mn

} 35 cycles

### 5.2.3 Electrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est communément la méthode la plus utilisée pour séparer des molécules en fonction de leur taille et de leur forme. Il s'agit d'un moyen de séparation très efficace pour des biomolécules chargées telles que l'ADN.

Les produits d'amplification des deux PCR standards décrites ci-dessus sont analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1X pour vérifier que les fragments d'ARNr 16S mitochondrial et génomique ciblés sont amplifiés.

#### • Préparation du gel d'Agarose

- Dans un flacon en verre stérile, mélanger 0.8 g d'agarose avec 100 ml du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) pour une concentration finale de 1X.
- Faire fondre la solution au four à micro-ondes à haute température jusqu'à ce que l'agarose soit complètement dissolue.
- Laisser refroidir l'agarose jusqu'à 60°C.
- Ajouter 2 µl d'un agent intercalant, le SYBR safe (Invitrogen) et mélanger bien la solution.
- Verser la solution d'agarose refroidie dans le support de coulage. Le gel devrait se solidifier au bout de 20 minutes maximum.
- Enlever les peignes et laisser refroidir à température ambiante jusqu'à solidification.

#### • Migration des produits d'amplification sur gel d'Agarose

- Placer le gel d'agarose dans la cuve d'électrophorèse.

## II. Matériel et méthodes

- Couvrir le gel avec le tampon TBE 1X. Le gel doit être submergé dans son intégrité.
- Déposer un marqueur de poids, le Gene Ruler™ 1 kb Plus DNA Lader.
- Déposer les produits PCR amplifiés avec un témoin positif dans les puits.
- Fermer le couvercle de sécurité, et vérifier que le gel d'agarose soit placé dans la direction correcte.
- Brancher la cuve à la source de courant et réaliser l'électrophorèse sous tension à 100V pendant 30 min.
- Une fois l'électrophorèse terminée, retirer le gel de la cuve d'électrophorèse et visualiser les bandes dans un système d'imagerie à UV.
- Les amplicons sont purifiés des produits PCR en utilisant le kit Gene Jet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific™)

### 5.2.4 Séquençage des produits PCR

L'analyse de la séquence du gène de l'ARNr 16S est réalisée pour identifier et classer la moule ainsi que les différents isolats des échantillons du site Sidi Salem. Dans le cas présent, les produits de la PCR ont été envoyés à la compagnie EUROFINS (Allemagne) avec les mêmes amorces utilisées pour les réactions de la PCR.

### 5.3 Analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique consiste principalement en l'alignement de séquences et la construction d'arbres phylogénétiques.

Les différentes séquences partielles obtenues dans cette étude sont d'abord analysées et corrigées manuellement en utilisant le logiciel BioEdit Sequence Alignment Editor (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), puis comparées aux séquences homologues des espèces de référence retrouvées dans la base de données GenBank (<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) avec l'algorithme BLAST ; ceci permettra de caractériser les isolats étudiés et de leur attribuer une assignation taxonomique. Les résultats sont exprimés en % d'homologie de séquences.

#### • Construction de l'arbre phylogénétique du gène mitochondrial de l'ARNr 16S

La séquence de l'ADN mitochondrial (ADNmt) de la moule récoltée du site Sidi Salem est alignée avec vingt-quatre séquences de *Mytilidae* disponibles dans la base de données Genbank à l'aide du logiciel Clustal X intégré dans le programme MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (Kumar *et al.* 2016).

L'arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène mitochondrial de l'ARNr 16S de vingt-cinq espèces de la famille des *Mytilidae* est construit selon la méthode de Neighbor joining avec 1 000 réplifications (bootstrap). La séquence de l'espèce *Geukensia demissa* est rajoutée afin de servir d'out-group, pour enraciner l'arbre.

### ✓ Construction de l'arbre phylogénétique du gène de l'ARNr 16S

Les séquences d'ARNr 16S des 25 isolats sélectionnés ainsi que le meilleur résultat de la base de données GenBank pour chacune des séquences, sont comparées dans un alignement multiple à l'aide du logiciel Clustal X (*Kumar et al. 2016*).

L'arbre phylogénétique basé sur les séquences est construit selon la méthode de Neighbor joining avec 1 000 réplifications bootstrap. La séquence de l'espèce *Halobacterium* sp. A1<sup>T</sup> est utilisée pour enraciner l'arbre.

### 5.4 Typage moléculaire par la méthode "Multi-locus séquence typing" (MLST)

Dans cette étude, cinq isolats (EM3, EM18, EM97, EM102 et MM6) isolés à partir des moules sont sélectionnés sur la base de leur même site d'isolement (Sidi Salem) et de leur date d'échantillonnage (15 janvier 2018) pour une meilleure caractérisation par un typage de séquence multilocus (MLST).

L'ADN de tous les isolats est soumis à une amplification PCR ciblant les sept gènes spécifiques : *trpA* (tryptophan synthase subunit A), *trpB* (tryptophan synthase subunit B), *dinB* (DNA polymerase), *polB* (polymerase PolII), *putP* (proline permease), *pabB* (p-aminobenzoate synthase) et *icdA* (isocitrate dehydrogenase)) à l'aide des amorces appropriées (Tab. 8), et en suivant les mêmes procédures utilisées pour les gènes de l'ARNr 16S.

Le programme de la PCR est détaillé dans le tableau 7.

**Tableau 7** : Paramètres du couple température/temps programmés pour la PCR (pour le MLST)

Étape	Température	Temps
Dénaturation initiale	94 C°	4mn
Dénaturation des brins	94 C°	30sc
Hybridation	52 C°	30sc
Élongation	72 C°	2mn
Élongation finale	72 C°	4mn

} 30 cycles

## II. Matériel et méthodes

L'arbre phylogénétique est basé sur des séquences partielles concaténées des sept gènes des sisolats EM3, EM18, EM97, EM102 et MM6, ainsi que des loci équivalents dans des souches étroitement apparentées. Les séquences sont alignées avec Clustal Omega avec les paramètres par défaut sur le serveur de l'EBI et l'arbre-guide est visualisé à l'aide de iTOL (Letunic et Bork, 2019 ; Madeira et al. 2019).

**Tableau 8** : Tableau des amorces utilisées pour l'amplification des gènes du MLST.

<b>Gène cible</b>	<b>Nom de l'amorce</b>	<b>Séquence (5'-3')</b>	<b>Référence</b>
<b>trpA</b>	trpA-F	ATGGAACGCTACGAATCTCTGTTTGCCC	<i>Escobar-Páramo et al. 2003</i>
	trpA-R	TCGCCGCTTTCATCGGTTGTACAAA	
<b>trpB</b>	trpB-F	ACAATGACAAGATTACTTAACCCCT	<i>Escobar-Páramo et al. 2003</i>
	trpB-R	TTTCCCCCTCGTGCTTTCAAAATATC	
<b>polB</b>	polB-F	TGGAAAACTCAACGCCTGGT	<i>Bjedov et al. 2003</i>
	polB-R	TGGTTGGCATCAGAAAACGGC	
<b>icdA</b>	icdA-F	GAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGG	<i>Escobar-Páramo et al. 2004</i>
	icdA-R	GATGATCGCGTCACCAAAYTC	
<b>putP</b>	putB-F	GCGACGATCCTTTACACCTTTATTG	<i>Escobar-Páramo et al. 2003</i>
	putB-R	CGCATCGGCCTCGGCAAAGCG	
<b>dinB</b>	dinB-F	TTGAGAGGTGAGCAATGCGTA	<i>Bjedov et al. 2003</i>
	dinB-R	GTATACATCATAATCCCAGCAC	
<b>pabB</b>	pabB-F	TTTTACTCCGGCTATGCCGATCA	<i>Guttman et Dykhuizen 1994</i>
	pabB-R	GCTGCGGTTCCAGTTCGTCGATAAT	

### ***III. RÉSULTATS***

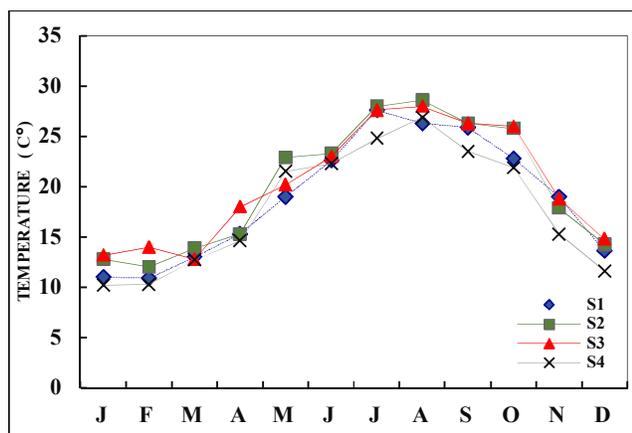
## 1. Évaluation de la qualité physico-chimique de l'eau dans le Golfe d'Annaba

### 1.1 La température de l'eau

La température des eaux marines au niveau des sites étudiés oscille entre 10.2°C et 28.6°C. La variation temporelle de cette variable environnementale est marquée par un rythme saisonnier.

Les valeurs maximales (28 et 28.6 °C) sont enregistrées durant la saison estivale (les mois de juillet et août) au niveau de Sidi Salem et Rezgui Rachid, respectivement, alors que les valeurs minimales (10.2°C et 10.3°C) sont notées pendant la saison hivernale (le mois de janvier) au niveau de Lahnaya et Cap de Garde, respectivement (Fig. 29).

L'augmentation de la température de l'eau peut être attribuée à l'augmentation de la température de l'air en passant de l'hiver en été.

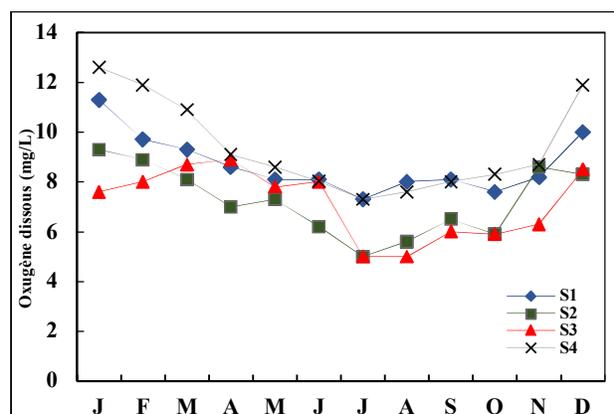


**Figure 29** : Variations spatio-temporelles de la température de l'eau du Golfe d'Annaba.

### 1.2 L'oxygène dissous de l'eau

Les teneurs en oxygène dissous des eaux du Golfe oscillent entre 5 et 12.6 mg/L.

Les teneurs de cette variable environnementale montrent des fluctuations saisonnières, illustrées par des valeurs assez élevées en période hivernale (entre 11.9 et 12.6 mg/L à Lahnaya) et des valeurs basses (entre 5 et 5.9 mg/L) en période estivale et automnale à Rezgui Rachid et Sidi Salem, respectivement (Fig. 30).



**Figure 30** : Variations spatio-temporelles de l'oxygène dissous de l'eau du Golfe d'Annaba.

### 1.3 Le potentiel d'hydrogène (pH) de l'eau

Le pH des eaux du Golfe est relativement constant et alcalin pendant toute la période d'étude, avec une légère augmentation au printemps.

La valeur la plus basse est relevée au mois d'avril (7.3) au Cap de Garde, alors que la valeur la plus élevée est enregistrée en juin (8.9) à Lahnaya (Fig. 31).

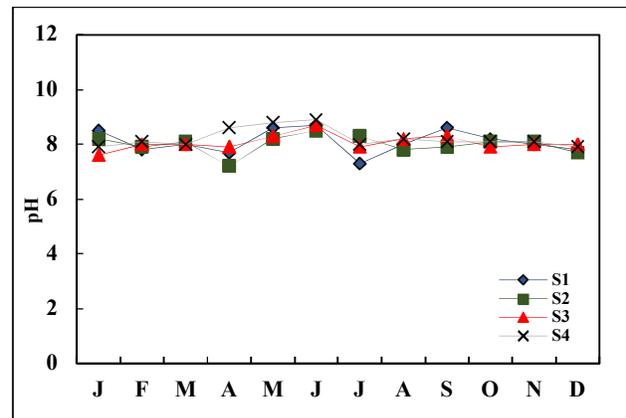


Figure 31 : Variations spatio-temporelles du pH de l'eau du Golfe d'Annaba.

### 1.2 La salinité de l'eau

La salinité varie dans le même sens que celui la température et montre des variations similaires dans l'ensemble des sites étudiés. La valeur maximale est relevée en août à Sidi Salem et Rezgui Rachid (41.6 g/L), et en juillet à Cap de Garde (41.2 g/L) (Fig. 32).

C'est à Sidi Salem que la valeur la plus basse (34.9 g/L en mars) est notée (Fig.32).

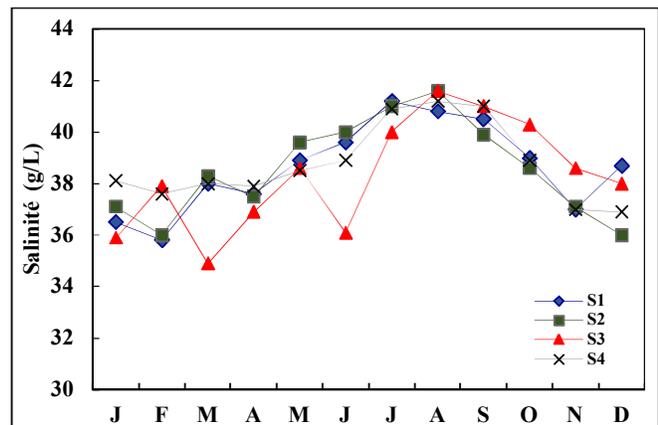


Figure 32 : Variations spatio-temporelles de la salinité de l'eau du Golfe d'Annaba.

### 1.5 Les matières en suspension (MES) de l'eau

Les MES montrent des fluctuations qui varient d'un mois à l'autre et d'un site à l'autre. La valeur maximale est enregistrée à Sidi Salem et Rezgui Rachid (0,42 mg/L) en mois de février et décembre, respectivement. Par ailleurs, c'est en juin que les teneurs de cette variable atteignent les valeurs minimales (0.08-0.12 mg/L) dans pratiquement l'ensemble des sites (Fig. 33).

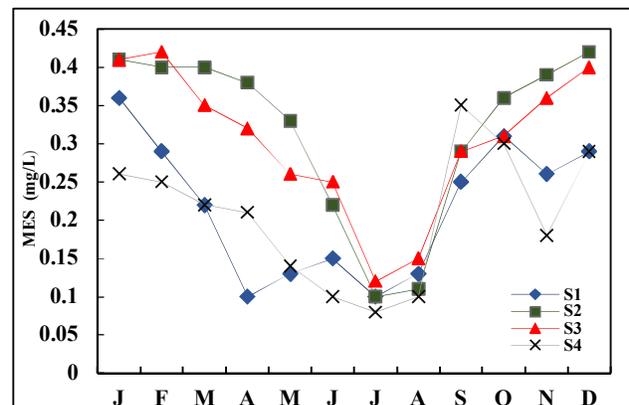


Figure 33 : Variations spatio-temporelles des MES de l'eau du Golfe d'Annaba.

## **2. Résultats des analyses bactériologiques**

Nos analyses bactériologiques visent à évaluer la qualité des eaux du Golfe d'Annaba par rapport aux normes fixées par la réglementation algérienne et européenne afin de préserver la santé publique, d'une part, et le milieu marin, d'autre part.

### **2.1 Recherche et dénombrement des bactéries indicatrices de la contamination fécale**

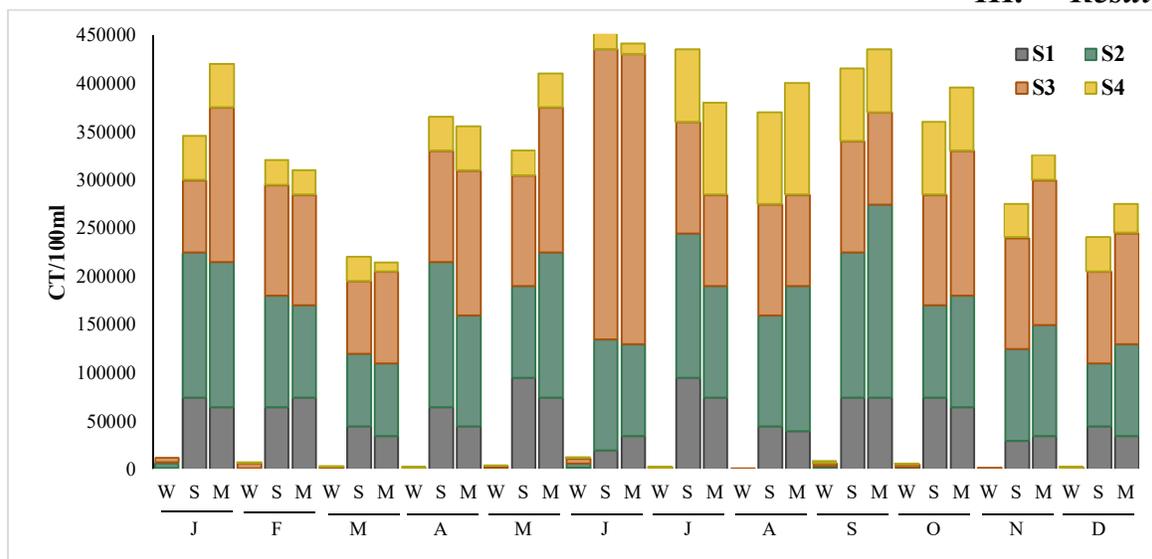
#### **➤ Coliformes totaux (CT)**

Comme le montre la figure 34, les résultats de l'analyse bactériologique indiquent que la contamination fécale par les CT varie selon les sites et les mois d'échantillonnage.

Pour les échantillons d'eau de mer, nous notons, des valeurs en CT, supérieures aux valeurs guides (500 germes/100 ml selon le décret exécutif n° 93-164 du 10/07/1993 JORA n° 46), à Sidi Salem et Rezgui Rachid, pendant toute la période d'étude. Au Cap de Garde, nous notons 1 pic de  $2.4.10^3$  germes /100 ml en janvier, 2 pics de  $2.1.10^3$  CT/100 ml en juin et septembre, et un pic de  $1.2.10^3$  CT/100 ml en octobre. Au niveau de Lahnaya, les teneurs relevées restent inférieures aux valeurs guides sauf en septembre et octobre où 2 pics de  $2.1.10^3$  CT /100 ml et  $9.3.10^2$  CT sont enregistrés (Fig.34).

Les moules prélevées dans l'ensemble des sites hébergent, durant toute l'année, des CT à des teneurs très élevées (Fig. 36). Les teneurs maximales sont enregistrées à Sidi Salem ( $3.10^5$  CT/100g) en juin, et à Rezgui Rachid ( $2.10^5$  CT/100g) en septembre.

D'autre part, les résultats obtenus ont révélé que les sédiments présentent des teneurs en CT comparables à celles trouvées dans les moules. Des teneurs de  $3.10^5$  CT/100 g sont enregistrées au niveau de Sidi Salem en juin, et des teneurs de  $1.5.10^5$  CT/100 g sont enregistrées en janvier, avril, juin et septembre à Rezgui Rachid. Ce sont toutefois les sédiments de Lahnaya du mois de novembre, qui enregistrent la teneur en CT la plus basse ( $2.10^4$  CT/100g) (Fig. 34).



**Figure 34** : Variations spatio-temporelles des teneurs en coliformes totaux enregistrés dans le Golfe d'Annaba (CT : coliformes totaux ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule).

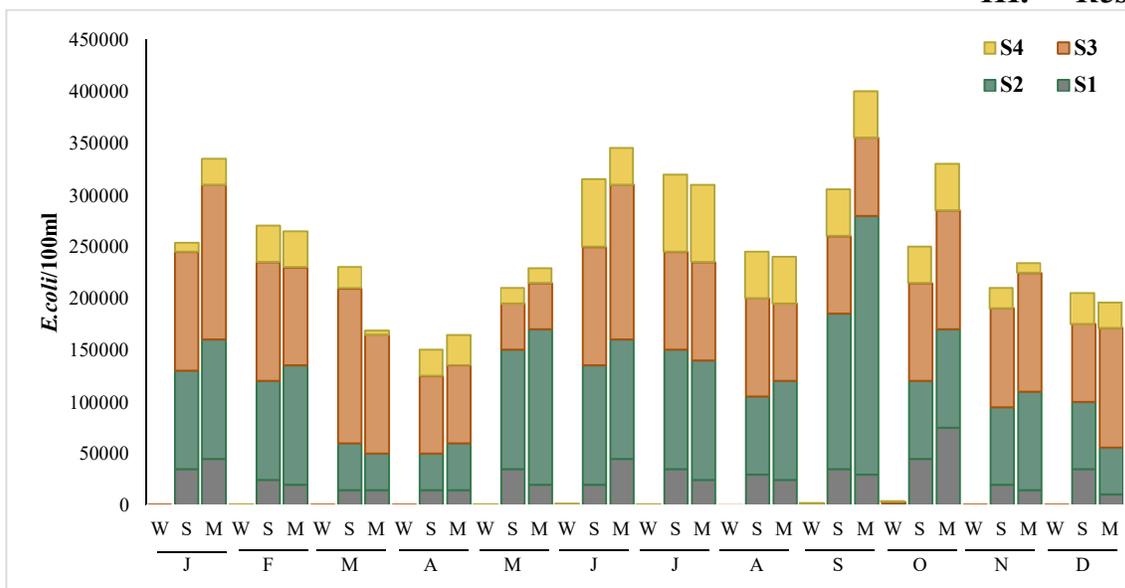
➤ *Escherichia coli* (EC)

Les teneurs en *E.coli* présentent une variation similaire à celle des coliformes totaux dans les échantillons récoltés dans l'ensemble des sites.

Les concentrations en *E.coli*, enregistrées dans les eaux du Cap de Garde et Lahnaya, sont relativement faibles, et sont inférieures aux valeurs guides fixées à 100 germes/100ml selon le décret exécutif n° 93-164 du 10/07/1993 JORA n° 46 durant 9/12 mois au Cap de Garde et durant 10/12 mois à Lahnaya. A Sidi Salem et Rezgui Rachid 3 pics de  $1.2.10^3$  EC/100 ml sont relevés au mois de septembre et octobre (Fig. 35).

Les moules du Sidi Salem et de Rezgui Rachid hébergent des *E. coli*, durant toute l'année de l'échantillonnage à des teneurs variant de  $3.5.10^4$  et  $2.5.10^5$  EC/100g de broyat à Rezgui Rachid, et de  $4.5.10^4$  à  $1.5.10^5$  EC/100g de broyat à Sidi Salem. Ces concentrations dépassent les valeurs guides fixées à 230 germes/100g de broyat selon le règlement (854/2004/CE) du 29 avril 2014 relatif à la consommation humaine. Ce sont toutefois les moules de Lahnaya du mois de mars, qui enregistrent la teneur en *E. coli* la plus basse ( $4.10^3$  EC/100g de broyat) (Fig. 35).

Les sédiments, dans l'ensemble des sites, présentent une forte contamination par les *E. coli* (Fig. 35) ; des teneurs de  $1.5. 10^5$  germes/100g sont enregistrées en mars à Sidi Salem, et en septembre à Rezgui Rachid. En ce qui concerne Cap de Garde et Lahnaya, la contamination est assez marquée de juin à octobre ; durant cette période, les teneurs enregistrées varient de  $4.5.10^4$  à  $7.5.10^4$  EC/100g.



**Figure 35** : Variations spatio-temporelles des teneurs en *E. coli* enregistrés dans le Golfe d’Annaba (*E. coli* : *Escherichia coli* ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule).

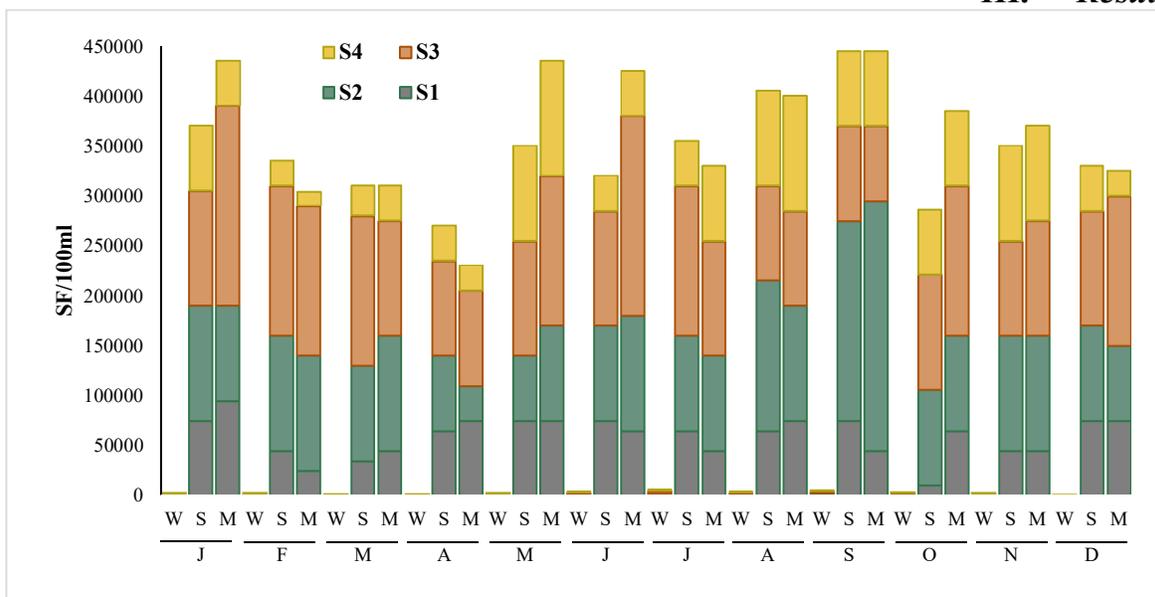
➤ **Streptocoques fécaux (SF)**

Les streptocoques fécaux sont détectés dans l’ensemble des échantillons récoltés durant toute la période d’étude.

Au Cap de Garde et Lahnaya, les eaux analysées présentent des teneurs en SF dépassant les valeurs guides fixées à 100 germes /100ml selon le décret exécutif n° 93-164 du 10/07/1993 (JORA n° 46). Quant aux eaux de Sidi Salem et Rezgui Rachid, les teneurs en streptocoques fécaux relevées sont nettement supérieures aux valeurs guides ; un maximum de  $2.1.10^3$  SF/100ml est noté en juillet à Sidi Salem (Fig. 36).

Les moules, dans l’ensemble des sites, présentent une forte contamination par les Streptocoques fécaux (Fig. 36) ; les teneurs relevées, varient de  $1.4.10^4$  à  $2.5.10^5$  SF/100 g de broyat. C’est à Lahnaya que la teneur la plus basse ( $1.4.10^4$  SF/100ml) est enregistrée en mois de février.

Les sédiments provenant des quatre sites d’échantillonnage (Fig.36), montrent une forte contamination par les SF, la teneur maximale est enregistrée en mois de septembre à Rezgui Rachid ( $2.10^5$  SF/100 g). Des teneurs de  $1.5.10^5$  SF/100 g sont enregistrés 3 fois dans les sédiments de Sidi Salem en février, mars et juin. Ce sont toutefois les sédiments de Lahnaya du mois d’octobre, qui enregistrent la teneur en SF la plus basse ( $1.1.10^3$  SF/100 g).



**Figure 36** : Variations spatio-temporelles des teneurs en streptocoques fécaux enregistrés dans le Golfe d'Annaba (Streptocoques fécaux ; w : eau de mer, S : sédiment, M : moule).

## 2.2 Isolement et identification des isolats potentiellement pathogènes

- **Caractérisation phénotypiques des isolats bactériens**

Des colonies bactériennes d'aspects différents sont isolées à partir des échantillons de moule, de sédiment et d'eau marine, puis observées après coloration de Gram, au microscope optique pour déterminer la morphologie et la disposition des bactéries. Des tests de l'activité catalase et oxydase sont effectués par la suite.

A partir des résultats obtenus, nous avons sélectionné et purifié 306 isolats pour des examens complémentaires.

- **Étude morphologique**

- **Caractérisation macroscopique**

L'aspect morphologique des colonies bactériennes isolées et purifiées sur les différents milieux de culture utilisés dans cette étude est représenté dans la figure 37.

### III. Résultats

#### Milieux de culture

#### Aspects des colonies

##### Gélose EMB



Petites colonies bleues-noires avec un aspect brillant vert métallisé



Grandes colonies brunâtres, muqueuses



Petites colonies ambrées, transparentes et bombées

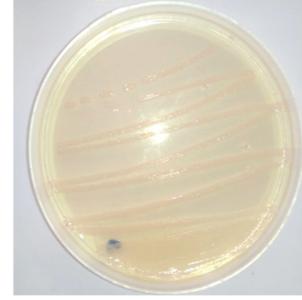
##### Gélose au CÉTRIMIDE



Colonies colorées en vert-jaune entourées d'un halo vert



Grandes colonies blanches, sèches et visqueuses



Petites colonies blanches et sèches

##### Gélose MAC CONKEY



Grandes colonies violettes, muqueuses et brillantes



Grandes colonies jaunes, bombées et brillantes



Grandes colonies jaunes-vertes, sèches et entourées d'un halo jaune



Grandes colonies à centre brunâtre, muqueuses



Petites colonies rouges, bombées et brillantes



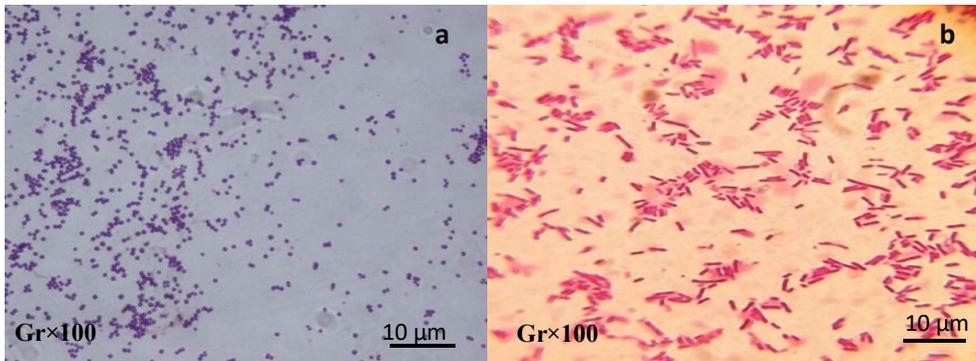
Très petites colonies jaunes et lisses



**Figure 37** : Aspects macroscopiques des colonies sur les différents milieux de cultures utilisés.

#### ➤ Caractérisation microscopique

Après coloration de Gram, l'observation microscopique montre que la majorité des isolats étudiés (87,25%) se présentent sous la forme de bacilles à Gram négatif. Les bactéries Gram positives sous formes de cocci, quant à elles, ne constituent que 12,75% du nombre total des isolats (Fig. 38).



**Figure 38** : Aspect microscopique des bactéries : a. Gram positif ; b. Gram négatif.

#### ➤ Étude biochimique

##### ✓ Test de la catalase

Ce test nous a permis de révéler une catalase positive chez tous les isolats analysés.

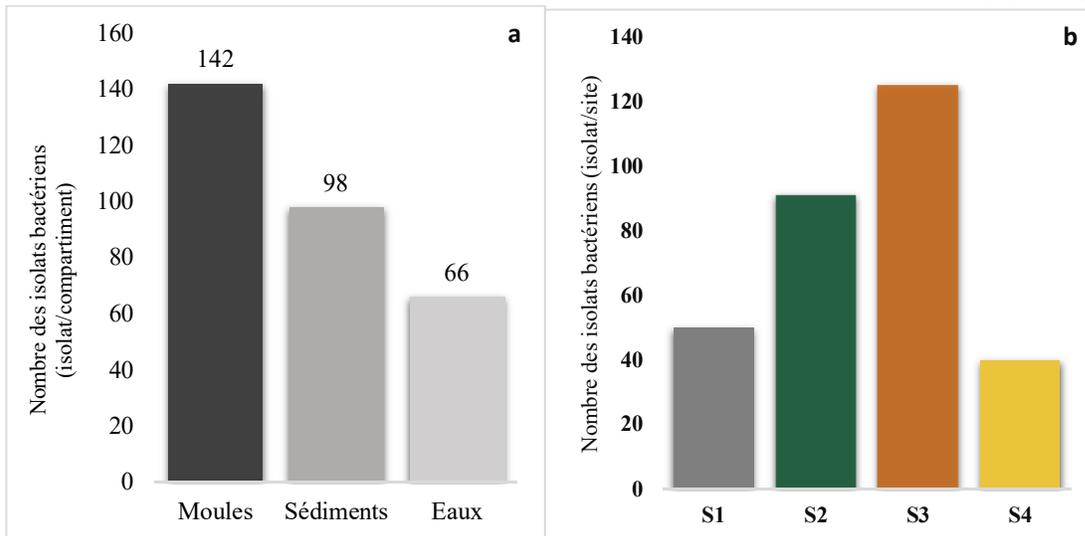
##### ✓ Test de l'oxydase

A partir des 306 isolats étudiés, 230 n'ont donné aucune réaction au test de l'oxydase ; ils présentent une oxydase négative. Les 76 isolats restants présentent une oxydase positive.

#### ➤ Répartition des isolats bactériens selon les compartiments et les sites d'échantillonnage

Pour la majorité des sites, les isolats sont retrouvés en plus grand nombre dans les moules avec 142 isolats (46.42%), suivies par les sédiments, avec 98 isolats (32.02%), puis l'eau de mer, avec 66 isolats (21.56%) (Fig. 39).

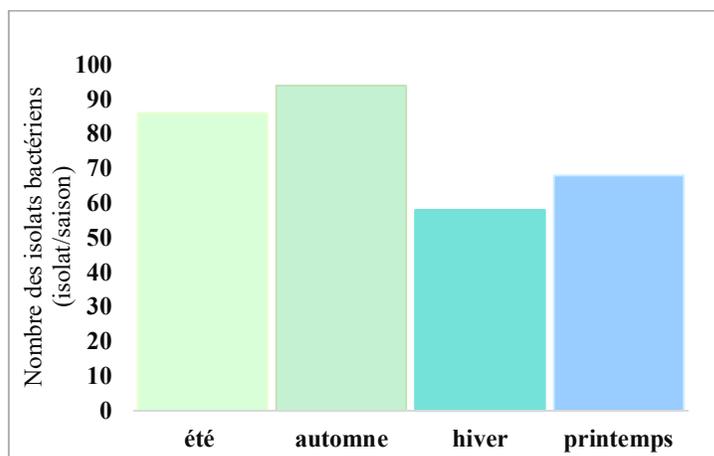
D'autres part, les résultats obtenus révèlent que Sidi Salem est le site le plus contaminé avec 125 isolats (40.85%) détectés dans l'ensemble des échantillons, suivi par Rezgui Rachid avec 91 isolats (29.73%), puis Cap de Garde et Lahnya avec 50 (16.33%) et 40 (13.09%) isolats, respectivement (Fig. 39).



**Figure 39** : Répartition des bactéries isolées dans le Golfe d'Annaba : a. Selon les échantillons étudiés ; b. Selon les sites d'échantillonnage. (S1) Cap de Garde, (S2) Rezgui Rachid, (S3) Sidi Salem, and (S4) Lahnaya.

➤ **Répartition saisonnières des isolats bactériens**

Les résultats révèlent une variation saisonnière de la diversité des isolats potentiellement pathogènes. Pour tous les échantillons, la diversité augmente pendant les mois les plus chauds de l'année (entre juin et octobre), le plus grand nombre d'isolats potentiellement pathogènes étant enregistré à l'automne, suivi de près par l'été (Fig. 40).

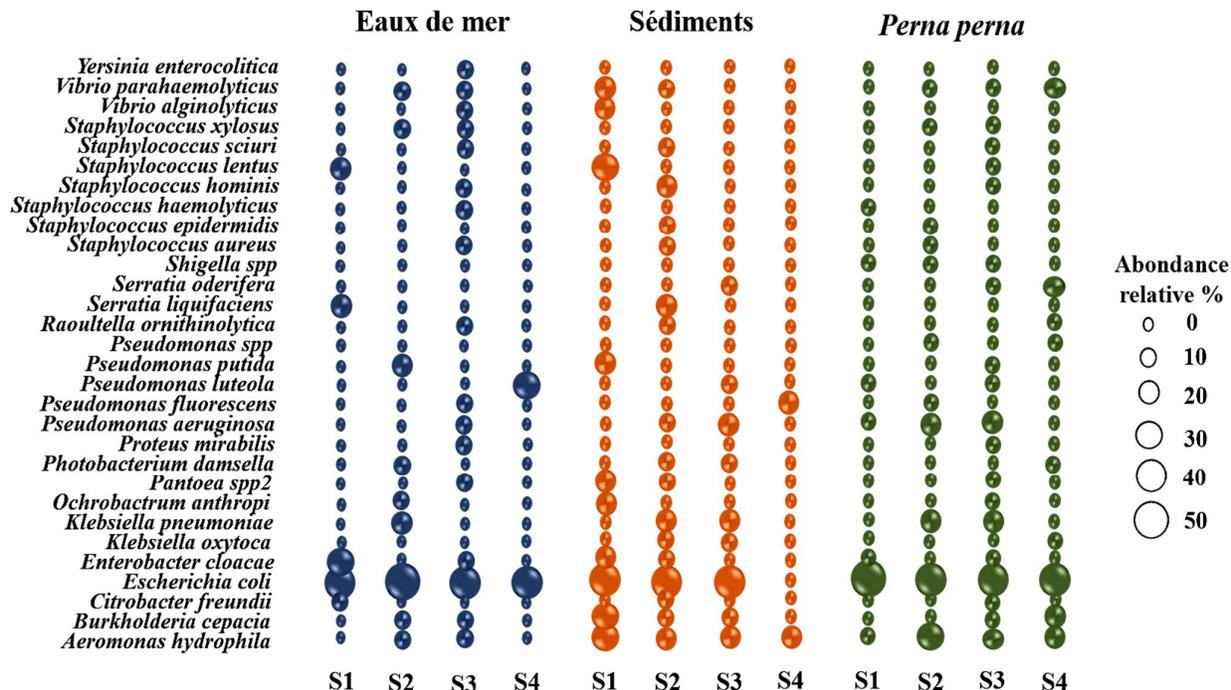


**Figure 40**: Les différences saisonnières dans la diversité des isolats potentiellement pathogènes dans les échantillons de moule, de sédiment, et de l'eau de mer.

#### ➤ Identification des isolats bactériens par galeries biochimiques (API systèmes)

Au total, 60 espèces appartenant à 27 genres sont identifiées. L'isolat le plus omniprésent et le plus abondant dans tous les échantillons environnementaux est *E. coli* (41,4%), suivie par, *Aeromonas hydrophila* (6,2%), *Klebsiella pneumoniae* (3,92%), *Pseudomonas aeruginosa* (3,59%), *Enterobacter cloacae* (3,26%), *Vibrio parahaemolyticus* (2,94%) *Burkholderia cepacia* (2,61%), *Pseudomonas luteola* (2,28%) *Staphylococcus sciuri* (1,96%), *Raoultella ornithinolytica* (1,63%), *Staphylococcus xylosus* (1,63%), *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lentus* et *Shigella spp* (1,3%), *Citrobacter freundii*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pantoea spp2*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia odorifera*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *Yersinia enterocolitica* (0,98%) et *Klebsiella oxytoca*, *Photobacterium damsella*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus epidermidis* et *Staphylococcus haemolyticus* (0.65%) (Fig. 41).

Dans la figure ci-dessous, seules les espèces identifiées dans plus de deux isolats par échantillon sont représentées. La liste complète des 306 espèces identifiées est présentée dans le tableau S1 (Annexe 3).

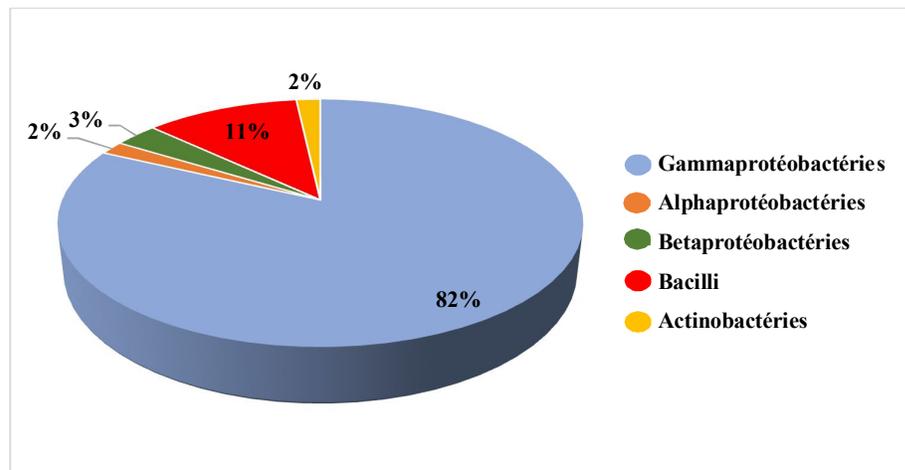


**Figure 41 :** Abondance relative des isolats potentiellement pathogènes dans l'eau de mer (bleu), les sédiments (orange), et les moules (vert). (S1) Cap de Garde, (S2) Rezgui Rachid, (S3) Sidi Salem, et (S4) Lahnaya.

### III. Résultats

L'identification des isolats provenant des quatre sites d'échantillonnage montre que, parmi les 306 isolats identifiés, 267 isolats appartiennent au phylum des Proteobacteries, dont la majorité (232 isolats) est affiliée à la classe des Gammaproteobacteries (82%) (Fig. 42). Les *Enterobacteriaceae* sont largement dominants et présentent la plus forte occurrence parmi tous les isolats potentiellement pathogènes (61,76%). Ce grand groupe bactérien est retrouvé dans tous les échantillons et sa présence est plus prononcée dans les échantillons de Rezgui Rachid et Sidi Salem (Tab. S1, Annexe 3). Les classes des Betaproteobacteries (3%) et Alphaproteobacteries (2%) contiennent 9 et 5 isolats, respectivement.

Les Firmicutes représentent le deuxième phylum le plus abondant avec 9 isolats (11%) de la classe des Bacilli, suivis par les Actinobactéries avec seulement 5 isolats (2%) (Fig.42).



**Figure 42 :** Abondance relative des isolats potentiellement pathogènes selon les classes Alphaprotéobactérie, Betaprotéobactéries, Gammaprotéobactéries, Bacilli et Actinobactéries.

### 3. Résultats des analyses statistiques

#### 3.1 Étude de la corrélation linéaire simple entre les bactéries fécales et les variables environnementales

La significativité de la corrélation entre les bactéries fécales et les variables environnementales mesurés dans les échantillons des eaux marines provenant des quatre sites est évaluée par le coefficient de corrélation linéaire simple de Spearman 'r' (non-paramétrique). Les résultats sont présentés dans le tableau 9.

### III. Résultats

- Ainsi, les streptocoques fécaux montrent une forte corrélation avec toutes les variables environnementales à l'exception du pH et des MES. On note des corrélations positives très hautement significatives avec la température et la salinité ( $p < 0.001$ ). Les valeurs des SF montrent en revanche une corrélation négative très hautement significative avec les teneurs en oxygène dissous ( $p \leq 0.0001$ ).
- Les *Escherichia coli* montrent une corrélation positive significative avec la température ( $p \leq 0,05$ ), et une corrélation négative très hautement significative avec l'oxygène dissous ( $p = 0.0010$ ).
- Les coliformes totaux montrent une corrélation positive très hautement significative avec les MES ( $p < 0.0001$ ) et une corrélation négative très significative avec l'oxygène dissous ( $p \leq 0,05$ ).
- La température montre une corrélation positive très hautement significative avec la salinité ( $p < 0.0001$ ), et une corrélation négative très hautement significative avec l'oxygène dissous ( $p < 0.0001$ ).
- L'oxygène dissous montre une corrélation négative très hautement significative avec la salinité ( $p < 0.0001$ ).
- Les résultats de l'analyse statistique, ne montrent aucune corrélation entre le pH et les différentes variables étudiées ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 9** : Matrice de corrélation de Spearman des variables de la qualité des eaux marines en 2018. OD : oxygène dissous ; Sal : salinité ; T : température de l'eau ; MES : matières en suspension ; EC : *Escherichia coli* ; CT : coliformes totaux ; et SF : streptocoques fécaux.

	T	Sal	pH	OD	MES	CT	EC
Sal	0.824***						
pH	0.181	0.185					
OD	-0.836***	-0.650***	0.008				
MES	-0.483***	-0.529***	-0.223	0.183			
CT	0.137	-0.021	0.183	-0.371**	0.565***		
EC	0.285*	0.140	0.025	-0.459**	0.507***	0.769***	
SF	0.643***	0.461***	0.119	-0.721***	-0.025	0.559***	0.453***

\* $p \leq 0.05$  ; \*\* $p \leq 0.01$  ; \*\*\* $p \leq 0.001$ .

### 3.2 Variation des variables biotiques et abiotiques dans les eaux du Golfe d'Annaba en 2018 par l'analyse en composantes principales (ACP)

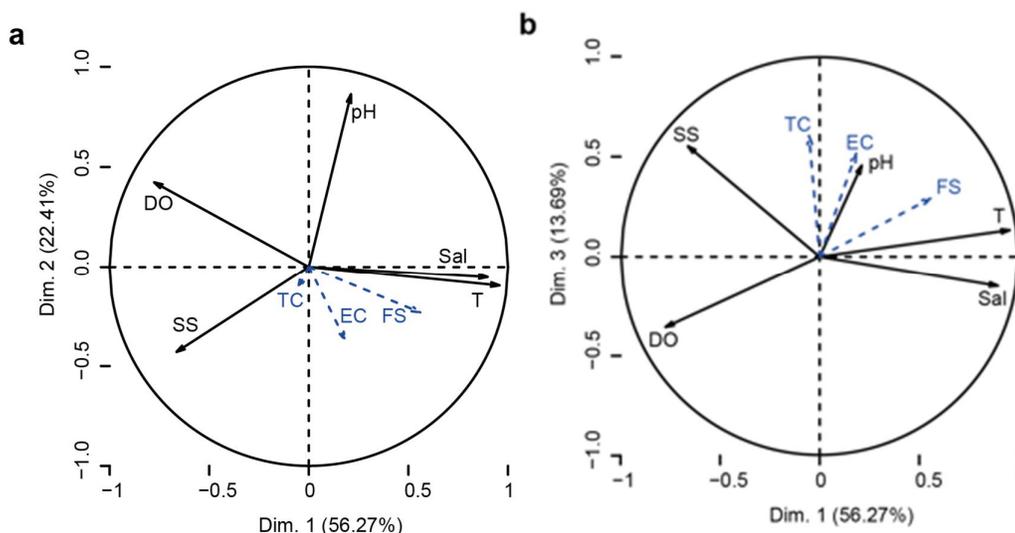
L'ACP est une méthode descriptive qui permet de représenter dans un espace bidimensionnel, les variables biotiques et abiotiques caractérisant nos sites d'échantillonnage et nos mois d'échantillonnage, en tenant compte d'un maximum de leur variabilité.

L'analyse en composantes principales (ACP) nous a permis de visualiser l'ensemble des sites et les mois d'échantillonnage en fonction des variables physico-chimiques et bactériologiques : température (T), pH, oxygène dissous (OD), salinité (Sal), matière en suspension (MES), coliformes totaux (CT), *Escherichia coli* (EC), streptocoques fécaux (SF). Ainsi, on peut déterminer si d'éventuelles structurations et ressemblances spatiales et temporelles se détachent concernant l'évolution des variables biotiques et abiotiques.

L'analyse en composantes principales (ACP) montre que les trois premiers axes principaux présentent clairement une variation inter-sites/ inter-mois, et expliquent ensemble 92,4% de l'information totale (Fig. 43).

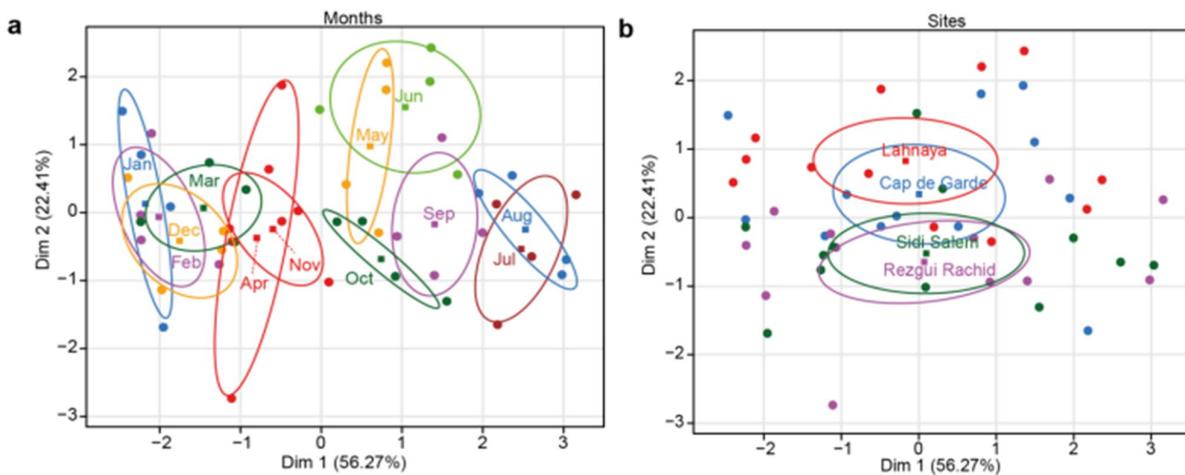
Le premier axe principal, qui représente 56,3 % de la variance totale (Fig. 43), est l'axe le plus significatif de cette dernière, il est corrélé positivement avec les variables température ( $r=0.95$  ;  $\cos^2=0.92$ ), salinité ( $r=0.89$  ;  $\cos^2=0.81$ ) et les SF ( $r=0.55$  ;  $\cos^2=0.31$ ), et corrélé négativement avec les variables OD ( $r=-0.77$  ;  $\cos^2=0.60$ ) et MES ( $r=-0.66$  ;  $\cos^2=0.44$ ). Le deuxième axe explique 22.41% de la variation totale, il est construit essentiellement par la variable pH ( $r=0,86$  ;  $\cos^2=0.74$ ).

Quant au troisième axe, il explique seulement 13.69 % de la variation totale (Fig. 45). Il est corrélé positivement avec les CT ( $r=0.61$  ;  $\cos^2=0.37$ ), les MES ( $r=0.56$  ;  $\cos^2=0.31$ ), et les EC ( $r=0.52$  ;  $\cos^2=0.27$ ).



**Figure 43** : Analyse en composantes principales (ACP) effectuée sur des données provenant d'échantillons d'eau de mer. a Corrélation des variables environnementales avec les deux premiers axes de l'ACP. b Corrélation des variables environnementales avec le premier et troisième axes de l'ACP. Les variables principales sont indiquées par des flèches pleines, et les variables supplémentaires par des flèches en pointillés. OD : oxygène dissous ; Sal : salinité ; T : température de l'eau ; MES : matières en suspension ; EC : *Escherichia coli* ; CT : coliformes totaux ; et SF : streptocoques fécaux.

En ce qui concerne la variation temporelle, l'axe 1 montre une nette différence entre le groupe des mois chauds (mai, juin, juillet, août, septembre, octobre) et les mois froids (janvier, février, mars, avril, novembre, décembre) de l'année (Fig. 44). Cette structure saisonnière s'explique par la forte corrélation positive de cet axe avec les variables température et salinité, et la forte corrélation négative avec l'oxygène dissous et les MES.



**Figure 44** : Projections des mois et des sites d'échantillonnage. a. Projection des mois d'échantillonnage sur les deux premiers axes de l'ACP. b. Projection des sites d'échantillonnage sur les deux premiers axes de l'ACP.

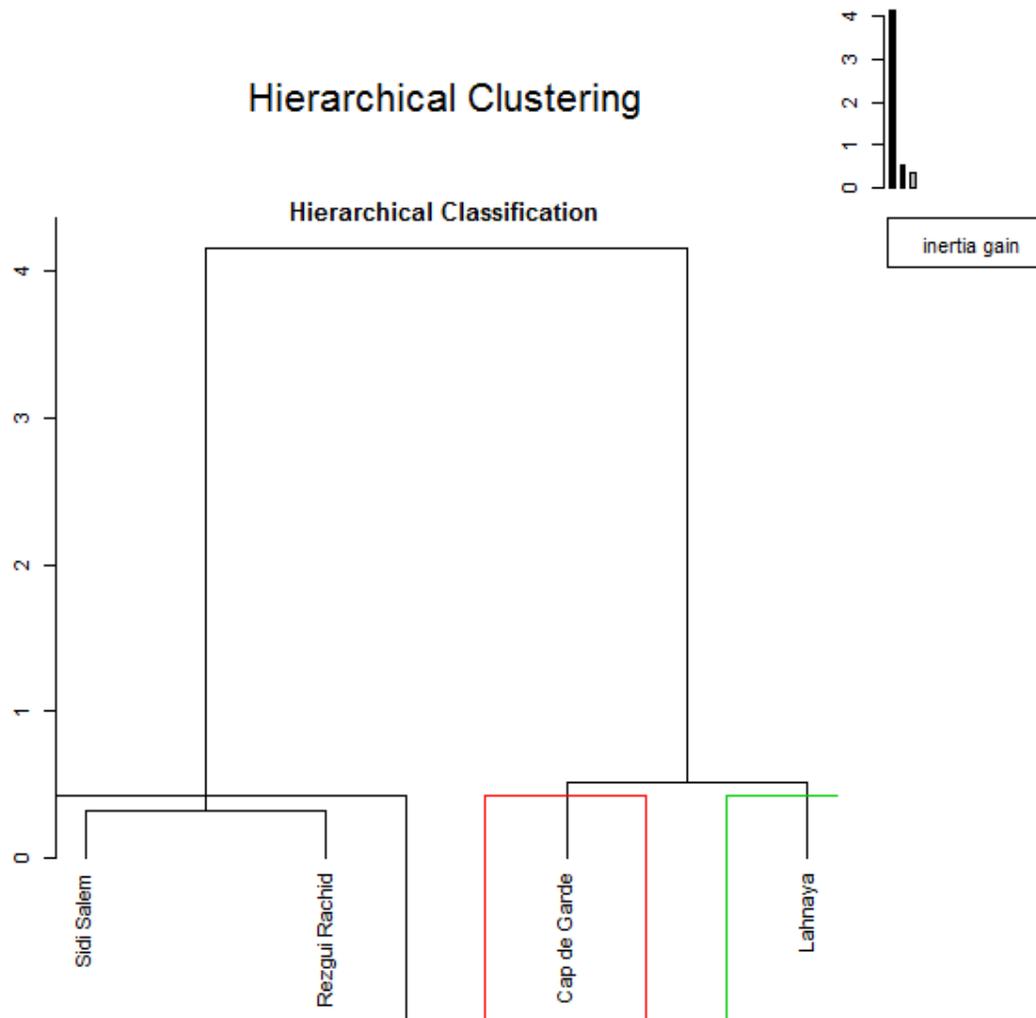
### 3.3 Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) de la variabilité inter-sites

L'analyse du dendrogramme basée sur les distances euclidiennes entre les sites d'échantillonnage, dans le Golfe d'Annaba (Fig.45), montre qu'il existe des divergences entre les quatre sites par rapport à la variation de l'ensemble des variables physico-chimiques et bactériologiques mesurés.

### III. Résultats

Nous pouvons distinguer deux groupes (clusters) plus ou moins homogènes :

- ✓ Le premier cluster regroupe les sites Sidi Salem et Rezgui Rachid qui se caractérisent par les plus fortes concentrations de bactéries fécales ;
- ✓ Le deuxième cluster regroupe les deux sites Cap de Garde et Lahmaya qui se caractérisent par les plus faibles concentrations bactériennes (Fig. 45).



**Figure 45** : Classification ascendante hiérarchique de la variabilité inter-sites selon la variation des variables biotiques et abiotiques (Golfe d'Annaba 2018).

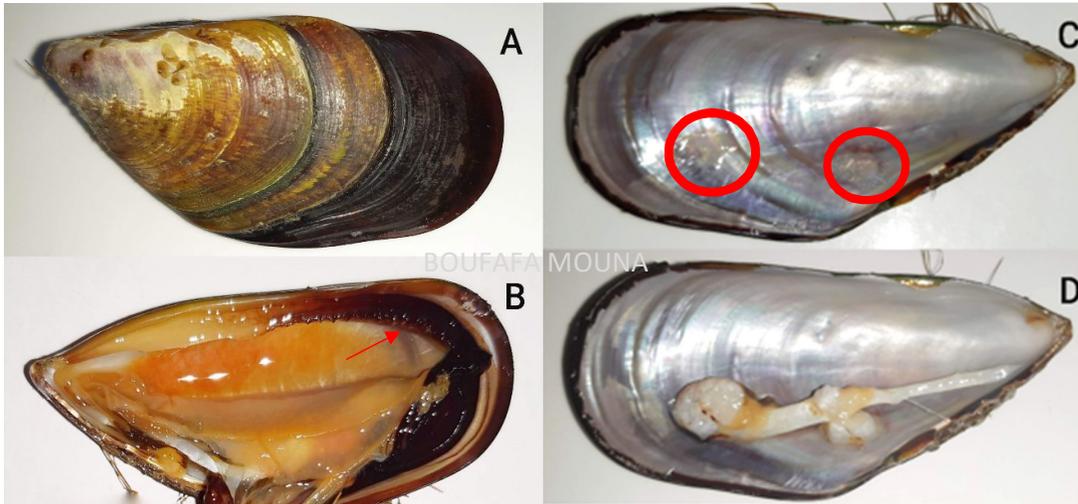
**4. Identification des moules collectées dans le Golfe d'Annaba**

**4.1 Identification morphologique**

Les caractéristiques morphologiques des moules collectées à partir des quatre sites d'échantillonnage dans le Golfe d'Annaba sont présentées dans le tableau 10. Toutes les caractéristiques principales telles que la couleur marron, la double cicatrice musculaire postérieure, l'absence de muscle adducteur antérieur confirment l'appartenance de tous les individus à l'espèce *P. perna* (Fig. 46).

**Tableau 10** : Caractéristiques morphologiques des espèces de moules *Perna perna* du Golfe d'Annaba.

<i>Caractères de diagnostic</i>	<i>Caractéristiques des espèces de moules dans Golfe d'Annaba</i>
<i>Type de la coquille</i>	Allongé, épais, ovale et équivalent
<i>Couleur de la coquille</i>	Marron/marron foncé (avec quelques zones vertes)
<i>Coque intérieure</i>	Lisse
<i>Longueur de la coquille</i>	43mm à 110 mm
<i>Largeur de la coquille</i>	20mm à 35mm
<i>Hauteur de la coque</i>	10mm à 30mm
<i>Côté antérieur</i>	Pointu, droit ou légèrement tourné vers le bas
<i>Marge ventrale</i>	Droite
<i>Marge ligamentaire dorsale</i>	Droite
<i>Manteaux</i>	Manteaux à papilles
<i>Appareil de byssus</i>	Grand et situé près de la base du pied
<i>Muscle adducteur antérieur</i>	Absent
<i>Muscles rétracteurs du byssus</i>	Une paire composée de deux faisceaux à insertion séparée contre l'adducteur postérieur
<i>Crête résiliente</i>	piquée



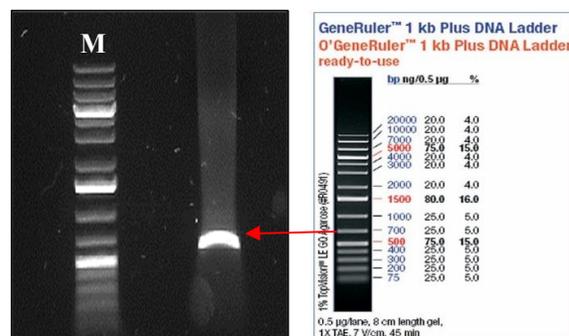
**Figure 46** : Caractéristiques morphologiques de la moule brune *Perna perna* collectée dans le Golfe d'Annaba : A. Morphologie externe de la coquille, B. Morphologie interne de la coquille : papilles lisses de la coquille et du manteau de *P. perna*, C. Cicatrices des muscles rétracteurs sur la valve gauche nettoyée : la présence de deux cicatrices de rétracteur séparées sur la coquille est indiquée, D. Muscles rétracteurs du byssus.

#### 4.2 Identification moléculaire

##### ➤ Amplification de l'ADN mitochondrial par PCR

Le gène de l'ARNr 16S d'une moule brune sélectionnée au hasard est amplifié avec succès. La migration électro-phorétique d'un fragment sur le gel d'agarose révèle la présence d'une bande au même niveau de la taille standard (M) autour de 700 pb (Fig. 47) correspondant à la taille de la région amplifiée.

Après le séquençage par la méthode Sanger, la séquence du gène de l'ARNr 16S est comparée à la base de données NCBI en utilisant le logiciel BLAST. La séquence de notre espèce révèle une identité de 100% par rapport aux séquences des autres espèces de *P. perna* dans la base de données GenBank.



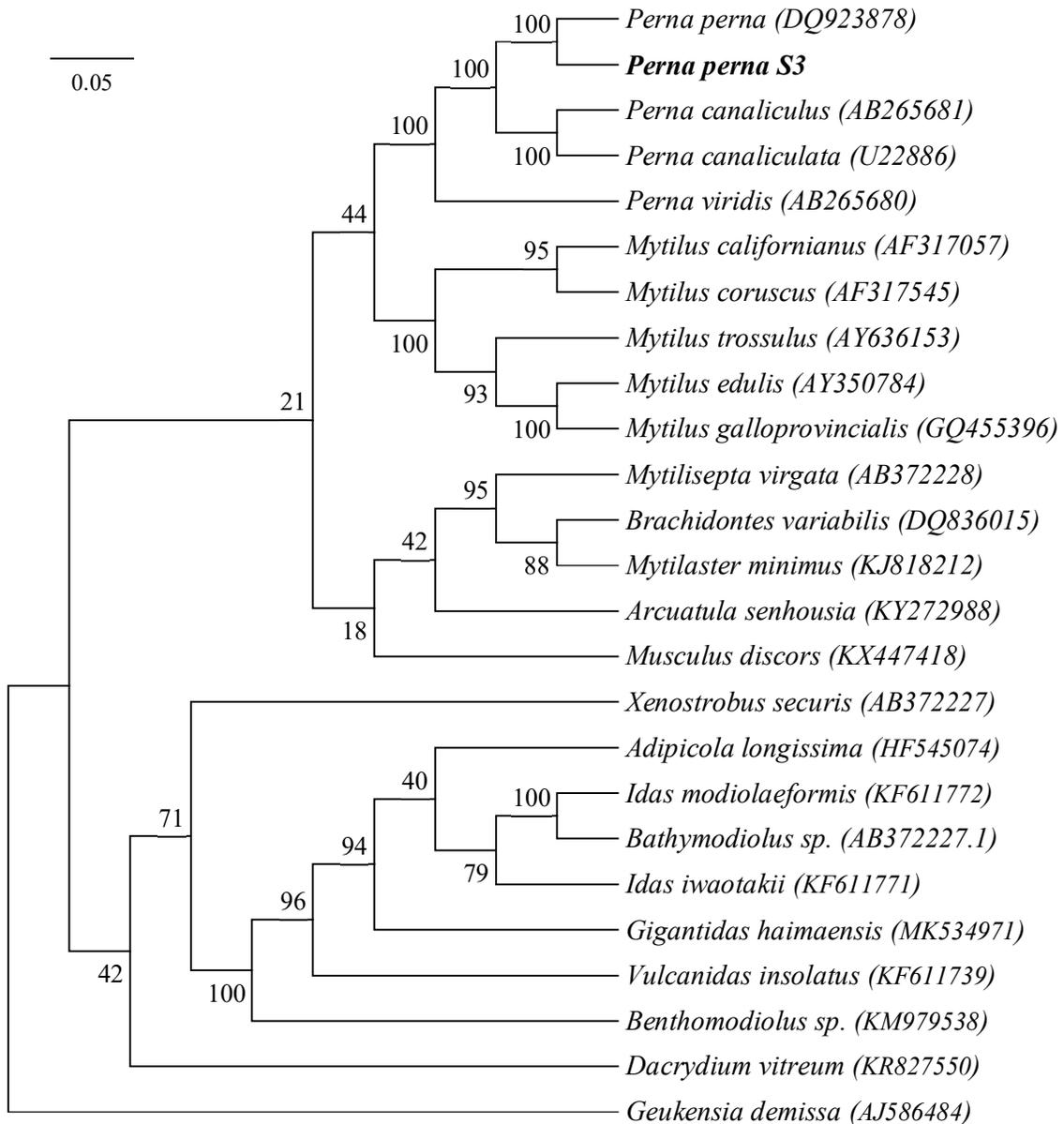
**Figure 47** : Résultat de la migration du produit de la PCR sur gel d'agarose. M : marqueur de tailles de l'ADN.

#### ➤ Construction de l'arbre phylogénétique

Afin d'étudier la position taxonomique de la moule *P. perna*, nous avons construit un arbre phylogénétique en sélectionnant 24 espèces la famille des *Mytilidae* après une analyse par le logiciel Blast de la GenBank.

L'arbre phylogénétique montre que la séquence de la moule brune isolée de Sidi Salem (***Perna perna* S3**) est placée dans le clade du genre *Perna* avec une valeur bootstrap relativement élevée (100 % bootstrap) (Fig. 48).

Notre séquence est affiliée à l'espèce *P. perna* (100% bootstrap), et se révèle plus étroitement apparenté à *P. canaliculus* qu'à *P. viridis*. En outre, et d'après nos résultats, il semble que l'espèce identifiée soit plus étroitement apparenté aux espèces de *Mytilus* que d'autres espèces représentatives des mytilidés (Fig. 48)

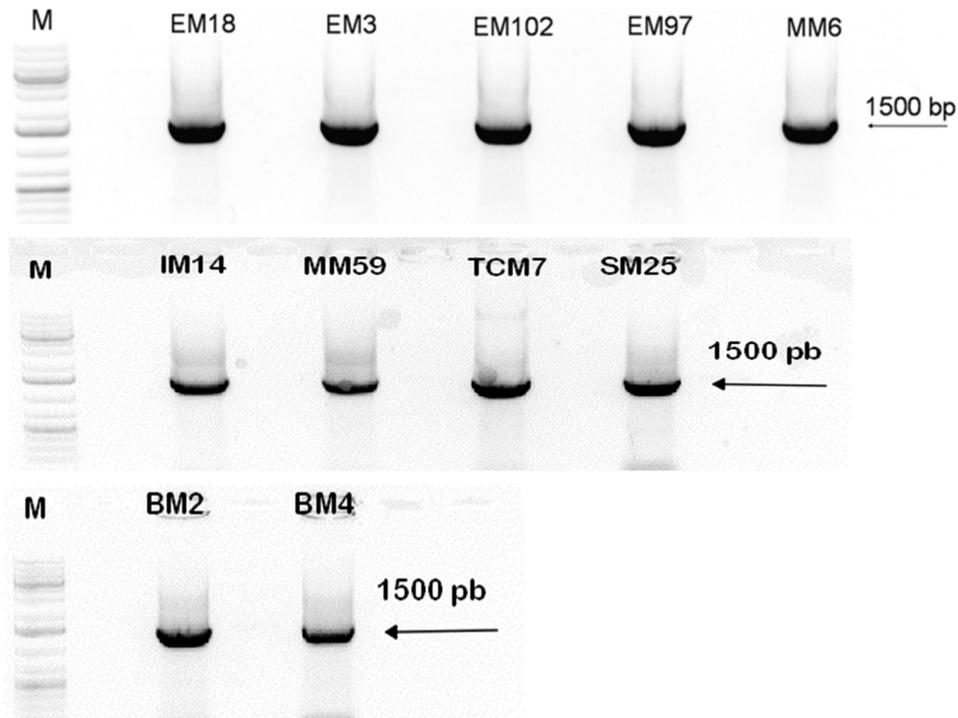


**Figure 48** : Arbre phylogénétique montrant la position taxonomique de la moule *P. perna*.

Les séquences d'ARNr 16S mitochondrial de 25 espèces de mytilidés, sont comparées par un alignement de séquences multiples Clustal X (Kumar et al. 2016). *Perna perna S3* du Golfe d'Annaba est représentée en gras. Les numéros d'accèsion des séquences représentatives sont entre parenthèses et la séquence de l'espèce *Geukensia demissa* est utilisée pour enraciner l'arbre.

#### 5. Caractérisation moléculaire des isolats bactériens isolés de la moule *P. perna*

En plus de l'identification biochimique, 25 isolats sont sélectionnés pour une identification plus poussée via leurs gènes d'ARNr 16S. Les résultats des différentes amplifications, révèlent après électrophorèse sur gel d'agarose, la présence de fragments des gènes de l'ARNr 16S de tailles attendues d'environ 1500 pb. La figure 49 présente les photos de la migration des produits PCR sur les gels d'électrophorèse.



**Figure 49** : Résultats de la migration des produits de la PCR sur gel d'agarose. M, marqueur de tailles de l'ADN ; les lignes (EM18-BM4) représentent les produits amplifiés (environ 1500 pb) des isolats bactériens.

#### ➤ Construction de l'arbre phylogénétique

Après le séquençage par la méthode Sanger, un alignement entre les séquences de l'ARNr 16S des isolats étudiés et les séquences répertoriées dans la base de données GenBank est effectué afin d'obtenir un pourcentage de similitude des souches de références avec les isolats étudiés.

Sur la base des alignements réalisés, les séquences de nos isolats montrent un pourcentage d'homologie entre 97 et 100% avec des espèces bactériennes connues (Tab. 11), ce qui permet d'identifier les isolats analysés.

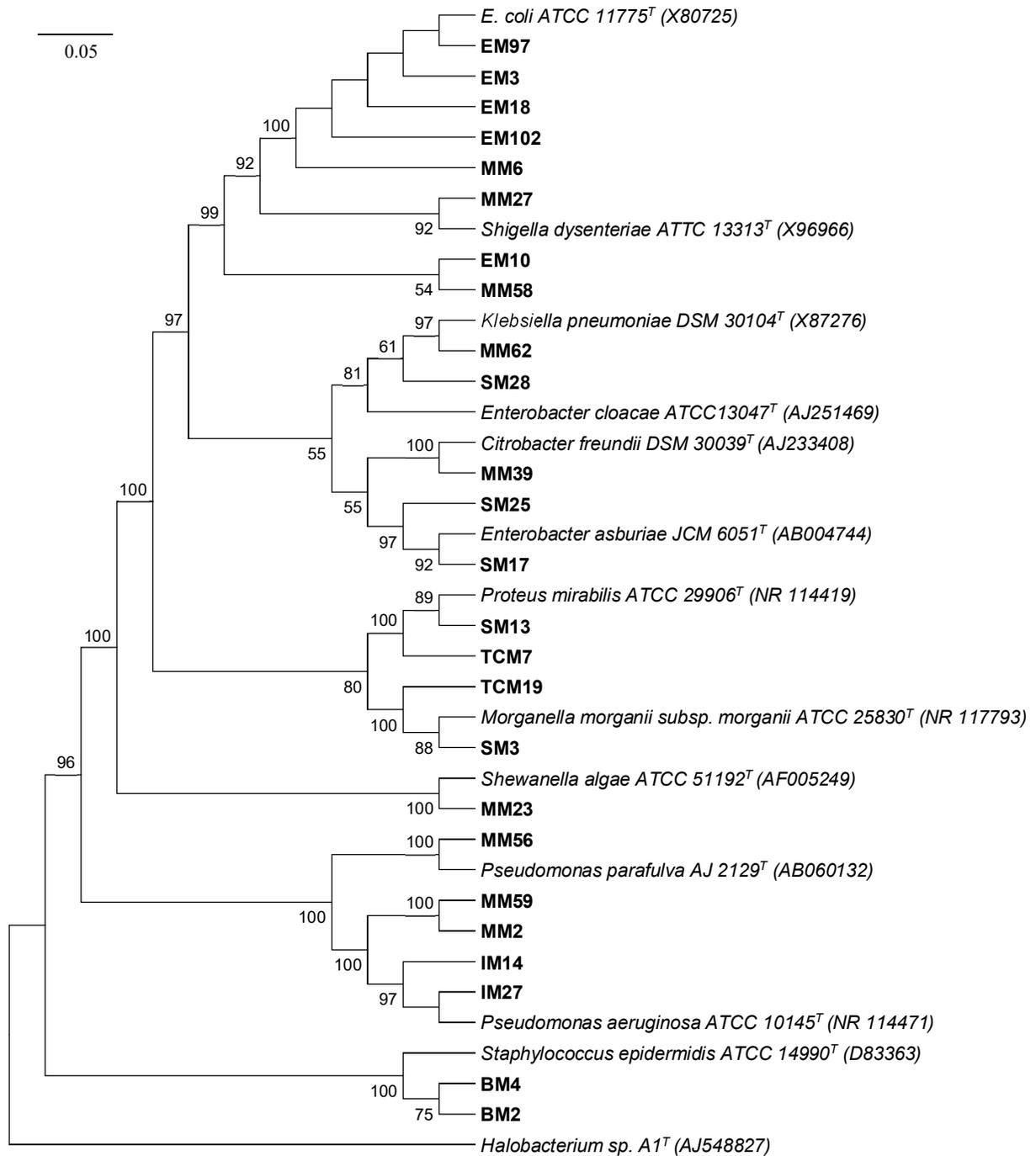
**Tableau 11** : Analyse des résultats du séquençage partiel des gènes de l'ARNr 16S par BLAST.

<b>Codes</b>	<b>Identification BLAST</b>	<b>Identité % (BLAST)</b>
<b>EM97</b>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup> (X80725)	100%
<b>EM102</b>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup> (X80725)	100%
<b>EM3</b>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup> (X80725)	100%
<b>MM6</b>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup> (X80725)	100%
<b>EM18</b>	<i>E. coli</i> ATCC 11775 <sup>T</sup> (X80725)	100%
<b>EM10</b>	<i>E. coli</i> (HG941666)	98%
<b>EM18</b>	<i>E. coli</i> (AB604197)	99%
<b>MM58</b>	<i>E. coli</i> (MW692366)	99%
<b>MM23</b>	<i>Shewanella algae</i> (MF540533)	98%
<b>SM12</b>	<i>Proteus mirabilis</i> (LN558635)	99%
<b>TCM7</b>	<i>Proteus mirabilis</i> (MN620383)	99%
<b>BM4</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990 <sup>T</sup> (D83363)	100%
<b>BM2</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (CP040883)	99%
<b>SM3</b>	<i>Morganella morganii</i> (CP064827)	99%
<b>MM27</b>	<i>E. coli</i> (CP027452)	97%
<b>MM23</b>	<i>Shewanella algae</i> ATCC 51192 <sup>T</sup> (AF005249)	100%
<b>MM56</b>	<i>Pseudomonas parafulva</i> AJ 2129 <sup>T</sup> (AB060132)	100%
<b>IM27</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 <sup>T</sup> (NR 114471)	100%
<b>MM39</b>	<i>Citrobacter freundii</i> DSM 30039 <sup>T</sup> (AJ233408)	100%
<b>MM59</b>	<i>Pseudomonas</i> sp. (JQ951926)	98%
<b>MM2</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (KF976394)	98%
<b>SM17</b>	<i>Enterobacter asburiae</i> JCM 6051 <sup>T</sup> (AB004744)	100%
<b>MM62</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 30104 <sup>T</sup> (X87276)	100%
<b>SM28</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> (MT613362)	99%
<b>IM14</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145 <sup>T</sup> (NR 114471)	100%
<b>SM25</b>	<i>Enterobacter asburiae</i> (MK641844)	99%

L'Analyse phylogénétique basée sur les séquences du gène de l'ARNr 16S générée selon la méthode Neighbor-Joining est réalisée afin de visualiser la position évolutive de nos isolats environnementaux par rapport à leurs plus proches espèces étudiées (Fig. 50).

### III. Résultats

Un clade principal, avec une valeur bootstrap élevée (100% bootstrap) regroupe 23 isolats du phylum des proteobactéries avec 18 isolats appartenant à sept genres différents au sein de la famille des *Enterobacteriaceae* ; à savoir *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus* et *Morganella*. Les staphylocoques sont représentés que par deux isolats (BM2 et BS4) proches de la souche type *S. epidermidis* ATCC 10145<sup>T</sup> (100% bootstrap) (Fig. 50). Les séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats bactériens sont présentées dans l'annexe 4.

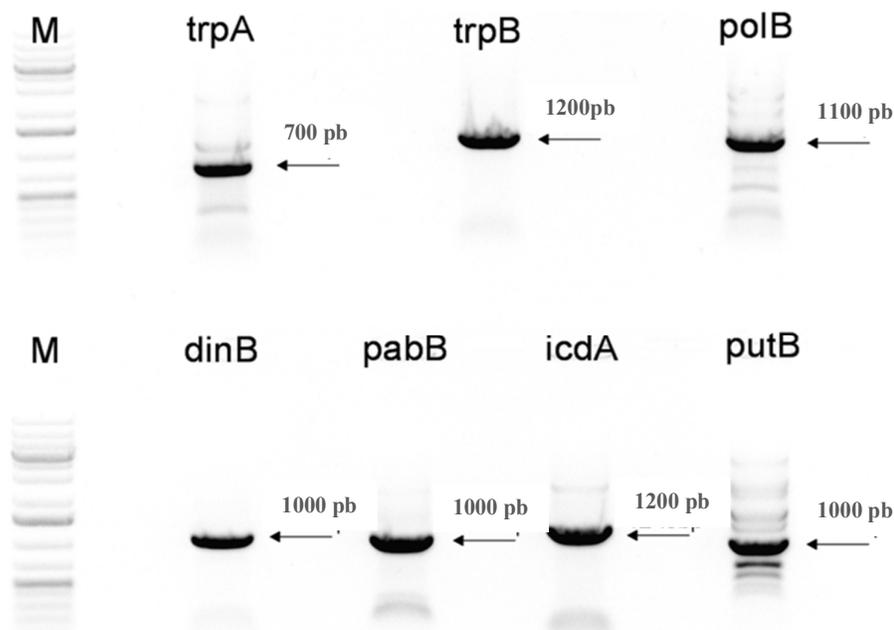


**Figure 50** : Phylogénie des 25 isolats avec identification moléculaire. Les séquences d'ARNr 16S des 25 isolats sélectionnés, ainsi que le meilleur résultat de la base de données GenBank pour chacune des séquences, sont comparés dans un alignement de séquences multiples Clustal X (Kumar *et al.* 2016). Les numéros d'accès des séquences de référence sont entre parenthèses, et *Halobacterium* sp. A1<sup>T</sup> est utilisée pour enracer l'arbre.

#### 6. Analyse de typage des séquences multilocus (MLST)

*E. coli* représente plus de 40 % des isolats, et plusieurs isolats individuels de cette espèce provenaient du même contexte environnemental (c'est-à-dire du même site d'échantillonnage, de la même date d'échantillonnage et du même compartiment environnemental : la moule). Nous nous sommes donc demandé si ces isolats d'*E. coli* étaient issus de plusieurs sources de contamination distinctes ou s'ils étaient attribués à une seule souche d'*E. coli* très abondante, capable de se développer et de dominer les autres bactéries dans des conditions données.

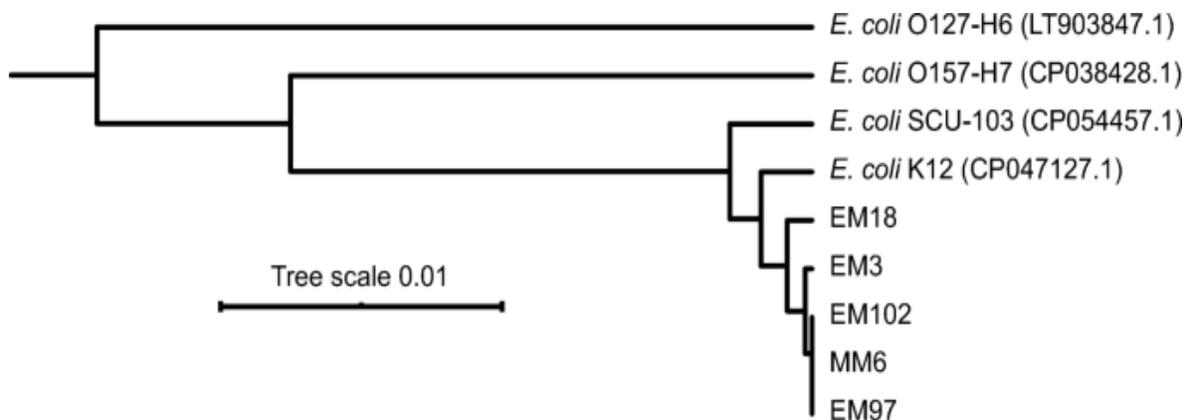
Pour vérifier si les cinq isolats (EM3, EM18, EM97, EM102 et MM6) obtenus à partir des moules *P. perna* isolées de Sidi Salem à la même date d'échantillonnage (15 janvier 2018) appartenaient à la même souche d'*E. coli*, nous avons amplifié par PCR (Fig. 51) et séquencé par la méthode Sanger des séquences de sept gènes conservés (*trpA*, *trpB*, *dinB*, *polB*, *putP*, *pabB* et *icdA*).



**Figure 51** : Amplification par PCR de sept gènes d'*E. coli* EM97. Les bandes des gènes *trpA* à *putB* représentent les produits PCR amplifiés à partir de l'isolat EM97 (*E. coli*). M, échelle d'ADN.

### III. Résultats

Un arbre phylogénétique basé sur un alignement multiple des séquences concaténées de nos cinq souches (et des séquences de gènes équivalentes d'autres souches d'*E. coli*) révèle que nos isolats sont similaires mais pas identiques, et elles ne proviennent donc probablement pas d'une seule source de contamination. Cependant, les isolats sont étroitement liés les uns aux autres, et un peu plus éloignés des souches d'*E. coli* K12 et SCU-103 (Fig. 52).



**Figure 52** : Arbre phylogénétique montrant les distances entre les cinq isolats d'*E. coli* analysés de S3, comparés aux souches d'*E. coli* de la base de données NCBI (numéros d'accès entre parenthèses). L'arbre a été enraciné en utilisant *Salmonella enterica*.

Dans l'ensemble, la plupart (18/25) des résultats de l'identification de la séquence du gène de l'ARNr 16S au niveau du genre correspondent à l'identification du genre à l'aide des tests API (Tab.12). En plus de l'identification biochimique et moléculaire par le séquençage du gène de l'ARNr 16S, les résultats du MLST confirment que les 5 isolats de *Perna perna* appartiennent à l'espèce *E. coli*.

### III. Résultats

**Tableau 12** : Résultats de la comparaison entre l'identification biochimique par API système et l'identification moléculaire de 25 isolats isolés de *P. perna* / : Non analysé.

<b>Codes des isolats</b>	<b>Identification par Api système</b>	<b>Résultats du séquençage des gènes de l'ARNr 16S</b>	<b>Identification par MLST</b>
<b>EM3</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>MM6</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EM97</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EM102</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EM18</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EM10</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NA
<b>MM58</b>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	NA
<b>TCM7</b>	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	NA
<b>MM59</b>	<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA
<b>SM25</b>	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	NA
<b>SM28</b>	<i>Enterobacter cloacea</i>	<i>Enterobacter cloacea</i>	NA
<b>MM62</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NA
<b>SM3</b>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i>	NA
<b>TCM19</b>	<i>Ochromobacter anthropi</i>	<i>Morganella morganii</i>	NA
<b>IM14</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA
<b>MM56</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas parafulva</i>	NA
<b>IM27</b>	<i>Pseudomonas luteola</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA
<b>MM2</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NA
<b>SM13</b>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	NA
<b>MM39</b>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	NA
<b>MM23</b>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shewanella algae</i>	NA
<b>SM17</b>	<i>Serratia odorifera</i>	<i>Enterobacter asburiae</i>	NA
<b>MM27</b>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Shigella dysenteriae</i>	NA
<b>BM2</b>	<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NA
<b>BM4</b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	NA



## ***IV. DISCUSSION***

### **1. Analyses des variables physico-chimiques des eaux du Golfe d'Annaba**

La mesure des variables physico-chimiques de l'eau, montre que la température, la salinité, le pH, l'oxygène dissous, et les matières en suspension présentent des fluctuations saisonnières dans l'ensemble des sites dans le Golfe d'Annaba.

La température reste un facteur écologique qui conditionne la répartition des organismes aquatiques. En effet, c'est une variable qui revêt une importance capitale en raison de son effet direct sur l'activité métabolique des organismes, et de son impact sur leur répartition bio-géographique suite aux modifications des facteurs écologiques du milieu (*Rodier et al. 2009*).

Les variations de la température de l'eau sont assez similaires dans les sites étudiés. La valeur la plus élevée est relevée au mois d'aout à Rezgui Rachid, alors que la plus faible est enregistrée au mois de janvier à Lahnaya. Les fluctuations de cette variable abiotique sont en relation avec les conditions climatiques locales et plus particulièrement avec la température de l'air (*Rodier et al. 2009*).

La salinité est définie conventionnellement comme la masse des sels contenue dans 1 kg d'eau de mer. Elle conditionne la répartition et la dynamique des espèces (*Pasquaud 2006*). Les valeurs obtenues durant la période de notre étude sont compatibles avec celles observées en mer Méditerranée et avec les valeurs mesurées habituellement sur les côtes algériennes (*Kerdoussi 2010 ; Hidouci et al. 2014 ; Kadri et al. 2015,2017*).

Les fortes salinités de l'eau enregistrées au mois d'aout au niveau des deux sites, Rezgui Rachid et Sidi Salem (41,6 g/L), pourraient s'expliquer par l'action combinée des fortes températures engendrant de fortes évaporations et la baisse des précipitations à l'origine de la baisse des apports en eau douce. En effet, les faibles teneurs sont relevées en mars à Sidi Salem (34,9 g/L) et en février (35,8g/L) au Cap de Garde, ceci peut s'expliquer par le phénomène de dilution des eaux engendré par les apports en eau douce ayant pour origine les précipitations et la faible évaporation de l'eau (*Kerdoussi 2010*).

Le potentiel d'hydrogène, qui correspond au logarithme décimal de l'inverse de sa concentration en ions d'hydrogène (H<sup>+</sup>), est inférieur ou supérieur à 7 suivant que l'eau est acide ou basique (*Rodier et al. 2009*). Les variations de cette variable suivent celles des autres variables abiotiques comme la température, la salinité, et l'oxygène dissous (*Benmessaoud 2007*).

#### ***IV. Discussion***

Le pH des eaux du littoral est alcalin car il oscille entre 7.3 et 8.9. Selon Blinda (2007), des pH compris entre 5 et 9 permettent un développement normal de la faune et de la flore. Les fluctuations de cette variable pourraient s'expliquer par les composés contenus dans les rejets industriels et urbains et les apports des Oueds Seybouse et Bejima (Kadri et al. 2015).

L'oxygène dissous dans les eaux de surface, provient essentiellement de l'atmosphère et de l'activité photosynthétique des algues et des plantes aquatiques. Sa concentration varie de manière journalière et saisonnière car elle dépend de nombreux facteurs ; tels que la pression partielle en oxygène de l'atmosphère, la température de l'eau, la salinité, la pénétration de la lumière, l'agitation de l'eau et la disponibilité en nutriments. L'oxygène dissous est l'une des variables particulièrement utile pour l'eau et constitue un excellent indicateur de sa qualité. Sa valeur nous renseigne sur le degré de pollution et par conséquent sur le degré de l'auto-épuration des eaux de mer (Rodier et al. 2009).

La forte oxygénation des eaux du Golfe est révélée en saison froide, elle est essentiellement due à la baisse de la température de l'eau et aux fortes vitesses des vents qui engendrent un brassage continu de la masse d'eau et par conséquent un enrichissement de la phase dissoute en oxygène dissous pendant la saison hivernale (Hébert et Légaré 2000).

Les faibles teneurs de cette variable observées en saison sèche, indiquent la présence d'une activité bactérienne consommatrice de l'oxygène dissous ainsi que la diminution de la capacité d'auto-épuration des eaux (Rodier et al. 2009).

Quant aux matières en suspensions (MES), leurs concentrations sont élevées en hiver, avec 0,42 mg/L à Rezgui Rachid et à Sidi Salem, et basses en été (0.08-0.12 mg/L) dans pratiquement l'ensemble des sites. D'après Kerdoussi (2010), ces fluctuations semblent être en relation avec les conditions climatiques et plus particulièrement l'abondance des précipitations à cette période de l'année qui sont à l'origine de lessivage des sols et d'importants apports allochtones.

### 2. Analyses bactériologiques des eaux du Golfe d'Annaba

Les résultats de cette étude révèlent une augmentation significative de la contamination fécale dans le Golfe d'Annaba par rapport aux études précédentes menées dans la même zone (*Hidouci et al, 2014, Kadri et al, 2015, 2017*), et dans d'autres régions côtières de la mer Méditerranée (*Boutaib et al, 2015 ; Dallarés al. 2018 ; Rincé et al, 2018*). Une grande partie de cette différence est probablement due à la pression continue de la pollution dans le Golfe, liée principalement aux activités anthropiques, ainsi qu'à l'urbanisation rapide enregistrée au cours de ces dernières années. Selon Inal et al. (*2018*), plus de 40% de la population algérienne (plus de 19 millions de personnes) vit le long du littoral ou sont localisées les plus grandes villes et les plus peuplées dont Annaba, avec plus de 600 mille habitants (<https://www.enpopulationdata.net/countries/algeria>). Cette densité de population est à l'origine d'une pollution domestique qui n'est plus à démontrer tellement les rejets sont visibles à tous les niveaux. Dans la présente étude, nous avons identifié les sites les plus pollués et les sources locales de pollution dans chaque site.

- **Sidi Salem**

La forte présence de bactéries fécales à Sidi Salem fait suite à d'importants rejets urbains, industriels et agricoles que Oued Seybouse draine de son bassin versant d'environ 6470 km<sup>2</sup> (Fig. 16 , Fig. 53) (*ABH-CSM 1999-2000 ; Mebarki 2000*). Parallèlement, un autre Oued (Oued Bedjima) draine les eaux usées non traitées d'une grande partie de la ville d'Annaba et de sa périphérie et qui sont déversées directement dans la mer au niveau de S3. Ces sources de contamination s'ajouteraient à la contamination naturelle provenant d'une importante colonie d'oiseaux et d'animaux domestiques (Fig. 53) (*Telailia 2014*).



**Figure 53** : Principales sources de pollution à Sidi Salem. a. source de pollution animale (animaux domestiques et oiseaux). b. rejet direct des eaux usées. c. Oued Sybouse.

- **Rezgui Rachid**

Nos résultats démontrent également que la contamination globale était exceptionnellement élevée à Rezgui Rachid (S2), et par conséquent rendant cette plage dangereuse pour la baignade, conformément aux décrets exécutifs algériens sur les eaux de baignade (*JORA 1993, 2006*). Tout comme Sidi Salem, les niveaux élevés des taux de bactéries fécales sont principalement dus aux eaux usées domestiques provenant des habitations voisines, et qui sont déversées directement dans la mer sans traitement préalable, ainsi qu'à la présence d'une importante colonie d'oiseaux marins présente de façon permanente dans ce site (Fig.54) (*Kadri et al. 2017*).

Il est important de souligner l'afflux d'estivants dans cette plage et qui en fait l'endroit le plus fréquenté en été, ce qui explique l'augmentation des niveaux de contamination fécale en cette période de l'année (Fig. 54).



**Figure 54** : Principales sources de pollution à Rezgui Rachid. A. Rejet direct des déchets liquides et solides, b. source de pollution animale par les oiseaux .c. source de pollution humaine par les baigneurs.

- **Cap de Garde et Lahnaya**

Les concentrations les plus faibles observées au Cap de Garde (S1) et surtout à Lahnaya (S4) sont probablement dues à leur éloignement des zones urbaines, ainsi qu'au fort hydrodynamisme qui caractérise ces deux sites, et qui contribue à la dispersion des polluants fécaux dans la colonne d'eau (*Kadri et al. 2015*). En effet ces deux sites (S1 et S4) sont sous l'influence de vents nord-ouest dominants, induisant un hydrodynamisme important qui favorisent le mélange des eaux des côtes du Golfe avec les eaux de la haute mer moins contaminée.

## IV. Discussion

En revanche, S2 et S3 sont caractérisées par des conditions hydrodynamiques relativement faibles et des tourbillons plus lents (Hafsaoui et al. 2016 ; Ouali et al. 2018). Il est important de noter que S1 et S4 sont souvent fréquentés par des baigneurs en été (tout comme S2), ce qui explique l'augmentation des niveaux de bactéries fécales pendant cette période de l'année (Kadri et al. 2017). Aussi, les rejets domestiques provenant des stations touristiques situées le long de la côte, l'absence de stations d'épuration, la présence des animaux domestiques, ainsi que le manque de civisme des estivants sont autant de facteurs qui contribuent à accentuer les niveaux de la pollution des eaux marines (Fig. 55) (Torres-Bejarano et al. 2018).



**Figure 55** : Principales sources de pollution : a. au Cap de Garde (source de pollution animale).b. à Lahnaya (rejets des déchets solides et liquides : photo prise par l'assotiatin Green Bike en 2018).

Selon plusieurs études, la contamination fécale des plages de baignade peut être dangereuse pour l'homme, car de nombreuses bactéries pathogènes peuvent être ingérées lors d'activités aquatiques récréatives, entraînant diverses maladies d'origine hydrique (Santhiya et al. 2011 ; Arnold et al. 2016). Les autorités doivent donc développer des solutions pour minimiser les risques liés à l'utilisation d'eaux récréatives contaminées, telles que l'installation de stations d'épuration des eaux usées, et l'amélioration de la sensibilisation du public et le développement de mesures de contrôle au moyen de critères de qualité (Kacar et Omuzbuken 2017).

### 2.1 La contamination fécale de la moule *Perna perna*

Les données obtenues montrent que les niveaux de bactéries fécales sont encore plus élevés dans *P. perna* que dans les sédiments et les eaux de mer environnantes pendant presque toute la période d'étude. Ceci est cohérent avec les rapports d'autres régions côtières dans le monde, suggérant que cette forte capacité d'accumulation est principalement liée à la capacité de filtration de ces organismes sentinelles, qui en font l'un des meilleurs bio-indicateurs de la pollution fécale

des eaux côtières, même lorsque les polluants sont de faibles concentrations (*Jayme et al. 2016 ; Bozcal et Dagdeviren 2020*).

Les niveaux des indicateurs fécaux dans tous les sites d'échantillonnage sont bien supérieurs aux limites tolérées selon le règlement (854/2004/CE) du 29 avril 2014 pour la consommation humaine, qui recommande moins de 230 *E. coli*/100g. De ce fait, nous pouvons classer le Cap de Garde et Lahnya comme zones de productions de la classe C et Sidi Salem et Rezgui Rachid comme zone de production de la classe D. Ainsi, les moules récoltées dans le Golfe d'Annaba seraient impropres à la consommation directe.

Les streptocoques fécaux (SF) dénombrés dans les échantillons de moules, présentent des concentrations supérieures à celles d'*E. coli*, ce qui est également en accord avec des rapports précédents (*Zegmout et al. 2011 ; Kadri et al. 2017 ; Islam et al. 2017*). Ces bactéries sont connues pour avoir une plus longue période de survie dans les eaux de surface et dans le tube digestif des bivalves que les coliformes thermo-tolérants (*Noble et al. 2004*). Leur présence continue à des niveaux très élevés dans les moules, peut s'expliquer par leur grande résistance aux conditions environnementales, et par conséquent ils témoignent d'une possible contamination ancienne (*Noble et al. 2004*). De nombreux auteurs rapportent que les concentrations de SF sont faiblement influencées par les changements de pH et de la salinité (*Bennani et al. 2012 ; Chigbu et al. 2005 ; Garrido-Perrez et al. 2008*).

Ces observations corroborent nos résultats, lesquels révèlent des concentrations de SF très importantes au Cap de Garde et à Lahnya où la salinité est la plus élevée, contrairement à Sidi Salem où la salinité est la plus faible.

### 2.2 La contamination fécale dans le sédiment

L'analyse bactériologique des sédiments dans le Golfe d'Annaba, fait apparaître des contaminations très importantes par les bactéries fécales durant toute la période d'étude. Les charges bactériennes dans la couche superficielle des sédiments sont comparables à celles relevées dans les moules. D'autre part, les résultats des dénombrements des populations bactériennes révèlent que les sédiments sont relativement plus chargés que l'eau de mer.

Cette différence de concentration pourrait s'expliquer par une dilution importante des contaminants fécaux à l'intérieur de la colonne d'eau et reflète ainsi la survie de ces bactéries dans les sédiments, ce qui serait conséquent à de fortes concentrations en matières organiques issues des eaux usées non traitées (*Omrane et al. 2009*).

## ***IV. Discussion***

Les sédiments représentent donc un réservoir important pour l'accumulation des bactéries fécales. Nos résultats sont en accord avec plusieurs études qui montrent que la matière organique est un facteur contribuant à la persistance et à la survie prolongée de ces indicateurs dans les sédiments (*Haller et al. 2009 ; Pote et al. 2009 ; Malham et al. 2014 ; Perkins et al. 2014*).

Il est bien démontré que l'association des bactéries avec les sédiments contourne les effets négatifs des stress environnementaux, comme la protection contre la lumière UV, ce qui a pour effet d'augmenter la survie des bactéries indicatrices (*Zimmer -Faust et al. 2017*). Les bactéries fécales se protègent des prédateurs en ce fixant sur les argiles et se nourrissent des éléments organiques et minéraux présents en abondance.

Durant le mois de mai, la pollution fécale est importante dans les sédiments des sites du Golfe, ce qui laisse supposer que la dynamique de ces bactéries est très probablement liée à la température des sédiments suite au réchauffement de la partie superficielle du sédiment : une croissance bactérienne est alors possible. Selon Rozen et Belkin (*2001*), la survie des bactéries fécales serait sous l'influence de la température. Par contre, leur concentration plus ou moins importante durant les mois de janvier, février et avril serait due aux apports des rejets urbains drainés par les fortes pluies.

### **3. Influence des variables environnementales sur la survie des indicateurs fécaux**

Outre les activités anthropiques, la persistance des bactéries fécales est également influencée par une multitude de variables naturelles, parmi lesquelles les variations saisonnières de la température. En effet, le dénombrement des bactéries indicatrices suit un gradient en rapport direct avec la température : des concentrations bactériennes très importantes pendant les mois les plus chauds de l'année (entre juin et octobre) et ce au niveau des trois compartiments analysés.

Parallèlement à la température, la physiologie de *P. perna*, organisme marin sessile, semble être un facteur déterminant des niveaux élevés de bactéries fécales. Burge et al (*2016*), indiquent que les températures élevées favorisent une augmentation des taux de filtration des moules et, par conséquent, une rétention plus importante de micro-organismes des eaux environnantes.

Selon le cinquième rapport d'évaluation du Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) (*2013*), l'Algérie connaîtra une augmentation des températures entre 1 ° C et 3,7 ° C au cours des prochaines années. Aussi, le réchauffement climatique annoncé favoriserait la survie des bactéries fécales et leur persistance dans l'eau (*Barreras et al. 2019*).

## IV. Discussion

Cette hypothèse est corroborée par nos résultats des corrélations significatives et positives entre *E. coli*, les SF, et la température d'après le test de corrélation de Spearman ( $p < 0,05$ ) d'une part, et suite à l'analyse de l'ACP d'autre part, ce qui est en accord avec d'autres études (*Gutiérrez-Cacciabue et al 2014 ; Abia et al 2015, Islam et al. 2017*).

En plus des fortes températures, l'été amène également un grand nombre d'estivants sur les plages, accentuant ainsi les niveaux de contamination fécale. De plus, la présence des bactéries fécales est affectée par les schémas hydrodynamiques locaux, qui sont plus calmes pendant l'été, réduisant ainsi la dispersion des bactéries fécales dans la colonne d'eau (*Lacaze 1996*).

D'après nos résultats, seuls les SF ont montré une corrélation positive significative ( $p < 0,001$ ) avec la salinité (Tab.9). Ces bactéries, connues pour leur haute résistance aux agresseurs environnementaux sévères et leur tolérance aux fortes concentrations de sel, en font de puissants indicateurs de contamination fécale dans l'eau de mer (*Byappanahalli et al. 2012*).

À l'inverse, l'oxygène dissous montre des corrélations négatives très hautement significatives avec tous les groupes de bactéries fécales (Tab. 9), principalement en raison de la dégradation bactérienne de détritux, activité qui consomme beaucoup d'oxygène. Cette biodégradation est plus importante en période d'été (5 mg / L), en particulier dans les sites fortement contaminés, qui reçoivent des quantités massives de rejets domestiques et d'effluents industriels. Cependant, nos résultats au même titre que ceux trouvés dans l'étude de Chávez-Díaz *et al. (2020)*, révèlent des corrélations positives avec les matières en suspension (MES). C'est le cas des sites S2 et S3 dont les eaux sont riches en MES. D'après la littérature, les MES ont un rôle protecteur pour les bactéries intestinales contre le rayonnement solaire et les prédateurs (*Kadri et al. 2017*).

### 4. Abondance de bactéries potentiellement pathogènes dans le Golfe d'Annaba

Dans tous les échantillons analysés, les protéobactéries représentent systématiquement le phylum le plus dominant (87%), en particulier la famille des *Enterobacteriaceae* qui est la plus fréquemment isolée des sites les plus pollués, dont les déchets domestiques restent la principale source de contamination dans le Golfe d'Annaba, étant donné que les bactéries entériques sont principalement trouvées dans les excréments d'animaux à sang chaud, y compris les humains (*Poharkar et al. 2017*).

Les bactéries entériques, telles que *Salmonella spp*, *Shigella spp* et *E. coli*, sont à l'origine la plupart des infections du tractus gastro-intestinal chez l'homme, avec 1,7 milliard de cas pour causes

#### IV. Discussion

de diarrhée enregistrés chaque année, principalement dues aux souches pathogènes d'*E. coli* (Yang et al. 2017), et avec 450 enfants sur 100 000 en Inde et au Pakistan souffrant de fièvre entérique causée par *Salmonella typhi* (Sánchez-Vargas et al. 2011 ; Neogi et al. 2014).

Des bactéries environnementales telles que *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp. et *Shewanella* spp. sont également identifiées dans les trois compartiments analysés. Les espèces du genre *Aeromonas* sont largement isolées des environnements aquatiques et fréquemment signalées comme étant à l'origine d'infections d'origine hydrique suite à l'ingestion de fruits de mer (gastro-entérite et septicémie) (Chopra et Houston 1999 ; Joseph et al. 2013 ; Hamid et al. 2016). Les *Pseudomonas* sont des microorganismes ubiquistes que l'on retrouve dans les coquillages marins et les eaux de loisirs (Maravić et al. 2018 ; Goh et al. 2019). Ces pathogènes opportunistes sont fréquemment multi-résistants et associés à des diarrhées, des infections intra-abdominales et nosocomiales, en particulier chez les patients immunodéprimés (Streeter et Katouli 2016).

Les résultats de l'identification biochimique révèlent également la présence d'espèces du genre *Vibrio* dans les sites d'échantillonnage, dont *V. parahaemolyticus* est l'espèce la plus fréquemment isolée.

*Vibrio* spp sont des bactéries d'origine hydrique que l'on trouve naturellement dans les environnements estuariens et côtiers. Cependant, certaines espèces peuvent être pathogènes pour les humains et les organismes marins tels que les bivalves (Rincé et al. 2018 ; Bozcal et Dagdeviren 2020).

En août 2018, le ministère Algérien de la Santé a signalé une épidémie de choléra à Blida et dans cinq autres régions (Alger, Tipaza, Bouira, Médéa et Ain Defla) dans le Nord du pays. La présence de *V. cholerae* O1 ou O139 dans l'eau et autres produits de la mer, peut provoquer de graves diarrhées déshydratantes et même la mort (Feldhusen 2000). Dans le Golfe d'Annaba, *V. cholerae* a été identifié dans les échantillons de moules prélevés dans le site S3 au cours de la même période que l'épidémie déclarée à Blida, site désormais considéré comme zone à risque très élevé.

En plus des protéobactéries, 24 isolats du genre *Staphylococcus* sont également identifiés pendant la période d'étude. Ces bactéries potentiellement pathogènes, dont *S. aureus*, sont des agents connus à l'origine de plusieurs affections telles les éruptions cutanées, la pneumonie, les infections des oreilles et des yeux, l'endocardite et la méningite (Yaghoubzadeh et al. 2020).

Selon Pomykała et al. (2012), certains staphylocoques à coagulase positive sont des agents pathogènes courants des fruits de mer et peuvent présenter un risque important pour la santé humaine en cas de consommation inappropriée de mollusques bivalves. En outre, le *S. aureus*

résistant à la méthicilline (SARM), pathogène le plus dangereux pour la santé humaine, est fréquemment détecté dans plusieurs plages de loisirs aux États-Unis (*Plano et al. 2013 ; Thapaliya et al. 2017*).

### 5. Identification morphologique et moléculaire de la moule *Perna perna*

#### 5.1 Identification morphologique

D'après la littérature, la moule brune *Perna perna* et la moule bleue *Mytilus galloprovincialis* coexistent et se font concurrence sur les côtes méditerranéennes en Algérie (*Abada-Boudjema et Dauvin 1995*) et en Tunisie (*Zaouali 1973*). Elles sont décrites dans différentes études sur la pollution marine, et leur utilisation comme supports de bio-surveillance présente donc un intérêt scientifique indéniable dans ces régions.

Cependant, le statut taxonomique de ces deux genres a longtemps été confondu, principalement en raison de la grande variabilité des caractères **morphologiques** (*Siddall 1980 ; Vakily 1989*). Pour cette raison, des études sur la répartition géographique, les caractères morphologiques et la systématique générale des espèces *Perna* et *Mytilus* sont reprises, dans un souci de caractériser les deux genres du fait de leur ressemblance étroite (*Siddall 1980*).

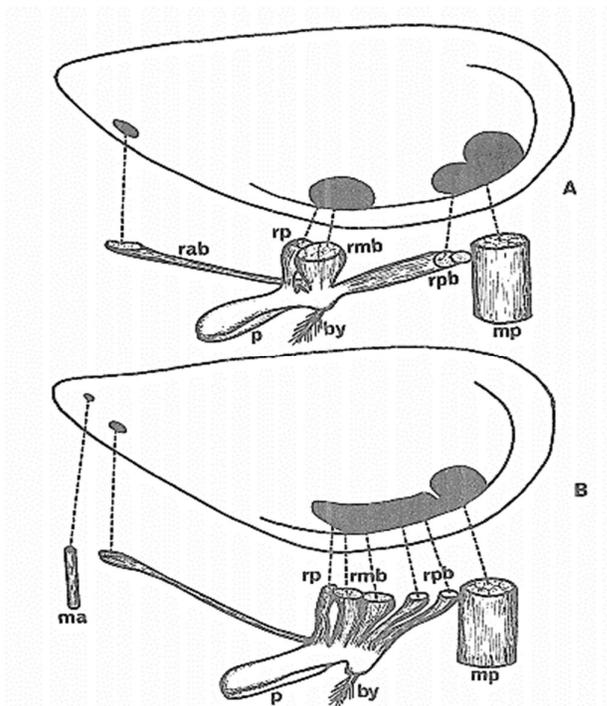
Dans son étude, Siddall (*1980*) constate que le principal caractère distinctif entre les deux genres est la présence de deux cicatrices rétractiles séparées sur les coquilles de *Perna spp.* En revanche, ces doubles cicatrices sont unies pour former une bande continue de myostracum sur les coquilles de *Mytilus spp* (Fig. 56). D'autres caractères distinctifs importants tels que l'absence de l'adducteur antérieur, la couleur brun-verdâtre de la coquille et les dimensions de la coquille sont également des caractères clés des espèces de *P. perna* (Tab. 13).

Dans la présente étude, et d'après les caractères d'identification morphologique, les moules collectées dans le Golfe d'Annaba appartiennent bien à l'espèce *P. perna*. Nos résultats viennent corroborer ceux décrits dans plusieurs études menées dans cette perspective (*Siddall 1980, Sokolowski et al. 2004, Rajagopal et al. 2006, Lourenço et al. 2012, Gardner et al. 2016, García et al. 2016, Kerdoussi et al. 2017, Immaculate et al. 2018 ; Krampah et al. 2020*).

#### IV. Discussion

**Tableau 13** : Caractères distinctifs entre la musculature de *M. galloprovincialis* et de *P. perna* (Linneaus, 1758).

	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	<i>Perna perna</i>
<b>Muscle adducteur antérieur (ma)</b>	petit	Absent
<b>Muscle adducteur postérieur (mp)</b>	Grande taille	Grande taille
<b>Muscles rétracteurs du pied (rp)</b>	1 paire s'insérant dorsalement dans la région postérieure	1 paire s'insérant dorsalement dans la région postérieure
<b>Muscles rétracteurs du byssus (3 paires) :</b>	<u>Rétracteurs antérieurs</u> : 1 paire s'insérant antérieurement	<u>Rétracteurs antérieurs</u> 1 paire s'insérant antérieurement
<b>antérieurs : (rab)</b>		
<b>moyens : (rmb)</b>	<u>Rétracteurs moyens</u> : 1 paire formée de 2 faisceaux s'insérant dorsalement dans la région moyenne contre les rétracteurs postérieurs.	<u>Rétracteurs moyens</u> : 1 paire de muscles très épais formés de nombreux faisceaux, empreinte distincte.
<b>postérieurs : (rpb)</b>	<u>Rétracteurs postérieurs</u> : 1 paire de deux faisceaux s'insérant postérieurement entre les précédents et l'adducteur postérieur.	<u>Rétracteurs postérieurs</u> : 1 paire formée de deux faisceaux à insertion distincte contre l'adducteur postérieur.



**Figure 56** : Disposition des insertions musculaires sur la coquille de *Perna perna* (a) et de *Mytilus galloprovincialis* (b) :

ma = muscle adducteur antérieur

mp= muscle adducteur postérieur  
rab=rétracteur antérieur du byssus

rmb = rétracteurs moyens du byssus

rpb rétracteurs postérieurs du byssus

rp= rétracteur du pied.

### 5.2 Identification moléculaire

Une identification moléculaire est également nécessaire pour compléter et confirmer l'identification morphologique pratiquée sur les échantillons de moules récoltés au niveau des sites étudiés. Le gène mitochondrial de l'ARNr 16S est extrait d'une moule brune puis amplifié avec succès, donnant un produit PCR d'environ 700 paires de bases (pb) (Fig. 47). Après le séquençage Sanger, la séquence du gène d'ARNr 16S est comparée à la base de données NCBI à l'aide du logiciel BLAST. La séquence de notre échantillon révèle une identité de 100% comparée aux séquences d'autres *P. perna* de la base de données GenBank.

L'arbre phylogénétique construit sur la base des séquences d'ARNr 16S de vingt-cinq espèces de *Mytilidae* montre que la moule brune du Golfe d'Annaba (***Perna perna* du S3**) est placée dans le clade de l'espèce *P. perna* avec une valeur bootstrap relativement élevée (100 % bootstrap) (Fig. 48). On en déduit qu'elle est affiliée à l'espèce *P. perna* (100 % bootstrap) et est plus apparentée à *P. canaliculus* qu'à *P. viridis*. En outre, les résultats obtenus indiquent également que notre échantillon semble plus étroitement lié aux espèces de *Mytilus* que les autres espèces représentatives de *Mytilidae*. Cette constatation est similaire à celle rapportée par Weber et al. (2009) dans son étude basée sur les séquences mitochondriales de l'ARNr 16S de *Perna spp* dans le sud du Brésil.

En résumé, les résultats de cette étude ont permis de révéler les caractères distinctifs entre les espèces *P. perna* et *M. galloprovincialis* basés sur des analyses morphologiques. Bien qu'utiles, ces analyses restent insuffisantes pour une identification précise ; en effet, des études antérieures ont souligné que ces caractères sont souvent peu fiables pour confirmer l'identification de différents taxons (Siddal 1980 ; Zieritz et al. 2012 ; Dias et al. 2013 ; Micklem et al. 2016, Noor et al. 2019). Par conséquent, l'utilisation de méthodes d'analyse moléculaires parallèles basées sur différents marqueurs d'ADN est plus qu'indispensable. À cet égard, des séquences de l'ADNmt sont largement utilisées pour étudier la diversité génétique et les relations phylogénétiques entre les espèces marines en raison de l'absence de recombinaison, de leur héritage maternel et de leur taux d'évolution rapide (Guo et al. 2004 ; Li et al. 2013 ; Ye et al. 2015).

En effet, nos résultats montrent la pertinence de l'utilisation du gène de l'ADN mitochondrial comme outil efficace et fiable pour confirmer l'identité taxonomique de l'espèce *P. perna*. Ces résultats de recherche seront certainement utiles pour distinguer sans ambiguïté les membres de la famille des *Mytiladae*, et faciliter leur gestion, puis leur culture et leur conservation dans le Golfe d'Annaba.

### 6. Identification biochimique et moléculaire des bactéries isolées des moules *P. perna*

Les souches des *Enterobacteriaceae* sont connues pour être difficiles à distinguer par des procédés classiques (*Hamdi et al. 2017*). En outre, l'identification biochimique seule peut être problématique car certains nouveaux taxons peuvent ne pas être inclus dans les bases de données disponibles (*Janda et Abbott 2002*). Pour cette raison, une identification moléculaire supplémentaire ciblant le gène de l'ARNr 16S est plus qu'indispensable. Elle est réalisée sur 25 isolats, isolés à partir des moules *P. perna* de S3.

En général, l'identification biochimique au niveau du genre est confirmée dans 72% des cas par le séquençage du gène de l'ARNr 16S (Tab.12). Tous les isolats présentent plus de 97% de similitudes dans leurs séquences comparativement aux séquences de la base de données GenBank.

Le gène ribosomal ARNr 16S possède des régions hautement conservées dans toutes les cellules bactériennes, entrecoupées de neuf segments de séquences hypervariables (appelées V1-V9); c'est l'empreinte moléculaire de l'identification bactérienne et de la classification taxonomique (*Jo et al. 2016 ; Monticelli et al. 2019*). Le séquençage du gène de l'ARNr 16S reste la technique la plus utilisée et la plus fiable pour des études taxonomiques et phylogénique.

Cette technique d'identification basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S est très pratiquée en raison sa présence dans toutes les bactéries, de sa grande taille (environ 1500 pb) et des informations statistiquement valides et pertinentes qu'il contient (*Janda et Abbott 2007*). Elle permet la détection et l'identification d'agents pathogènes bactériens exigeants, non cultivés, à croissance lente, ainsi que de nouveaux isolats.

Malgré sa précision, l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 16S présente des inconvénients lors de la comparaison d'espèces étroitement apparentées, où les gènes de l'ARNr 16S pourraient ne pas être suffisamment différents pour distinguer les deux espèces.

Il est donc souvent souhaitable de compléter l'analyse de l'ARNr 16S avec un typage de séquence multilocus (MLST). Cette technique examine plusieurs gènes codant pour des protéines, qui sont plus sensibles à la dérive génomique que le gène de l'ARNr 16S. Pour certaines espèces, il y a même des approches MLST normalisées, qui peuvent être comparés directement aux bases de données publiques MLST (*Sabat et al. 2013*). Toutefois, le principal inconvénient de cette technique est son coût relativement élevé, car elle nécessite plus de réactions de séquençage par souche analysée (*Sabat et al. 2013*).

#### **IV. Discussion**

Pour les isolats (EM3, EM18, EM97, EM102 et MM6) identifiés comme étant *E. coli* à l'aide des tests API et par des méthodes de séquençage du gène de l'ARNr 16S, le MLST est préconisé et réalisé pour mieux comprendre leurs relations phylogénétiques. Fait intéressant, les résultats indiquent que nos isolats sont très similaires les uns aux autres mais néanmoins distincts et n'appartenaient donc pas à la même souche d'*E. coli*. Cela laisse à penser qu'ils proviennent de souches distinctes de contamination fécale, car *E. coli* se trouve principalement dans les matières fécales de mammifères à sang chaud (**Poharkar et al. 2017**). Par conséquent, l'utilisation de techniques de suivi des sources bactériennes à travers des marqueurs spécifiques à l'homme et à l'animal dans les prochaines études sera un outil important pour comprendre l'origine de la pollution fécale dans le Golfe d'Annaba et pour évaluer les risques sanitaires liés à la présence de microorganismes pathogènes.

Ces résultats ont permis de mettre en exergue l'importance des techniques d'identification moléculaires pour leur fiabilité, efficacité, et leur rapidité. En revanche, les analyses biochimiques, moins coûteuses, plus simples à utiliser, et bien que d'un niveau de précision acceptable, leurs résultats sont difficilement interprétables et lents à obtenir (**Gracias et McKillip 2004**). Il est donc conseillé d'utiliser l'identification moléculaire lorsque les résultats de l'identification biochimique sont ambigus.

## ***V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES***

## V. *Conclusion et perspectives*

Le milieu marin côtier est soumis à de fortes perturbations liées aux rejets directs (eaux usées, effluents industriels, agricoles eturbains, etc.) et indirects (apports atmosphériques et fluviaux). Le Golfe d'Annaba, comme tout le reste du littoral algérien souffre d'une forte pollution qui menace fortement les différentes ressources naturelles existantes dans cette région.

L'étude a porté sur les trois compartiments, eau, sédiment et moule, exposés à une contamination bactérienne provenant d'une pollution diffuse et permanente. Aussi, et sur une période d'une année, nous nous sommes attelés à suivre les variations de ces contaminations par des analyses physico-chimiques et bactériologiques mensuelles.

L'étude a révélé la présence d'indicateurs fécaux dans les trois compartiments analysés ; cette pollution est fortement impactée par les activités anthropiques, les variables environnementales ainsi que les conditions hydrodynamiques de la zone d'étude.

Les résultats de l'analyse bactériologique ont montré que la contamination fécale dans le Golfe d'Annaba varie selon les sites et la période d'échantillonnage. Le site le plus pollué étant Sidi Salem suivi par Rezgui Rachid, du fait probablement de leur proximité de nombreux émissaires d'eaux usées non traitées et de la présence d'importantes colonies d'oiseaux et d'animaux domestiques qui colonisent les lieux. Les teneurs les plus faibles étaient enregistrées au Cap de Garde et à Lahnaya ; ce constat est probablement lié à leur éloignement des principales sources de contaminations ainsi qu'à leur hydrodynamisme particulier.

Les concentrations bactériologiques relevées dans la moule *Perna perna* sont significativement plus élevées que celles détectées dans les échantillons de sédiment et d'eau marine, et supérieures aux limites autorisées pour la consommation. Par conséquent, les moules peuplant les sites étudiés seraient impropres à la consommation directe. Ces résultats valident notre choix quant à l'utilisation de ces espèces sentinelles comme bio-indicateurs efficaces pour évaluer la qualité microbiologique des eaux côtières.

La présence et la survie des bactéries fécales dans la moule est un sujet de grande préoccupation en ce qui concerne les maladies qu'elles peuvent provoquer lorsqu'elles sont consommées par l'homme. Il convient donc de mettre en œuvre les mesures nécessaires, en particulier dans les sites fortement pollués, afin de protéger l'environnement et la santé humaine.

Les charges bactériennes dans la couche superficielle du sédiment étaient comparables à celles trouvées dans la moule. Le sédiment présente un habitat où les bactéries peuvent vivre, croître et proliférer en s'adaptant aux différentes conditions environnementales.

## V. Conclusion et perspectives

Par contre dans l'eau, les charges bactériennes moins importantes, font face au pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer et par conséquent sont soumises aux phénomènes de dilutions et de dispersion.

Outre les indicateurs fécaux, la présence d'autres bactéries potentiellement pathogènes dans les différents échantillons analysés, telles que *Vibrio*, *Salmonella* et *Staphylococcus*, soulève des questions quant au danger de cette contamination pour la santé des baigneurs et des consommateurs de moules. Ces risques se traduisent principalement par des infections du tractus gastro-intestinal humain, des septicémies, des éruptions cutanées, des pneumonies, des infections des oreilles et des yeux, des endocardites et des méningites.

Une identification moléculaire ciblant le gène mitochondrial et génomique de l'ARNr 16S par des techniques de séquençage par la méthode Sanger et le MLST, nous a permis de déterminer de façon claire et précise les espèces de contaminants isolés des moules *P. perna*.

Après cette douloureuse description de l'état des eaux du littoral Annabi, un fait est certain, si nous souhaitons préserver cet environnement marin, nous devons dès aujourd'hui changer notre façon de vivre car le niveau d'alerte a été atteint. La protection des eaux du Golfe passe par des mesures effectives et urgentes en matière de surveillance et régulation des rejets de toutes sortes ; aussi, il convient de mettre en place ce qui suit :

- ✓ Faire preuve d'une vigilance constante en surveillant rigoureusement la qualité des eaux du Golfe tout au long de l'année.
- ✓ L'installation de stations d'épuration des eaux usées au niveau de chaque point de rejet recevant une grande quantité d'eaux usées.
- ✓ Réduire les rejets directs des eaux usées domestiques.
- ✓ Mettre en place une institution nationale pour la gestion des zones côtières.
- ✓ Développer un programme d'action impliquant tous les acteurs (ministères de la santé, de l'environnement, des ressources en eau, de la pêche, autorités locales et associations) visant à protéger le littoral algérien de tout type d'agression.
- ✓ La formation qualitative et adéquate ainsi qu'une remise à niveau continue du personnel.
- ✓ Sensibiliser les citoyens aux questions environnementales susceptibles d'affecter la santé humaine/environnementale, notamment avant la période estivale.
- ✓ Élargir la gamme des tests de dépistage des germes tests, des bactéries d'intérêt sanitaire, des virus, des levures et des moisissures en établissant un protocole de surveillance continue de cet écosystème pour préserver la santé publique.

## *V. Conclusion et perspectives*

- ✓ Les consommateurs de fruits de mer doivent cuire correctement les moules avant de les manger et surtout les consommer immédiatement après la cuisson pour éviter une éventuelle multiplication des agents pathogènes tels que les vibrions.
- ✓ La génomique est potentiellement une meilleure technique pour déterminer la communauté bactérienne dans les échantillons du milieu côtier par rapport à l'analyse bactériologique conventionnelle basée sur la culture et aux méthodologies d'identification phénotypique. Les méthodes d'identification obtenues à partir des méthodes de culture peuvent être limitées en termes d'identification d'un nombre restreint d'isolats bactériens. En outre, divers facteurs environnementaux, dont la température, peuvent affecter le nombre de cellules bactériennes. Cependant, la composition microbienne non cultivable qui se produit naturellement dans les environnements peut être détectée par le métagénome. Ainsi, la détection et la surveillance environnementale des bactéries métagénomiques pourraient fournir plus d'informations sur l'environnement et le niveau de contamination.

## ***RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES***

---

**A**

- Aanensen DM, Spratt BG (2005) The multilocus sequence typing network: mlst. net." *Nucleic Acids Res* 33.suppl\_2 W728-W733
- Abada-Boudjema YM, Moueza M (1981) Structure des populations d'une moulière naturelle en baie d'Alger. *Acta Oecol-Oec Gen* 2: 183-194
- Abada-Boudjema YM, Altes J, Moueza M (1984) Croissance comparée de deux espèces de moules *Mytillus galloprovincialis* (Lmk.) et *Perna perna* (L.) dans une moulière naturelle de la baie d'Alger. *Hallotis* 14: 33-38
- Abada-Boudjema YM, Dauvin JC (1995) Recruitment and life span of two natural mussel populations *Perna perna* (Linnaeus) and *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) from the Algerian coast. *J Moll Stud* 61: 467-481
- Abdenmour C, Smith B, Boulakoud M, Samraoui B, Rainbow PS (2000) Trace metals in marine, brackish and 525 freshwater prawns (Crustacea, Decapoda) from northeast Algeria. *Hydrobiologia* 432:217-227. 526
- Abderrahmani K, Boulahdid M, Bendou N, Aissani A (2020) Seasonal distribution of cadmium, lead, nickel, and magnesium in several tissues of mussels from the Algerian coasts. *Environ Sci Pollut Res* 27:22547–22567
- ABH-CSM (1999-2000) The Agency's Notebooks. In: River Basin Agency Constantinois Seybouse Mellegue, Constantine, the Seybouse basin 1: 35
- Abia ALK, Ubomba-Jaswa E, Momba MNB (2015) Impact of seasonal variation on *Escherichia coli* concentrations in the riverbed sediments in the Apies River, South Africa. *Sci Total Environ* 537:462–469
- Aminot A, & Kérouel R (2004). Hydrologie des écosystèmes marins. Paramètres et analyses. Ifremer. p :155-276.
- Amri S, Samar MF, Sellem F, Ouali K (2017) Seasonal antioxidant responses in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) used as a bioindicator of the environmental contamination in the South-East Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 122:392–402
- Anderson KL, Whitlock JE, Harwood VJ (2005) Persistence and differential survival of fecal indicator bacteria in subtropical waters and sediments. *Appl Environ Microbiol* 71: 3041–3048
- Arnold BF, Wade TJ, Benjamin-Chung J, Schiff KC, Griffith JF, Dufour AP, Weisberg SB, Colford JM Jr (2016) Acute gastroenteritis and recreational water: highest burden among young US children. *Am J Public Health* 106:1690–1697
- Atmar RL, Opekun AR, Gilger MA, Estes MK, Crawford SE, Neill FH, et al (2014) Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J Infect Dis* 209: 1016–1022

**B**

- Barberi ON, Byron CJ, Burkholder KM et al. (2020) Assessment of bacterial pathogens on edible macroalgae in coastal waters. *J Appl Phycol* 32: 683–696
- Barreras H Jr, Kelly EA, Kumar N, Solo-Gabriele HM (2019) Assessment of local and regional strategies to control bacteria levels at beaches with consideration of impacts from climate change. *Mar Pollut Bull* 138:249–259
- Baudart J, Paniel N (2014) Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques. *Revue Francophone Des Laboratoires* 459 : 29-39
- Belabed BE, Laffray X, Dhib A, Fertouna-Belakhal M, Turki S, Aleya L (2013) Factors contributing to heavy metal accumulation in sediments and in the intertidal mussel *Perna perna* in the Gulf of Annaba (Algeria). *Mar Pollut Bull* 74:477-489
- Benkova M, Soukup O, Marek J (2020) Antimicrobial susceptibility testing : currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *J appl microbiol* 129 : 806-822
- Benmessaoud F (2007) Qualité physico-chimique, métallique et bactériologique des eaux de l'estuaire du BouRegreg et impact sur la biologie et la démographie de *Venerupis decussata* (LINNE, 1758) et *Cardium edule* (LINNE, 1767). Thèse de doctorat d'état. Faculté des Sciences Rabat
- Bennani M, Amarouch H, Boukanjer A, Nadre H, Lalaoui M, Allali M, Cohen N (2012) Influence des facteurs environnementaux sur les charges des bactéries dans le littoral méditerranéen du Maroc. *Eur J Sci Res* 71: 24-35
- Berthe T, Touron A, Leloup J, Deloffre J, Petit F (2008). Faecal-indicator bacteria and sedimentary processes in estuarine mudflats (Seine, France). *Mar Pollut Bull* 57: 59–67
- Bjedov I, Lecointre G, Tenaillon O et al (2003) Polymorphism of gene encoding SOS polymerases in natural populations of *Escherichia coli*. *DNA Repair* 2:417–426
- Bleidorn C, Gerth M (2018) A critical re-evaluation of multilocus sequence typing (MLST) efforts in *Wolbachia*. *FEMS microbiol ecol* 94:1
- Blinda M (2007) Pollution tellurique du littoral nord-ouest du Maroc entre Tanger et Tétouan: caractérisation, impact sur l'environnement et proposition de solutions. Thèse de doctorat, université Mohammed V, faculté des sciences, Rabat, pp. 194.
- Bochner BR (2009) Global phenotypic characterization of bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* 33:191–205
- Boudjema K, Kordali S, Bounakous N, Meknachi A, Badis A (2014) Tilising caging techniques to investigate catalase response, accumulated fecal bacteria and heavy metals in *perna perna* (linnaeus, 1758) for active biomonitoring coastal waters: a study applied in the bay of Bou-Ismaïl (Algeria). *Adv Environ Biol* 8: 215-224
- Boutaib R, Azhari H, Abid M, Marhraoui M (2015) Comparison of *Escherichia coli* levels in shellfish from Mediterranean coast, Morocco. *Global Advanced Research Journal of Microbiology* 4:10
- Bozcal E, Dagdeviren M (2020) Bacterial metagenome analysis of *Mytilus galloprovincialis* collected from Istanbul and Izmir coastal stations of Turkey. *Environ Monit Assess* 192:1–18

## *Références bibliographiques*

- Burge CA, Closek CJ, Friedman CS, Groner ML, Jenkins CM, Shore-Maggio A, Welsh JE (2016) L'utilisation de filtres filtrants pour gérer les maladies dans un monde en mutation. *Integr Comp Biol* 56: 573–587
- Burke L, Kura Y, Kasem K, Revenga C, Spalding M, McAllister D (2001). *Coastal Ecosystems*. Washington DC World Resources Institute. pp93
- Buszewski B, Rogowska A, Pomastowski P, Złoch M, Railean-Plugaru V (2017) Identification of Microorganisms by Modern Analytical Techniques. *J AOAC Int* 100 : 1607–1623
- Byappanahalli MN, Nevers MB, Korajkic A, Staley ZR, Harwood VJ (2012) Enterococci in the environment. *Microbiol Mol Biol Rev* 76 : 685-706

### **C**

- Chaffai A (2014) Usefulness of bioindicators and biomarkers in pollution biomonitoring. *Int J Biotech Well Indus* 3: 19–26
- Chávez-Díaz LV, Gutiérrez-Cacciabue D, Poma HR, Rajal VB (2020) Sediments quality must be considered when evaluating freshwater aquatic environments used for recreational activities. *Int J Hyg Environ Health* 223:159–170
- Chavez MRC, Sedas VP, Borunda EO, Reynosa FL (2005) Influence of water temperature and salinity on seasonal occurrences of *Vibrio cholerae* and enteric bacteria in oyster-producing areas of Veracruz, Mexico. *Mar Poll Bull* 50:1641-1648
- Chigbu PS, Gordon, Strange TR (2005) Fecal coliform bacteria disappearance rates in a northcentral Gulf of Mexico estuary *Estuarine. Coast Shelf Sci* 65 : 309-318
- Chopra AK, Houston CW (1999) Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. *Microbes Infect* 1:1129–1137
- Clarke R, Peyton D, Healy MG, Fenton O, Cummins E (2017) A quantitative microbial risk assessment model for total coliforms and *E. coli* in surface runoff following application of biosolids to grassland. *Environ pollut* 224 : 739-750
- Coulon F (2014) Contribution à l'étude des sédiments marins lors d'opérations de dragage portuaire: re-sédimentation et mobilisation de la pollution organique. Diss. Université Montpellier II- Sciences et Techniques du Languedoc
- Courtois G (1993) Sources de contamination microbienne des coquillages. *Informations techniques des services vétérinaires français*, Paris. pp337-349
- Crabill C, Donald R, Snelling J, Foust R, Southam G (1999). The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. *Water Res* 33:2163–2171
- Curriel-Ayala F, Quinones-Ramirez EI, Pless RC, Gonzalez-Lasso E (2012) Comparative studies on *Enterococcus*, *Clostridium perfringens* and *Staphylococcus aureus* as quality indicators in tropical seawater at a Pacific Mexican beach resort. *Mari Poll Bull* 64:2193- 2198

### **D**

## *Références bibliographiques*

- Dallarés S, Carrasco N, Álvarez-Muñoz D, Rambla-Alegre M, Solé M (2018) Multibiomarker biomonitoring approach using three bivalve species in the Ebro Delta (Catalonia, Spain). *Environ Sci Pollut Res* 25:36745-36758
- Damak M, Fourati R, Elleuch B, Kallel M (2020) Environmental quality assessment of the fish farms' impact in the Monastir Bay (eastern of Tunisia, Central Mediterranean): a benthic foraminiferal perspective. *Environ Sci Pollut Res* 27:9059–9074
- Dellarras C (2000) *Microbiologie de l'environnement avec législation : travaux pratique*. Gaëtan Moriu éditeur, France. pp117-136
- Deloffre J, Lafite R, Lesueur P, Lesourd S, Verney R, Guezennec L (2005) Sedimentary processes on an intertidal mudflat in the upper macrotidal Seine estuary, France. *Estuar Coast Shelf S* 64: 710–720
- de Oliveira MJS, Beasley CR, Barros NGV, do Socorro Marques-Silva N, de Simone LRL, Lima ES, Tagliaro CH (2017) Two African origins of naturalized brown mussel (*Perna perna*) in Brazil: past and present bioinvasions. *Hydrobiologia* 794: 59-72
- Desmarais TR., Solo-Gabriele HM, Palmer CJ (2002) Influence of soil on fecal indicator organisms in a tidally influenced subtropical environment, *Appl Environ Microbiol* 68 : 1165–1172
- Devane ML, Weaver L, Singh SK, Gilpin BJ (2018) Fecal source tracking methods to elucidate critical sources of pathogens and contaminant microbial transport through New Zealand agricultural watersheds—a review. *J Environ Manag* 222: 293–303
- Devlin M et al (2020) Baseline assessment of coastal water quality, in Vanuatu, South Pacific: Insights gained from in-situ sampling. *Mar Pollut Bull* 160: 111651
- Dias PJ, Fotedar S, Gardner JP, Snow M (2013) Development of sensitive and specific molecular tools for the efficient detection and discrimination of potentially invasive mussel species of the genus *Perna*. *Manag Biol Invasions* 4: 155
- Drif F, Abdennour C, Ciğerci İH, Ali MM, Mansouri O, Messarah M (2019) Preliminary assessment of stress and genotoxicity biomarkers in bivalve molluscs from the Gulf of Annaba, Algeria. *Bull Environ Contam Toxicol* 102: 555-559
- dos Santos FS, Neves RAF, de Carvalho WF, Krepsky N, Crapez MAC (2018) Evaluation of the immune responses of the brown mussel *Perna perna* as indicators of fecal pollution. *Fish Shellfish Immunol* 80:115–123
- Drummond JD, Davies-Colley RJ, Stott R, Sukias JP, Nagels JW, Sharp A, et al (2014) Retention and remobilization dynamics of fine particles and microorganisms in pastoral streams. *Water Res* 66: 459–47

## **E**

- Eadie BJ (1997) Probing particle processes in Lake Michigan using sediment traps. *Water Air Soil Pollut* 99: 133–139
- Escobar-Páramo P, Sabbagh A, Darlu P et al (2004) Decreasing the effects of horizontal gene transfer on bacterial phylogeny: the *Escherichia coli* case study. *Mol Phylogenet Evol* 30:243–250

**F**

- FAO (2016) The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FAO (2019) Fishery statistical collections. Global aquaculture production 1950–2017. FAO Fisheries and Aquaculture Department (on line), Rome
- Fauconneau B (2002). Health value and safety quality of aquaculture products. *Rev Med Vet* 153: 331-336
- Feldhusen F (2000) The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes Infect* 2:1651–1660
- Ferguson CM, Coote BG, Ashbolt NJ, Stevenson IM (1996). Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Res.* 30, 2045–2054
- Filippini M, Middelboe M (2007) Viral abundance and genome size distribution in the sediment and water column of marine and freshwater ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 60 : 397–410
- Fiskal A et al (2021) Effects of Macrofaunal Recolonization on Biogeochemical Processes and Microbiota—A Mesocosm Study. *Water* 7: 371- 714
- Fouillet A, Fournet N, Forgeot C, Jones G, Septfons A, Franconeri L, Ambert-Balay K, Schmidt J, Guérin P, de Valk H, Caserio-Schönemann C (2020) Large concomitant outbreaks of acute gastroenteritis emergency visits in adults and food-borne events suspected to be linked to raw shellfish, France, December 2019 to January 2020. *Euro Surveil* 25:2000060
- Francioni E, Wagener ADLR, Calixto RDC, Bastos GC (2004) Evaluation of *Perna perna* (Linné, 1758) as a tool to monitoring trace metals contamination in estuarine and coastal waters of Rio de Janeiro, Brazil. *J Braz Chem Soc* 15:103–110

**G**

- Gabutti G, De Donna A, Bagordo F, Montagna MT (2000) Comparative survival of faecal and human contaminants and use of *Staphylococcus aureus* as an effective indicator of human pollution. *Mar Poll Bull* 40:697- 700
- García M, Seijo CL, Freitas L, Córdova H, Suástegui JMM, Babarro J (2016) Comparative performance of the mussels *Perna perna* and *Perna viridis*, cultivated at four different depths. *Braz j oceanogr* 64: 249-262
- Gardner JP, Patterson J, George S, Edward JP (2016) Combined evidence indicates that *Perna indica* Kuriakose and Nair 1976 is *Perna perna* (Linnaeus, 1758) from the Oman region introduced into southern India more than 100 years ago. *Biol invasions* 18: 1375-1390
- Garrido-Perez MC, Anfuso E, Acevedo A, Perales-Vargas-Machuca JA (2008) Microbial indicators of faecal contamination in waters and sediments of beach bathing zones. *Int J Hyg Environ Health* 211: 510-517

## *Références bibliographiques*

- Garzio-Hadzick A, Shelton DR, Hill RL, Pachepsky YA, Guber AK, Rowland R (2010) Survival of manure-borne *E. coli* in streambed sediment: effects of temperature and sediment properties. *Water Res* 44:2753-2762
- GESAMP (1983) Report of the Thirteenth Session, Geneva, Switzerland, 28. February-4 March 1983. IMO/FAO/UNESCO/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group, of Experts on Scientific Aspects of Marine Pollution. Reports and Studies 18:50
- Ge ZRL, Whitman MB, Nevers MB, Phanikumar MS (2012), Wave-induced mass transport affects daily *Escherichia coli* fluctuations in nearshore water. *Environ Sci Technol* 46: 2204–2211
- Ghozzi K, Marangi M, Papini R, Lahmar I, Challouf R, Houas N, Ben Dhiab R, Normanno G, Babba H, Giangaspero A (2017) First report of Tunisian coastal water contamination by protozoan parasites using mollusk bivalves as biological indicators. *Mar Pollut Bull* 117:197–202
- Giangaspero A, Papini R, Marangi M, Koehler AV, Gasser RB (2014) Cryptosporidium parvum genotype Ila and Giardia duodenalis assemblage A in Mytilus galloprovincialis on sale at local food markets. *Int J Food Microbiol* 171:62–67
- Goeury D (2014) La pollution marine, in Woessner Raymond (dir.), Mers et océans, Paris: Atlande, Clefs concours
- Goh SG, Saeidi N, Gu X, Vergara GGR, Liang L, Fang H, Kitajima M, Kushmaro A, Gin KYH (2019) Occurrence of microbial indicators, pathogenic bacteria and viruses in tropical surface waters subject to contrasting land use. *Water Res* 150:200–215
- Goldscheider N, Pronk M, Zopfi J (2010) New insights into the transport of sediments and microorganisms in karst groundwater by continuous monitoring of particle-size distribution. *Geol. Croat.* 63, 137–142
- Gracias KS, McKillip JL (2004) A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol* 50:883–890
- Grada A, Kate W (2013) Next-generation sequencing: methodology and application." *The Journal of investigative dermatology* 133:8 e11
- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science.* 283: 1476-1481
- Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) (2013) Climate change 2013 : the physical science base. Contribution du groupe de travail I au cinquième rapport d'évaluation du GIEC. Cambridge University Press, Cambridge ([www.ipcc.ch/report/ar5/wg1](http://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1))
- Guo X, Liu S, Liu Q, Liu Y (2004) New progress on mitochondrial DNA in fish. *Acta Genet Sin.* 31: 983-1000
- Gutiérrez-Cacciabue D, Teich I, Poma HR, Cruz MC, Balzarini M, Rajal VB (2014) Strategies to optimize monitoring schemes of recreational waters from Salta, Argentina: a multivariate approach. *Environ Monit Assess* 186:8359–8380
- Guttman DS, Dykhuizen DE (1994) Detecting selective sweeps in naturally occurring *Escherichia coli*. *Genetics* 138:993–1003

## *Références bibliographiques*

Gyawali P, Joanne H (2020) Faecal contamination in bivalve molluscan shellfish: can the application of the microbial source tracking method minimise public health risks?. *Curr Opin Environ Sci Health* 16 14-21

### **H**

Hafsaoui I, Draredja B, Lasota R, Como S, Magni P (2016) Population dynamics and secondary production of *Donax trunculus* (Mollusca, Bivalvia) in the Gulf of Annaba (Northeast Algeria). *Mediterr Mar Sci* 17:738–750

Hamid R, Ahmad A, Usup G (2016) Pathogenicity of *Aeromonas hydrophila* isolated from the Malaysian Sea against coral (*Turbinaria* sp.) and sea bass (*Lates calcarifer*). *Environ Sci Pollut Res* 23:17269–17276

Hamdi S, Rousseau GM, Labrie SJ, Tremblay DM, Kourda RS, Slama KB, Moineau S (2017) Characterization of two polyvalent phages infecting Enterobacteriaceae. *Sci Rep* 7:1–12

Haller L, Amedegnato E, Pote J, Wildi W (2009) Influence of freshwater sediment characteristics on persistence of fecal indicator bacteria. *Water Air Soil Pollut* 203: 217–227

Hassard F et al (2016) Abundance and distribution of enteric bacteria and viruses in coastal and estuarine sediments—a review. *Front microbiol* 7: 1692

Hébert S, Légaré S envirodoq no ENV-2001-0141, rapport n° QE-123 (2000) 24

Hidouci S, Djebar AB, Amara R, Sahraoui EH (2014) Bacterial quality of coastal waters of Annaba (East Algeria). *Eur J Sci Res* 120: 488-493

Hutchison CA 3rd (2007) DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Res* 35:6227–6237

### **I**

Ihaka R, Gentleman R (1996) A language for data analysis and graphics. *Computational & graphical Statistics*. 5: 299-314

Immaculate J, Sheeba W, Narmatha S, Jamila P (2018) Biochemical Composition and Heavy Metal Content in the Mussels of Kadiyapattinam, Kanyakumari district, South West Coast of India. *J Nutri Bio* 4: 244-258

Inal A, Boulahdid M, Angelleti B, Radakovitch O (2018) Levels and ecological risk assessment of heavy metals in surface sediments of fishing grounds along Algerian coast. *Mar Pollut Bull* 136: 322–333.

Ishii S, Sadowsky MJ (2008) *Escherichia coli* in the environment: Implications for water quality and human health. *Microbes Environ* 23:101-108

Islam MM, Hofstra N, Islam MA (2017) L'impact des variables environnementales sur les bactéries indicatrices fécales dans le bassin de la rivière Betna, Bangladesh. *Environ Process* 4: 319–332

### **J**

## *Références bibliographiques*

- Jamieson R, Joy DM, Lee H, Kostaschuk R, Gordon R (2005) Transport and deposition of sediment-associated *Escherichia coli* in natural streams. *Water Res* 39: 2665–2675
- Janda JM, Abbott SL (2002) Bacterial identification for publication: when is enough enough? *J Clin Microbiol* 40:1887–1891
- Jayme M, Silva M, Sales A, Nunes M, Freitas-Almeida A, Araújo FV (2016) Survey of pathogens isolated from mussels *Perna Perna* collected in rocky shore and fish market of Niterói, RJ, and Their Respective Resistance Profile to Antimicrobial Drugs. *J Food Qual* 39:383–390
- Jia Y, Wang L, Qu Z, Yang Z (2018) Distribution, contamination and accumulation of heavy metals in water, sediments, and freshwater shellfish from Liuyang River, Southern China. *Environ Sci Pollut Res Int* 25:7012–7020
- Jo JH, Kennedy EA, Kong HH (2016) Research techniques made simple: bacterial 16S ribosomal RNA gene sequencing in cutaneous research. *J Invest Dermatol* 136:e23–e27
- JORA (1993) Official Journal of the Algerian Republic No. 46 Executive Decree No. 93-164 of 10/07/1993. pp 11
- JORA (2006) Official Journal of the Algerian Republic No. 26 Executive Decree No. 06-141 of 19/04/2006, pp 4-9
- Joseph AV, Sasidharan RS, Nair HP, Bhat SG (2013) Occurrence of potential pathogenic *Aeromonas* species in tropical seafood, aquafarms and mangroves off Cochin coast in South India. *Vet World* 6:300–306
- Jung A et al (2014) Microbial contamination detection in water resources: interest of current optical methods, trends and needs in the context of climate change." *Int J Environ Res Public Health* 11: 4292-4310
- Juste A, Thomma B, Lievens B (2008) Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol* 25:745–761

## **K**

- Kacar A, Omuzbuken B (2017) Assessing the seawater quality of a coastal city using fecal indicators and environmental variables (Eastern Aegean Sea). *Mar Pollut Bull* 123:400–403
- Kadri S, Dahel A, Djebbari N, Barour C, Bensouilah M (2015) Environmental parameters influence on the bacteriological water quality of the Algerian North East coast . *Adv Environ Biol* 9: 180-189
- Kadri S (2015) Qualité bactériologique des eaux du littoral Nord Est Algérien. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar. pp170
- Kadri S, Belhaoues S, Touati H, Boufafa M, Djebbari N, Bensouilah M (2017) Environmental parameters and bacteriological quality of the *Perna perna* mussel (North East Algerian coast). *Int J Biosci* 11: 151-165
- Kaddouri A (2016) Contribution à l'étude des Mollusques Bivalves dans la plage de Maset Ben M'hidi (Wilaya de Tlemcen). Mémoire de Master. UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAID TLEMENEN. pp11

## *Références bibliographiques*

- Kara MH, Lacroix D, Rey-Valette H, Mathé S, Blancheton JP (2018) Dynamics of research in aquaculture in North Africa and support for sustainable development and innovation. *Rev Fish Sci Aquac* 26:309–318
- Kerambrun E (2011) Évaluation des effets biologiques des contaminants chimiques sur les juvéniles de poissons marins: approche multi-biomarqueur en conditions expérimentales et *in situ*. Université du littoral cote d'opale. pp359
- Kerdoussi A (2010) Moule *Perna perna* peuplant le golfe d'Annaba : croissance, reproduction et qualité bactériologique. Mémoire de magister. Université Badji Mokhtar. pp111
- Kerdoussi A, Belhaouas S, Bensaad-Bendjedid L, Touati H, Bensouilah M (2017) Study of weight gain and reproduction in the *Perna perna* mussel using a standard animal. *Int J Biosci* 11: 218-230
- Kerdoussi A (2018) Etat des moulières naturelles du littoral extrême Nord-Est Algérien. Thèse de Doctorat. Université Badji Mokhtar. pp227
- Khan CM (2014) The dynamic interactions between *Salmonella* and the microbiota, within the challenging niche of the gastrointestinal tract. *International scholarly research notices* 2014 :23
- Kilinc B, Besler A (2014) The occurrence of enteric bacteria in marine environment and pollution. *J Mar Sci Technol* 2: 39-43
- Kischel M (2018) Les contaminations bactériologiques des eaux littorales du Morbihan. RAPPORT D'ETUDE. pp 133
- Kobayashi D, Saito M, Heike Y, Yokota K, Arioka H, Oshitani H (2019) The association between consuming bivalves, and acute gastroenteritis and norovirus in Tokyo, Japan. *J Med Virol* 91:986–996
- Krampah EA, Yankson K, Blay J (2020) Population dynamics of the Brown mussel *Perna perna* at a Rocky beach near Cape Coast, Ghana. *Mar Ecol* 41: e12575
- Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 611 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 3: 1870-1874

## **L**

- Labbé RG, Garcia S (2013) *Guide to foodborne pathogens*. Wiley-Blackwell, West Sussex
- Lacaze JC (1996) *Degradation of the coastal environment, ecological consequences*. Edition Masson, Paris
- Laffaille P, Feunteun E, Lefebvre C, Radureau A, Sagan G, Lefebvre JC (2002) Can thinlipped mullet directly exploit the primary and detritic production of European macrotidal salt marshes? *Estuar Coast Shelf Sci* 54: 729–736
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (Ed) *Nucleic acid techniques in 699 bacterial systematics*. Wiley, New York, pp 115-175
- Lara F et al (2017) Virulence markers and phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains with hybrid EAEC/UPEC genotypes recovered from sporadic cases of extraintestinal infections. *Front microbiol* 8: 146

## *Références bibliographiques*

- Leclerc H, Mossel DA, Edberg SC, Struijk CB (2001) Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annu Rev Microbiol* 55: 201–234
- Le Guyader F (1989) Colonisation bactérienne et implantation d'*E. coli* dans le sédiment d'origine littorale. Thèse de Doctorat. Université de Rennes. pp187
- Leight AK, Crump, BC, Hood RR (2018) Assessment of fecal indicator bacteria and potential pathogen co-occurrence at a shellfish growing area. *Front. Microbiol* 9:384
- Lemee L et al (2004) Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types. *J Clin Microbiol* 42: 2609-2617
- Letunic I, Bork P (2019) Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids* 704 Res 47 : W256–W259
- Lesven L (2008) Devenir des éléments traces métalliques au sein du sédiment, un compartiment clé de l'environnement aquatique. Thèse de Doctorat, Université de Lille. pp246
- Li C et al. (2018) Prevalence and antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* in retail seafood. *J food prot* 81 :497-501
- Li J, Ye Y, Wu C, Qi P, Guo B, Chen Y (2013) Genetic variation of *Mytilus coruscus* Gould (Bivalvia: Mytilidae) populations in the East China Sea inferred from mtDNA COI gene sequence. *Biochem Syst Ecol* 50: 30-38
- Lourenço CR, Nicastro KR, Serrão E, Zardi GI (2012) First record of the brown mussel (*Perna perna*) from the European Atlantic coast. *Mar Biodivers Rec* 5: 39
- Luna GM, Vignaroli C, Rinaldi C, Pusceddu A, Nicoletti L, Gabellini M, Danovaro R, Biavasco F (2010) Extra intestinal *Escherichia coli* carrying virulence genes in coastal marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 76 : 5659-5668
- Luna Get al (2012) A new molecular approach based on qPCR for the quantification of fecal bacteria in contaminated marine sediments. *J biotechnol* 157:446-453

## **M**

- Madeira F, Park YM, Lee J et al (2019) The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic* 709 *Acids Res* 47:W636-W641
- Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA (2012) (Eds.) *Brock Biology of Microorganisms*, 13th ed. Pearson: London, UK, pp 1032
- Magana-Arachchi DN, Wanigatunge RP (2020) Ubiquitous waterborne pathogens. In *Waterborne Pathogens* Butterworth-Heinemann. Pp 15-42
- Malham SK, Rajko-Nenow P, Howlett E, Tuson KE, Perkins TL, et al (2014) The interaction of human microbial pathogens, particulate material and nutrients in estuarine environments and their impacts on recreational and shellfish waters. *Environ Sci Process Impact* 16: 2145–2155

## *Références bibliographiques*

- Maravić A, Šamanić I, Šprung M, Fredotović Ž, Ilić N, Dragičević J, Puizina J (2018) Broad-spectrum resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from shellfish: infrequent acquisition of novel resistance mechanisms. *Environ Monit Assess* 190:81
- Margulis L (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale University Press, New Haven, CT
- Martínez ML, Intralawan A et al (2007) The coasts of our world: Ecological, economic and social importance. *Ecol econ* 63:254-272
- McCombie-Richard W, Richard-McPherson D, Elaine-Mardis R (2019) Next-generation sequencing technologies."Cold Spring Harb perspec med 9: a036798
- McKee AM, Cruz MA (2021) Microbial and Viral Indicators of Pathogens and Human Health Risks from Recreational Exposure to Waters Impaired by Fecal Contamination. *J Sustain Built Environ* 7:03121001
- Mebarki A (2000) Low water flows, effluents and protection of water resources in the Mediterranean basins of eastern Algeria. In *Geocarrefour* 75: 399-416
- Mechaymech A (2002) Valorisation des boues de dragage - Application : Port autonome de Dunkerque. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d' Études Approfondies (DEA), Université d'Artois
- Micklem JM, Griffiths CL, Ntuli N, Mwale M (2016) The invasive Asian green mussel *Perna viridis* in South Africa: all that is green is not viridis. *Afr J Mar* 38: 207-215
- Mika KB et al (2009) Pilot- and bench-scale testing of faecal indicator bacteria survival in marine beach sand near point sources. *J Appl Microbiol* 107:72-84
- Mishra M, Arukha AP, Patel AK, Behera N, Mohanta TK, Yadav D (2018) Multi-drug resistant coliform: water sanitary standards and health hazards. *Front Pharmacol* 9:311
- Molina F, López-Acedo E, Tabla R, Roa I, Gómez A, Rebollo JE (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC biotechnol* 15: 1-9
- Monticelli LS, Decembrini F, Bergamasco A, Caruso G (2019) Water quality assessment of transitional and coastal marine Sicilian waters (Italy): ecological and epidemiological significance of multiple antimicrobial resistant *Enterococcus* spp. *Estuar Coast Shelf Sci* 217:173–184
- Moreira R, Rebeca P et al (2018) Bivalve transcriptomics reveal pathogen sequences and a powerful immune response of the Mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar Biol* 165:1-20
- Morrison CM., Armstrong AE, Evans S, Mild RM, Langdon CJ, Joens LA (2011) Survival of *Salmonella* Newport in oysters. *Int J Food Microbio* 148:93-98
- Murchie LW, Cruz-Romero M, Kerry JP, Linton M, Patterson MF, Smiddy M, et al (2005) High pressure processing of shellfish: a review of microbiological and other quality aspects. *Innov Food Sci Emerg Technol* 6 : 257-270

## **N**

- Nagvenkar GS, Ramaiah N (2009) Abundance of sewage-pollution indicator and human pathogenic bacteria in a tropical estuarine complex. *Environ Monit Assess* 155 :245–256

## *Références bibliographiques*

- Neogi SB, Yamasaki S, Alam M, Lara RJ (2014) The role of wetland microinvertebrates in spreading human diseases. *Wetl Ecol Manag* 22:469–491
- Nevers M, Byappanahalli M, Phanikumar M, Whitman R (2016) Fecal indicator organism modeling and microbial source tracking in environmental waters, p 3.4.6-1-3.4.6-16. In: Yates M, Nakatsu C, Miller R, Pillai S (eds) *Manual of Environmental Microbiology*, Fourth edn. ASM Press, Washington
- Neves RA, Santiago TC, Carvalho WF, dos Santos SE, da Silva PM, Nascimento SM (2019) Impacts of the toxic benthic dinoflagellate *Prorocentrum lima* on the brown mussel *Perna perna*: shell-valve closure response, immunology, and histopathology. *Mar Environ Res* 146:35–45
- Noble RT, Lee IM, Schiff KC (2004) Inactivation des micro-organismes indicateurs à partir de diverses sources de contamination fécale dans l'eau de mer et l'eau douce. *J Appl Microbiol* 96: 464–472
- Noor NM, Nursyam H, Widodo MS, Risjani Y (2019) Identification of green mussel from Lampung Bay, Indonesia by using a morphological and molecular approach. *Biosci Res* 16: 1395-1404
- NSSP: National Shellfish Sanitation Program (2017) Guide for the Control of Molluscan Shellfish: 2017 Revision. United States Food and Drug Administration (FDA). <https://www.fda.gov/media/117080/download>. Accessed 3 June 2019

## **O**

- O'Hara Z, Crossan C, Craft J, Scobie L (2018) First report of the presence of hepatitis E virus in Scottish-harvested shellfish purchased at retail level. *Food Environ Virol* 10:217–221
- Okeyo AN, Nontongana N, Fadare TO, Okoh AI (2018) *Vibrio* species in wastewater final effluents and receiving watershed in South Africa: implications for public health. *International journal of environmental research and public health* 15:1266
- Oliveira J, et al (2011) Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives—A mini-review. *Food Control* 22:805-816
- Oliveira SSA, Sorgine MHF, Bianco K, Pinto LH, Barreto C, Albano RM et al (2016) Detection of human fecal contamination by *nifH* gene quantification of marine waters in the coastal beaches of Rio de Janeiro, Brazil. *Environ Sci Pollut Res* 23:25210–25217
- Oliveira MJS, Beasley CR, Barros NGV, do Socorro Marques-Silva N, de Simone LRL, Lima ES, Tagliaro CH (2017) Two African origins of naturalized brown mussel (*Perna perna*) in Brazil: past and present bioinvasions. *Hydrobiologia* 794: 59-72
- Omrane I et al (2009) Étude de l'influence des facteurs environnementaux sur la distribution de différentes populations bactériennes dans une station mytilicole de la lagune de Bizerte (Nord-Tunisie). *Revue des sciences de l'eau/Journal of Water Science* 22:79-91
- O.M.S (1983) Les méthodes microbiologiques de surveillance de la qualité des eaux cotières-Troisième rapport sur une réunion mixte
- Ouali N, Belabed BE, Chenchouni H (2018) Modelling environment contamination with heavy metals in flathead grey mullet *Mugil cephalus* and upper sediments from north African coasts of the Mediterranean Sea. *Sci Total Environ* 639:156-174

## *Références bibliographiques*

Ozkan D, Dagdeviren M, Katalay S, Guner A, Yavasoglu NU (2017) Multi-biomarker responses after exposure to pollution in the Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis* L.) in the aegean coast of Turkey. Bull Environ Contam Toxicol 98:46–52

### **P**

Pachepsky YA, Shelton DR (2011) *Escherichia coli* and fecal coliforms in freshwater and estuarine sediments. Crit Rev Env Sci Tec 41 :1067–1110

Pallary P (1921) Histoire de la moule d'Afrique. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle d'Afrique du Nord 5: 105-115

Palos Ladeiro M, Aubert D, Villena I, Geffard A, Bigot A (2014) Bioaccumulation of human waterborne protozoa by zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): interest for water biomonitoring. Water Res 48 :148–155

Paquin B, Laforest MJ, Forget L, Roewer I, Wang Z, Longcore J, Lang BF (1997) The fungal mitochondrial genome project: evolution of fungal mitochondrial genomes and their gene expression. Curr Genet 31: 380-395

Pasquaud S (2006) Les relations trophiques : éléments de structuration des peuplements ichtyologiques en milieu estuarien. Thèse de Doctorat. Université de Bordeaux. pp 361

Patwardhan A, Ray S, Roy A (2014) Molecular markers in phylogenetic studies-a review. J. phylogenetics evol boil 2:2

Perkins TL et al. (2014). Sediment composition influences spatial variation in the abundance of human pathogen indicator bacteria within an estuarine environment. PLoS ONE 9:112951

Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A (2009) Generations of sequencing technologies. Genomics., 93: 105-111

Phillips MC, Solo-Gabriele HM, Piggot AM., Klaus JS, Zhang Y (2011) Relationships between sand and water quality at recreational beaches. Water Res.45 : 6763–6769

Pitkanen T, Hanninen ML (2017). Members of the family Campylobacteraceae: *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*. Global Water Pathogen Project. Available at: (<http://www.waterpathogens.org/book/campylobacter>)

Plano LR, Shibata T, Garza AC et al (2013) Human-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a subtropical recreational marine beach. Microb Ecol 65:1039–1051

Plazzi F, Passamonti M (2010) Towards a molecular phylogeny of Molluscs: bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. Mol Phylogenet Evol 57:641–657

Poharkar K, Doijad S, Kerkar S, Barbuddhe S (2017) Pathogenic bacteria of public health significance in estuarine mangrove ecosystem. In: Naik, Dubey (eds) Mar Poll Microb Remed. Springer, Sangapore. pp 239–253

Pommeuy M, Le Guyader F, Miossec L et al (2001) Le devenir des microorganismes en zones côtières. Tech sci Meth 11: 31-38

## Références bibliographiques

Pomykała R, Michalski M, Józwiak A, Osek J (2012) Microbiological and marine biotoxins contamination of raw bivalve molluscs commercially available in Poland. *Bull Vet Inst Pulawy* 56:563–568

Pote J, Haller L, Kottelat R, Sastre V, Arpagaus P, et al. (2009) Persistence and growth of faecal culturable bacterial indicators in water column and sediments of Vidy Bay, Lake Geneva, Switzerland. *J Environ Sci (China)* 21: 62–69

### R

Rajagopal S, Venugopalan VP, Van der Velde G, Jenner HA (2006) Greening of the coasts: a review of the *Perna viridis* success story. *Aquat Ecol* 40: 273-297

Rajapaksha, P, et al (2012) A review of methods for the detection of pathogenic microorganisms. *Analyst* 144: 396-411

Rajwa B, Dundar MM, Akova F, Bettasso A, Patsekina V, Hirleman ED, Bhunia AK, Robinson JP (2010) Discovering the unknown: Detection of emerging pathogens using a label-free light-scattering system. *Cytometry A* 77 : 1103–1112

Rakin A, Garzetti D, Bouabe H, Sprague LD (2015) *Yersinia enterocolitica*. In *Molecular Medical Microbiology Academic Press*. pp 1319-1344

Reis-Filho JS (2009) Next-generation sequencing. *Breast Cancer Res* 11:1-7

Rincé A, Balière C, Hervio-Heath D et al (2018) Occurrence of bacterial pathogens and human noroviruses in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. *Front Microbiol* 9:2443

Robertson LJ (2007) The potential for marine bivalve shellfish to act as transmission vehicles for outbreaks of protozoan infections in humans: a review. *Int J Food Microbiol* 120:201–216

Robinson RK, Richard K (2014), *Encyclopedia of food microbiology*. Academic press

Rodier J, Bazin C, Legube B, Merlet N, Brunet R (2009). *L'analyse de l'eau (Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer) (Technique et ingénierie)*. Ed. Dunod, 9ème Edition, Paris.pp1579

Rozen Z, Belkin S (2001) Survival of enteric bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:513-529

Rusch B (2010) Étude spectroscopique en conditions hydrodynamiques contrôlées du transfert des espèces organiques à l'interface minéral/solution. Thèse, Université Henri Poincaré, Nancy

### S

Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, Van Dijk JM, Laurent F et al (2013) Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance* 18:20380

Sahlstrom L, Aspa A, Bagge E, Tham MLD, Albiñá A (2004) Bacterial pathogen incidences in sludge from Swedish sewage treatment plants. *Water Res* 38:1989-1994

Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG (2011) Salmonella infections: an update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis* 9:263–277

## *Références bibliographiques*

- Santhiya G, Lakshumanan C, Selvin J, Asha D (2011) Microbiological analysis of seawater and sediments in urban shorelines: occurrence of heavy metals resistance bacteria on Chennai beaches, Bay of Bengal. *Microchem J* 99:197–202
- Scheutz F, Strockbine NA (2015) *Escherichia*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 1:49
- Selleck EM, Van Tyne D, Gilmore MS (2019) Pathogenicity of enterococci. *Microbiol spectr* 7:4
- Streeter K, Katouli M (2016) *Pseudomonas aeruginosa*: a review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. *Infect Epidemiol Med* 2:25–32
- Siddall EE (1980) A clarification of the genus *Perna* (Mytilidae). *Bull Mar Sci* 30: 858-870
- Silva EP, Souza RC, Lima TA, Fernandes FC, Macario KD, Netto BM, Duarte MR (2018) Zooarchaeological evidence that the brown mussel (*Perna perna*) is a bioinvader of coastal Brazil. *The Holocene* 28: 1771-1780
- Small C, Nicholls RJ (2003) A global analysis of human settlement in coastal zones. *J. Coast. Res.* 19 :584–599
- Singh J et al (2014) A critical review on PCR, its types and applications. *Int J Adv Res Biol Sci* 1.7 65-80.
- Sokolowski A, Bawazir AS, Wolowicz M (2004) Trace metals in the brown mussel *Perna perna* from the coastal waters off Yemen (Gulf of Aden): How concentrations are affected by weight, sex, and seasonal cycle. *Arch Environ Contam Toxicol* 46: 67-80

## **T**

- Tallon P et al (2005) Microbial indicators of faecal contamination in water: a current perspective. *Water air soil pollut* 166: 139-166
- Telailia S (2014) Etude des oiseaux marins et côtiers du Nord Est algérien : écologie et biologie de la reproduction et impact de l'environnement sur les espèces nicheuses. Thèse de Doctorat d'El Tarf.pp180
- Thapaliya D, Hellwig EJ, Kadariya J, Grenier D, Jefferson AJ, Dalman M, Kennedy K, DiPerna M, Orihill A, Taha M, Smith TC (2017) Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on public recreational beaches in northeast Ohio. *Geo Health* 1:320–332
- Thupaki PMS, Phanikumar DJ, Schwab MB, Nevers, Whitman RL (2013) Evaluating the role of sedimentbacteria interactions on *Escherichia coli* concentrations at beaches in southern Lake Michigan. *J Geophys Res Oceans* 118 : 7049– 7065
- Tilburg CE, Jordan LM, Carlson AE, Zeeman SI, Yund PO (2015) The effects of precipitation, river discharge, land use and coastal circulation on water quality in coastal Maine. *R Soc Open Sci* 2:140429
- Topić N et al (2021) *Staphylococcus aureus*—An Additional Parameter of Bathing Water Quality for Crowded Urban Beaches. *Int J Env Res Pub He* 18: 5234

## *Références bibliographiques*

Torres-Bejarano F, González-Márquez LC, Díaz-Solano B, TorregrozaEspinosa AC, Cantero-Rodelo R (2018) Effects of beach tourists on bathing water and sand quality at Puerto Velero, Colombia. *Environ Dev Sustain* 20:255–269

Tyagi P, Bhide M (2020) History of DNA Sequencing. *Folia Vet* 64: 66

### **V**

Vakily JM (1989) The biology and culture of mussels of the genus *Perna*. ICLARM Studies and Reviews. International Center for Living Aquatic Resources Management, Manilla, Philippines.pp63

Van Cauteren D, Le Strat, Y, Sommen C, Bruyand M, Tourdjman M, Da Silva NJ et al (2017) Estimated annual numbers of foodborne pathogen-associated illnesses, hospitalizations, and deaths, France, 2008-2013. *Emerg Infect Dis* 23:1486

Vincy MV, Brilliant R, Pradeepkumar AP (2017) Prevalence of indicator and pathogenic bacteria in a tropical river of Western Ghats, India. *Appl Water Sci* 7:833–844

### **W**

Wanjugi P, Fox GA, Harwood VJ (2016) The interplay between predation, competition, and nutrient levels influences the survival of *Escherichia coli* in aquatic environments. *Microb Ecol* 72:526-537

Weber LI, Hildebrand CG, Clezar C (2009) No evidence of doubly uniparental inheritance in the brown mussel *Perna perna* from the RFLP analyses of the mitochondrial 16S rDNA. *Braz J Aquat Sci Tech* 13: 51-57

Whittman RJ, Flick GJ (1996) Microbial contamination of shellfish prevalence risk to human health and control strategies. *Annu Rev Public Health* 16:123-140

### **Y**

Yaghoubzadeh Z, Kaboosi H, Ghadikolaii FP, Safari R, Fattahi E (2020) The half maximal inhibitory concentration (IC 50) effect of protein hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin on enterotoxin A gene expression in *Staphylococcus aureus*. *Int J Pept Res Ther* 26:1–8

Yang SC, Lin CH, Aljuffali IA, Fang J (2017) Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Arch Microbiol* 199:811–825

Ye Y, Li J, Wu C (2015) Genetic diversity and population connectivity of the Asian green mussel *Perna viridis* in South China Sea, inferred from mitochondria DNA markers. *Biochem Syst Ecol* 61: 470-476

### **Z**

Zaouali J (1973) Note sur la présence de *Perna perna* L. (= *Mytilus africanus* Chemnitz) dans la région de Bizerte (Tunisie). *Bull Inst Océanogr. Pêche Salammbô* 2: 637-642

## *Références bibliographiques*

- Zegmout M, Basraoui Y, Meziane M, Chahlaouia A, Demnati S, Chafi A (2011) Pollution bactériologique de la zone côtière de Saidia / Moulouya (région orientale du Maroc). *Rev Microbiol Ind San Environn* 5: 71–78
- Zhang PA, Fernandes H (2014) Other Post-PCR Detection Technologies. 4074-4088
- Zieritz A, Gum B, Kuehn R, Geist J (2012) Identifying freshwater mussels (Unionoida) and parasitic glochidia larvae from host fish gills: a molecular key to the North and Central European species. *Ecol evol* 2: 740-750
- Zimmer-Faust AG et al (2017) Effect of freshwater sediment characteristics on the persistence of fecal indicator bacteria and genetic markers within a Southern California watershed. *Water research* 119: 1-11

### **Sites Internet**

1. <http://nca2014.globalchange.gov/report/regions/coasts/graphics/coastal-ecosystems-services>
2. <https://www.biodiversite.gouv.fr>
3. <https://www.media.sciencephoto.com/image>
4. <https://www.biomerieuxindustry.com>
5. <https://www.media.istockphoto.com/photos/vibrio-cholerae>
6. <https://www.allaboutfeed.net/wp-content/uploads/2020>
8. <https://www.2Fvideohive.com/shigella-sonnei>
9. <https://www.healthjade.net/yersinia-enterocolitica-infection>
10. [https://www. © 2020 Parlons sciences à partir d'une image d'Estevezj \[CC BY-sa\] via Wikimedia Commons.](https://www.©2020ParlonsSciences.com)
11. <https://www.gaz.wiki/wiki/fr/Evolutionary>
12. <https://www.larousse.fr/encyclopedie/images/Bivalves>
13. <http://www.biomerieux.com>
14. <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
15. <https://www.enpopulationdata.net/countries/algeria>

## ***ANNEXES***

## ANNEXE 1

Tableau 1 : Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (Eau).

Nombre de tubes positifs	Nombre de germes/100ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/100ml
001	3	300	23
010	3	301	39
100	4	302	64
101	7	310	43
110	7	311	75
111	11	312	120
120	11	320	93
200	9	321	150
201	14	322	210
210	15	330	240
211	20	331	460
220	21	332	1100
221	28	333	2400

Tableau 2 : Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (Sédiment, moule).

Nombre caractéristique	Nombre de germes/100ml	Nombre de germes/ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml
000	0,0	1,4	302	6,5
001	0,3	2,0	310	4,5
010	0,3	1,5	311	7,5
011	0,6	2,0	312	11,5
020	0,6	3,0	313	16,0
100	0,4	2,0	320	9,5
101	0,7	3,0	321	15,0
102	1,1	3,5	322	20,0
110	0,7	4,0	323	30,0
111	1,1	3,0	330	25,0
120	1,1	3,5	331	45,0
121	1,5	4,0	332	110,0
130	1,6	2,5	333	140,0
200	0,9	4,0		

ANNEXE 2

**Compositions des milieux de culture (g/ litre d'eau distillée) (Rodier et al. 2009)**

**Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB)**

Peptone : 10 g  
Lactose : 10 g  
Bile : 20 ml  
Vert brillant : 13 mg  
pH : 7,4

**Eau peptonée exempte d'indole**

Tryptone 9 g  
Chlorure de sodium 5 g  
Extrait de levure 1 g  
pH : 7,4

**Bouillon Rothe**

Peptone : 20,0 g  
Glucose : 5,0 g  
Azide : 0,2 g  
NaCl : 5,0 g  
Hydrogénophosphate de potassium : 2,7 g  
Dihydrogénophosphate de potassium : 2,7 g  
pH : 7,2

**Bouillon Litsky**

Peptone : 20,0 g  
Glucose : 5,0 g  
Azide : 0,2 g  
Ethyl-violet : 0,5 g  
NaCl : 5,0 g  
Hydrogénophosphate de potassium : 2,7 g  
Dihydrogénophosphate de potassium : 2,7 g  
pH final : 7.0 ± 0.2

**Gélose EMB (Éosine Bleu de Méthylène)**

Peptone (quelconque) : 10 g  
Lactose : 5 g  
Saccharose : 5 g  
Hydrogénophosphate de potassium : 2 g  
Eosine Y : 400 mg  
Bde méthylène : 65 mg  
Agar : 13,5 g

**Gélose Mac Conkey**

Peptone pancréatique de gélatine : 17 g  
Peptone pancréatique de caséine : 1,5 g  
Peptone peptique de viande : 1,5 g  
Lactose : 10 g  
Chlorure de sodium : 5 g  
Sels biliaires : 1,5 g  
Rouge neutre : 30 mg  
violet de gentiane : 1 mg  
Agar: 13, 5 g  
pH final : 7.4

**Gélose Chapman au mannitol**

Peptone : 10 g  
Extrait de bœuf : 1 g  
Chlorure de sodium : 75 g  
D-mannitol : 10 g  
Rouge de phénol : 25 mg  
Agar : 15 g  
pH final : 7.4

**Gélose au cétrimide**

Peptone de gélatine : 16,0 g  
Peptone de caséine : 10,0 g  
Bromure de tétradonium : 0,2 g  
Acide nalidixique : 15,0 mg  
Sulfate de potassium : 10,0 g  
Chlorure de magnésium : 1,4 g  
Agar : 10,0 g  
pH final : 7.3

**Bouillon nutritif**

Tryptone : 10 g  
Extrait de viande : 5 g  
Chlorure de sodium : 5 g  
pH final : 7,2

**Gélose TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Saccharose)**

Extrait de levure : 5 g  
Peptone bactériologique : 10 g  
Thiosulfate de sodium : 10 g  
Citrate de sodium : 10 g  
Bile de bœuf : 8 g  
Saccharose : 20 g  
Chlorure de sodium : 10 g  
Citrate ferrique : 1 g  
Bleu de bromothymol : 0.04g  
Bleu de thymol : 0,04g  
Agar : 14 g  
pH final : 8.6

**Eau peptonée alcaline (E.P.A)**

Peptone: 30g  
Chlorure de sodium: 30g  
pH = 8.6

**Bouillon sélénite-cystéine**

Peptone de caséine : 5 g  
Lactose : 4 g  
Phosphate disodique : 10 g  
Sélénite de sodium : 4 g  
Cystéine : 0.01 g  
pH final : 7

**Gélose Salmonella Shigella (SS)**

Extrait de viande de boeuf 5g  
Peptone 5g  
Lactose 10g  
Sels biliaires 8,5g  
Citrate de sodium 10g  
Thiosulfate de sodium 8,5g  
Citrate ferrique 1g  
Vert brillant 0,00033g  
Rouge neutre 0,025g  
Agar 15,0g  
pH final : 7.3

**Gélose luria bertani**

Tryptone : 10g  
Extrait de levure : 5g  
NaCl : 10g  
pH final : 7

**Composition des réactifs et des colorants**

**1. Réactif de Kovacs**

Diméthyl-amino-4 benzaldéhyde : 50 g  
Pentanol 1 (alcool amylique) : 750 ml  
HCl pur : 250 ml

**2. Violet de Gentiane**

Violet de gentiane : 1g  
Ethanol à 90% : 1 ml  
Phénol : 2 g

**3. Le Lugol**

Iode : 1g  
Iodure de potassium : 2 g  
Eau distillée : 100 ml

**4. La Fucshine**

Fuchsine basique : 1g  
Alcool éthylique : 100 ml  
Phénol : 15 g

**5. Réactif TDA**

Perchlorure de fer : 3.4g

Eau distillée : 100ml

**7. Réactif VPI**

Hydroxyde de potassium : 40g

Eau distillée : 100ml

**9. Réactif NIT I**

Acide sulfamilique 0.8 g

Acide acétique 5N 100 ml

**11. Réactif du rouge de méthyle**

Rouge de méthyle : 0.5 g

Alcool : 100ml

**13. Réactif ZYM B**

Fast Blue BB : 0.35 g

2-méthoxy éthanol : 100 ml

**6. Réactif IND**

Paradiméthylaminobenzaldéhyde : 5 g

Alcool isoamylique : 75 ml

HCL 37% : 25 ml Eau distillée

**8. Réactif VPII**

Alpha naphthol : 6g

Ethanol : 100 ml

**10. Réactif NIT II**

Naphtylamine : 0.5 g

Acide acétique 5N : 100 ml

**12. Réactif ZYM A**

Tris-hydroxyméthyl-aminométhane : 25 g

Acide chlorhydrique à 37 % : 11 ml

Laurylsulfate Na : 10 g

H<sub>2</sub>O : 100 ml





