



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2017

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

Domaine : SNV **Filière : Sciences Biologiques**
Spécialité : Eau, Santé et environnement

Présenté par :

HADADI Amina

Thème

*Extraction et évaluation de l'activité biologique des
substances actives de deux étoiles de mer Algériennes :
Echinaster sepositus et Ophidiaster ophidianus.*

Soutenu le : 22/06/ 2017

Devant le jury composé de :

<i>Nom et Prénom</i>	<i>Grade</i>		
DAHMOUNE Farid	MCA	Univ. de Bouira	Président
CHIBANE Mohamed	Pr	Univ. de Bouira	Promoteur
DAHMOUNE Bouchra	Magister	Univ. de Bouira	Co-promoteur
ZOUGGAGHE Fatah	MCA	Univ. de Bouira	Examineur

Année Universitaire : 2016/2017

REMERCIEMENTS

- ❖ Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier Dieu l'omniscient et l'omnipotent qui m'a donné la force, le courage et la volonté de l'accomplir.
- ❖ Je réserve une attention toute particulière au Professeur CHIBANE Mohamed mon promoteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma très vive reconnaissance pour sa disponibilité, son aide, ses conseils, ses qualités relationnelles et humaines mais aussi de mon profond respect et de ma grande admiration.
- ❖ J'ai l'honneur et le plaisir de présenter ma profonde gratitude et mes sincères remerciements à ma co-promotrice Mlle DAHMOUNE Bouchra, pour sa précieuse aide, Ses orientations et le temps qu'elle m'a consacré pour mon encadrement, sa disponibilité et son dévouement m'ont grandement faciliter la tâche et pour cela je la remercie vivement.
- ❖ J'exprime ma vive reconnaissance au docteur MOUNI Lotfi, directeur du laboratoire "Gestion et Valorisation Des Ressources Naturelles Assurance qualité" pour m'y avoir accueillie durant la réalisation de ce travail et m'avoir permis de le mener dans de bonnes conditions.
- ❖ Je tiens à remercier également le Docteur DAHMOUNE Farid qui a accepté de présider le jury, c'est un honneur pour moi de le voir siéger parmi les membres de jury de ce mémoire.
- ❖ Je voudrais exprimer ma gratitude au docteur Zougaghe Fatah qui a accepté avec bienveillance de participer au jury de ce mémoire et qui m'a fait l'honneur d'examiner mon travail.
- ❖ Mes remerciements vont à toutes les personnes du laboratoire GVRNAQ en particulier Wahida et Mr Chedri pour leur aide et leur soutien.
- ❖ Enfin, je présente mes sincères remerciements à mes enseignants qui se sont efforcé de nous prodiguer un enseignement de qualité tout au long de ces cinq années passées à l'université d'Akli Mohand Oulhadj de Bouira, vous êtes non seulement des modèles mais aussi une source d'inspiration et d'admiration que je m'efforcerai à suivre durant toute ma vie.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :



Ma très chère mère, affable, honorable, aimable : tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance.



Mon cher père, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.



À la mémoire de mon adorable grand mère qui nous a quitté trop tôt, ton départ a provoqué une cassure irréparable en moi. J'espère que tu regardes de là où tu es la femme que je suis devenue et que tu en es fière.



À mes rares amis, je vous remercie de votre soutien, votre présence et les éclats de rires qui m'ont réconforté et permis d'avancer durant les moments les plus ingérables.



À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer ...

"Soit A = un succès dans la vie. Alors $A = X + Y + Z \dots$ X = travailler. Y = s'amuser. Z = se taire". Albert Einstein

Liste des abréviations

® : marque enregistrée.

A : Absorbance.

Bar : unité de mesure de la pression.

BN : Bouillon nutritif.

C : Concentration.

CH₂CL₂ : Dichlorométhane.

CHCL₃ : Chloroforme.

CuSO₄ : Sulfate de cuivre.

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl.

E : Extrait

EA : Extrait aqueux

EB : Phase aqueuse de l'extrait dichlorométhanique.

EC : Phase organique de l'extrait dichlorométhanique.

GN : Gélose nutritive.

H₂O : Eau distillée.

H₂SO₄ : Acide sulfurique.

HPLC : Chromatographie en phase liquide à haute performance.

IGS : Indice gonadosomatique

KCL : Chlorure de potassium.

KH₂PO₄ : Phosphate de monopotassium.

MeOH : Méthanol.

Na₂CO₃ : Carbonate de sodium.

Na₂HPO₄ : Hydrogénophosphate de sodium.

NaCl : Chlorure de sodium.

NaOH : Hydroxyde de sodium.

PBS : Phosphate buffered saline.

Pgo : Poids des gonades

Pt : Poids corporel total

r : Taille du disque central.

R : Moyenne de la taille des bras.

R/r : Rapport entre la moyenne de la taille des bras et la taille du disque central.

™ : TradeMark (marque déposée).

UV : Ultra-Violet.

WORMS : World Register of Marine Species

λ : Longueur d'onde.

Noms des genres et des organes

CAE : Cæca pyloriques.

E. : Escherichia.

E1 : *Ophidiaster ophidianus*.

E2 : *Echinaster sepositus*.

EST : Estomac.

GON : Gonades.

S. : Staphylococcus.

TEG ABO : Tégument aboral.

TEG ORL : Tégument oral.

Unités de mesure

nm : Nanomètre.

Tr/min : Tour par minute.

Liste des figures	Pages
Figure 1 : Diversité des échinodermes	3
Figure 2 : Principales structures anatomiques d'une étoile de mer	8
Figure 3 : Structure basique d'un pied tubulaire	9
Figure 4 : Représentation du madrépore d'une astérie.....	10
Figure 5 : Structures digestives dans une étoile de mer.	12
Figure 6 : Une astérie se nourrissant d'une moule.....	12
Figure 7 : Représentation du système ambulacraire d'une astérie.....	13
Figure 8 : Répartition des gonades matures sur les bras d' <i>Echinaster sepositus</i>	14
Figure 9 : Développement d'une étoile de mer après fécondation	15
Figure 10 : Stéroïls isolés à partir d'étoiles de mer	20
Figure 11 : Structure des saponines stéroïdiennes et triterpéniques.....	21
Figure 12 : Caroténoïdes majeures décrites chez les astérides	22
Figure 13 : Les étoiles de mer (a): <i>Ophidiaster ophidianus</i> , (b): <i>Echinaster sepositus</i>	24
Figure 14 : Localisation de la zone de prélèvement des étoiles de mer.	24
Figure 15 : Interface de World Register of Marine Species	25
Figure 16 : Mesures biométriques réalisées sur les individus d'étoiles de mer	25
Figure 17 : Schéma récapitulatif des expériences menées sur les étoiles de mer	26
Figure 18 : Constituants anatomiques prélevés des deux genres d'étoiles de mer	27
Figure 19 : Schéma récapitulatif des principes d'extraction de substances actives et activités biologiques testées.....	30
Figure 20 : Récapitulatif du protocole de l'évaluation de l'activité hémolytique.....	34
Figure 21 : Illustration de la méthode de diffusion sur milieu solide.....	32
Figure 22 : Test positif pour la présence des terpénoïdes.....	40
Figure 23 : Courbe d'étalonnage établie à partir d'une saponine standard.....	42
Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits de saponines des gonades des deux genres d'étoiles de mer	48
Figure 25 : Zones d'inhibition des extraits de caroténoïdes des gonades des deux étoiles de mer	49

Liste des formules	Pages
(1) Calcul de l'indice gonadosomatique	25
(2) Calcul de l'indice de mousse	32
(3) Calcul du pourcentage d'hémolyse	34
(4) Calcul du pourcentage d'inhibition (activité antioxydante)	35

Tableau I : Caractéristiques des deux espèces prises en compte pour l'étude.....	17
Tableau II : Les principales métabolites secondaires isolées à partir d'organismes marins.....	18
Tableau III : Mesures biométriques des deux étoiles de mer <i>Echinaster sepositus</i> et <i>Ophidiaster ophidianus</i>	38
Tableau IV : Résultats des caractérisations qualitatives de substances actives dans l'extrait A.....	39
Tableau V : Résultats des caractérisations qualitatives de substances actives dans l'extrait B.....	40
Tableau VI : Résultats des caractérisations qualitatives des substances actives dans l'extrait C.....	41
Tableau VII : Concentrations des saponines dans les extraits organiques des deux étoiles de mer.....	43
Tableau VIII : Pourcentage d'hémolyse des extraits d' <i>Echinaster sepositus</i> et d' <i>Ophidiaster ophidianus</i>	44
Tableau IX : Pourcentage d'inhibition des extraits de caroténoïdes purifiées des deux étoiles de mer.....	46
Tableau X : l'activité antibactérienne in vitro obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu solide.....	47

Sommaire

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des formules

Liste des tableaux

Introduction 1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1. Les échinodermes, Asteroidea 3

 I.1.1 Les échinodermes 3

 I.1.1.1 Généralités sur les échinodermes 3

I.2. Classe des Asteroidea 5

 I.2.1. Généralités 5

 I.2.2. Classification 5

 I.2.3. Ecologie des Astérides 7

 I.2.3.1. Distribution et densité des Astérides 7

 I.2.3.2. Prédation et mode de défense 7

 I.2.3.3. Comportement 7

I.3. Morphologie externe et interne d'une "étoile de mer" 7

 I.3.1. Morphologie externe 7

 I.3.1.1. Le tégument 8

 I.3.1.2. L'endosquelette 11

 I.3.2. Organisation interne 11

 I.3.2.1. Système digestif 11

 I.3.2.2. Cavités cœlomique 13

 I.3.2.3. Système ambulacraire 13

 I.3.2.4. Organes génitaux 14

 I.3.2.5. Système nerveux, circulatoire et excréteur 15

Sommaire

I.4. Pêche, commercialisation et consommation	16
I.5. Rôle écologique, biologique et pharmaceutique des "étoiles de mer"	16
I.5.1. Rôle écologique	16
I.5.2. Rôle biologique	16
I.5.3. Rôle pharmaceutique	16
I.6. Les espèces prises en compte pour l'étude	17
I.7. Substances actives des échinodermes	18
I.7.1. Les stéroïdes	19
I.7.2. Les stérols	19
I.7.3. Les glycosides	20
I.7.4. Les astérosaponines	20
I.7.5. Les pigments	21
I.7.6. Les alcaloïdes	22
I.7.7. Les glycolipides	22

Chapitre II : Matériel et méthodes

II. Matériel et méthode	24
II.1. Récolte et observation du matériel biologique	24
II.2. Reconnaissance des espèces et actualisation systématique	25
II.3. Mesures biométriques et dissection	25
II.4. Extraction, fractionnement et purification des substances actives	27
II.4.1. La congélation	27
II.4.2. La lyophilisation	27
II.4.3. Broyage	27
II.4.4. Extraction des substances actives	27
II.4.5. Purification de l'extrait C	28
II.4.5.1. Purification de l'extrait C et isolement des saponines	28

Sommaire

II.4.5.2. Purification de l'extrait C et B et isolement des caroténoïdes	29
II.5. Caractérisation des substances actives	31
II.5.1. Caractérisation qualitative	31
II.5.1.1. L'extrait A	31
II.5.1.2. L'extrait B	31
II.5.1.3. L'extrait C.....	31
II.5.2. Caractérisation quantitative des saponines	33
II.6. Les activités biologiques	33
II.6.1. L'activité hémolytique	33
II.6.1.1. Préparation du PBS	33
II.6.1.2. Préparation de la suspension érythrocytaire.....	33
II.6.1.3. Test d'hémolyse	34
II.6.2. L'activité antioxydante	35
II.6.2.1. Test au DPPH	35
II.6.3. L'activité antibactérienne	35
II.6.3.1. Méthode de diffusion en milieu solide	36
II.7. Etude statistique	37

Chapitre III : Résultats et discussion

III. Résultats et discussion	38
III.1. Mesures biométriques	38
III.2. Caractérisation des substances actives	39
III.2.1. Caractérisation qualitative	39
III.2.1.1. L'extrait A	39
III.2.1.2. L'extrait B	39

Sommaire

III.2.1.3. L'extrait C	41
III.2.1.4. Test de saponification et indice de mousse.....	42
III.2.2. Caractérisation quantitative	42
III.2.2.1. Les saponines	42
III.3. Les activités biologiques	44
III.3.1. Activité hémolytique des extraits de saponines	44
III.3.2. Activité antioxydante des caroténoïdes	45
III.3.3. Activité antibactérienne	47
Conclusion	50
Bibliographie	
Annexes	
Glossaire	
Résumé	

Introduction

L'océan, également appelé l'origine de la vie représente une source inépuisable de composés naturels structurellement uniques et aux vertus pharmaceutiques inégalées, ces substances sont pour la plupart accumulés chez les organismes vivants et se montrent pour le peu déjà isolé extrêmement utiles dans l'invention et la découverte de nouveaux produits bioactifs. Jusqu'à il y a quelques années la recherche et l'utilisation de produits naturels marins en tant qu'agent pharmaceutiques en était encore à ses balbutiements, cela peut être du au manque d'informations et aux difficultés liées à la collecte des organismes marins, mais avec le développement de nouvelles techniques de plongées et de machines contrôlables à distance, la collecte d'échantillons marins est devenue possible ce qui a conduit à la découverte de plus de 5000 nouveaux composés isolés des eaux peu profondes à 900 m de profondeur (Jha et Zi-Rong, 2004).

Il existe plusieurs travaux s'ayant intéressé aux activités biologiques des étoiles de mer, notamment leur activité antioxydante (Suguna *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Hémolytique (Lee *et al.*, 2013; Ivanchina *et al.*, 2000). Et antibactérienne (Prabhu et Bragadeeswaran, 2013; Chamundeeswari *et al.*, 2012). Ces travaux sont plus rares en Algérie. En raison de ce manque et dans le souci de contribuer à cette thématique, notre intérêt s'est porté sur deux genres d'étoiles de mer méditerranéennes fréquentes sur les côtes algériennes à savoir *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*.

Notre travail a consisté à déceler l'aptitude de ces organismes à produire des métabolites secondaires pouvant avoir un potentiel pharmaceutique et servir à l'élaboration de nouveaux médicaments à vertus prometteuses par le biais de tests de leurs activités biologiques.

La plupart des recherches déjà existantes sont axées sur le corps entier de l'animal moins sur ses constituants anatomiques séparés, ce travail s'inscrit dans cette optique, il porte à extraire les substances actives présentes dans les différents organes d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* dans le but de mieux comprendre l'activité de ces molécules selon le rôle de chaque organe, pour se faire, cinq compartiments anatomiques ont été auditionnés notamment : les téguments oraux et aboraux les cæca pyloriques, les gonades et enfin l'estomac.

Les objectifs majeurs de ce travail sont :

- ❖ L'extraction de substances actives à partir de deux étoiles de mer *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*.
- ❖ Détermination de l'hétérogénéité inter-organes de la distribution des substances actives.
- ❖ L'étude de trois activités biologiques des différents extraits isolés à partir de nos deux étoiles de mer notamment l'activité antioxydante, hémolytique et antibactérienne.

La présente étude comporte trois parties

- ❖ La première partie intitulée "synthèse bibliographique" elle s'intéresse à la biologie et à l'écologie des échinodermes plus spécialement les astéries mais elle traite également des métabolites secondaires majeurs isolés à partir d'étoiles de mer.
- ❖ La deuxième partie intitulée "Matériel et méthodes", consacrée au matériel exploité, les protocoles expérimentaux utilisés pour l'extraction des substances actives et aux essais effectués sur l'activité antioxydante, hémolytique et antibactérienne ainsi que les techniques d'analyses correspondantes.
- ❖ La troisième partie "Résultats et discussion" qui retrace les résultats majeurs relatifs à l'extraction des substances actives et aux activités biologiques testées.

Et nous clôturerons ce travail par une conclusion générale et des perspectives.

I. Synthèse bibliographique

I.1. Les échinodermes, Asterozoa

I.1.1. Les échinodermes

I.1.1.1. Généralités sur les échinodermes

Les Échinodermes (du grec échine = épine, et derma = peau) sont des métazoaires, deutérostomiens, épithélioneuriens (Arab *et al.*, 2013). Ils forment un vaste phylum du règne animal, avec environ 7 000 espèces, c'est même le plus vaste englobant des invertébrés exclusivement marins et dont la quasi-totalité des représentants sont benthiques (**Fig. 1**). ils possèdent une distribution géographique très large, en effet on les retrouve dans toutes les mers du monde et à différentes profondeurs, des rivages aux grandes abysses, ce sont des animaux à tailles très variables allant de dix centimètres de longueur ou de diamètre pour les plus petits jusqu'à deux mètres comme certains concombres et étoiles de mer sans parler des plus grands échinodermes éteints et dont les tiges pouvaient dépasser les 20 mètres de longueur (Kornprobst, 2005).

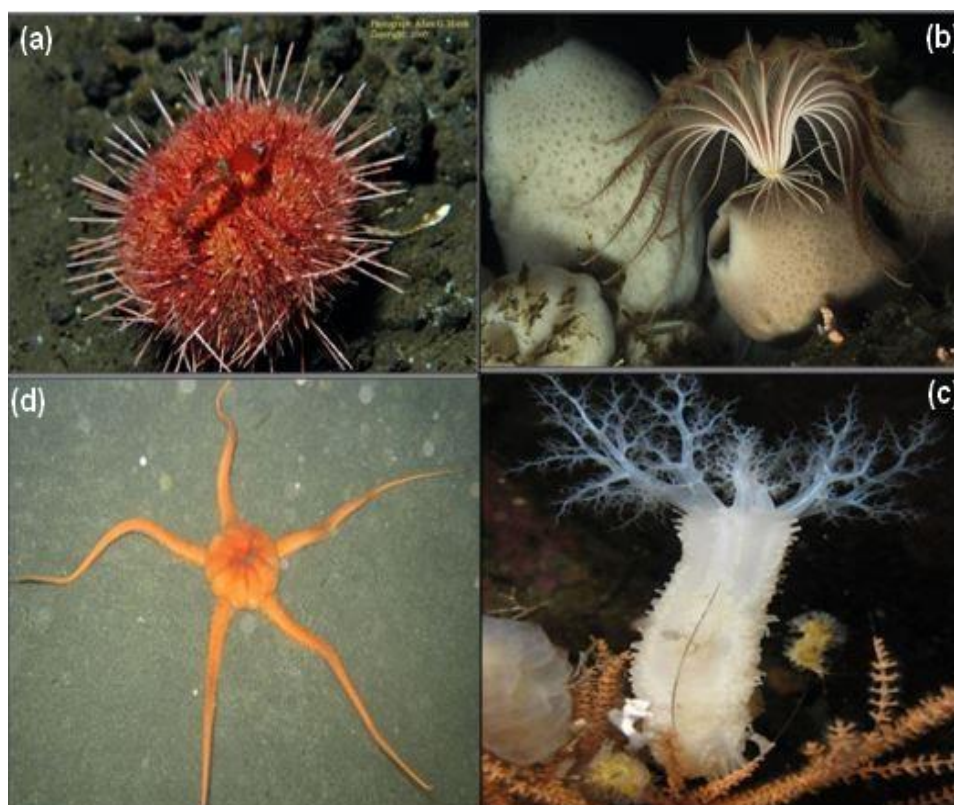


Figure 1 : Diversité des échinodermes, (a) : L'oursin *Sterechinus neumayeri* (b) : Le Crinoïde *Promachocrinus kerguelensis* (c) : Le concombre des mers *Cucumaria* (d) : L'ophiure *Ophiinotus victoriae* (Brueggeman, 1998).

L'origine de ce phylum remonte au Cambrien, ce qui en fait un des plus anciens groupes du règne animal, étant initialement asymétriques ou bilatéraux, la symétrie pentamère aurait fait son apparition pour des raisons que n'expliquent pas les scientifiques, toutefois, des études embryologiques les considère comme de proches parents des groupes annonçant les vertébrés (Menou *et al.*, 1986).

Il n'existe aucun autre invertébré ayant la complexité du squelette des échinodermes, celui-là même responsable d'une large gamme dans leurs variétés. (Khanna, 2005) Il se compose de monocristaux de calcites (CaCO₃), ces derniers s'organise soit en en réseau léger mais résistant à l'intérieur des tissus de l'animal, soit comme observé chez les oursins en plaques calcaires formant un "test" (forme de carapace) que recouvre une fine couche de cellules, ou alors comme chez les holothuries chez qui le squelette est diffus et composé de spicules disséminés dans le tégument. De nombreux échinodermes sont pourvus de piquants, d'épines ou d'autres protubérances. (Menou *et al.*, 1986; Arab *et al.*, 2013;). Ce système diffère de celui des squelettes d'autres animaux ou les cristaux sont incorporés dans une matrice organique, cela leur permet notamment d'augmenter leur taille sans se mouvoir (Enay, 1993). Ils ont un grand pouvoir de régénération à condition qu'il existe une partie de leur disque central. Ces caractéristiques les isolent largement des autres invertébrés et leur confère une position indépendante (Khanna, 2005).

Les échinodermes se nourrissent de diverses manières. Certains avalent le sable et les sédiments du fond marin digérant ainsi la matière organique qui s'y trouve, d'autres se nourrissent de matières en suspension dans l'eau, mais il existe également des prédateurs qui chassent des proies vivantes, souvent des mollusques bivalves comme les palourdes (Gilpin, 2006). Les Astérides peuvent être carnivores, détritivores ou nécrophages et se montrent souvent particulièrement voraces comme la célèbre couronne d'épines *Acanthaster planci* qui consomme exclusivement des polypes coralliens et qui est en partie à l'origine des dégâts infligés à la grande barrière de corail. Certaines étoiles de mer se nourrissent d'autres échinodermes comme l'espèce *Solaster stimpsoni* qui consomme uniquement les Holothuries (Kornprobst, 2005).

Ce sont des animaux gonochoriques comme il a pu être constaté par l'observation de la structure des gonades, mais les deux sexes sont difficilement distinguables en se basant uniquement sur leur apparence extérieure (Dirk, 1970). Ils se reproduisent par la libération d'un nombre important de gamètes dans l'eau (10⁶_10⁷). Les larves sont bilatéralement symétriques et subissent une altération drastique à la métamorphose, durant laquelle les côtés gauche et droit de la larve se transforment en surface orale et aborale de l'individu adulte cette fois radialement symétrique (Corning *et al.*, 1975).

L'embranchement des échinodermes se divise en deux sous-phylums : les Pelmatozoaires et les Eleuthérozoaires (Arab *et al.*, 2013). Les premiers comprenant les crinoïdes et les deuxièmes qui englobent cinq classes vivantes (Les astérides, les Ophiures, Les crinoïdes, Les Echinides, les Holothurides). les étoiles de mer (classe des

Asteroidea) comprenant environ 1800 espèces vivantes), ces dernières ont cinq bras (ou plus) creux et rayonnant d'un corps centrale ou disque, les Ophiures (classe des Ophiuroidea) qui comptent environ 700 espèces vivantes. La classe Crinoidea qui se distingue par la forme d'un végétal ce qui lui a valu le nom de "Lys de mer" elle compte environ 700 espèces, La classe des Echinoidea représentée en grande partie par les oursins, cette classe renferme approximativement 900 espèces vivantes, elles se caractérisent par l'absence de bras, en effet le corps est équipé d'épines mobiles de différentes tailles. La classe des Holothuroidea ou concombres de mer, avec environ 1200 espèces vivantes, ils possèdent une forme plus ou moins cylindrique, sont dépourvus de bras et d'épines et leur bouche est entourée d'un anneau de tentacules (Dirk, 1970).

I.2. Classe des Asteroidea

I.2.1. Généralités

La classe "Asteroidea" (aussi appelée étoile de mer) est l'une des plus diversifiées du phylum Echinodermata, Elle englobe près de 1900 espèces regroupées en 36 familles et environ 370 genres. Ce sont les échinodermes les plus familiers pour le grand public, leur forme unique les rend faciles à identifier et à différencier des autres créatures marines. La plupart des étoiles de mer possèdent cinq bras épais plus ou moins individualisés mais certaines peuvent en avoir plus (Gilpin, 2006). La surface est généralement rugueuse avec des pointes épineuses, elle recouvre une couche de plaque calcaire (Macalister et Packard, 1879). Les astérides pour la plupart possèdent un taux de régénération très élevé, un nouvel animal peut être régénéré à partir d'un seul bras si une partie du disque central est indemne, La bouche est située sur la surface ventrale ou orale du disque, l'anus si présent est quant à lui sur la surface aborale (Yee Kwang *et al.*, 2009). Elles vivent à toutes les profondeurs de la zone intertidale à la zone abyssale (environ 6000 m) et sont présentes dans tous les océans du monde, mais on les retrouve en grande majorité dans les régions indopacifiques et dans les zones tropicales de l'atlantique (Mah et Blake, 2012).

I.2.2. Classification

Pendant longtemps les échinodermes ont été divisés en deux subphylums se basant sur leurs mode de vie, un subphylum sessile appelé Pelmatozoa et un autre englobant des formes libres connu sous le nom d'Eleutherozoa (Enay, 1993).

I.2.2.1. Subphylum - Pelmatozoa

Ce subphylum contient autant d'échinodermes éteints qu'existants, il se caractérise par la présence exclusive de la structure pentamérique, d'une bouche et d'un anus sur la surface orale de l'animal, de l'absence totale des pieds tubulaires et des appendices tubulaires ciliés qui lorsqu'ils sont présents sont dépourvus de ventouses. Ce subphylum est différencié en 5 classes bien distinctes et dont la plupart sont éteintes :

- Classe- Heterostelea.
- Classe- Blastoidea.
- Classe- Cystoidea.
- Classe- Edrioasteroidea.
- Classe- Crinoidea : Cette dernière inclue aussi bien des échinodermes éteints qu'existants.

I.2.2.2. Subphylum - Eleutherozoa

Ce subphylum englobe majoritairement des échinodermes toujours existants, ils ont une vie libre, possèdent habituellement la structure pentamérique, l'anus se trouve cette fois-ci sur la surface aborale, contrairement au système nerveux principal, qui lui se trouve sur la surface orale. Les sillons ambulacraires n'y ont pas pour fonction la collecte de la nourriture, mais jouent avec les pieds tubulaires munies de ventouses le rôle des organes principaux de locomotion, ce subphylum contient 4 classes vivantes :

- **Classe- Asteroidea** : Cette classe possède comme particularité, des individus ayant un corps en forme d'étoile, aplati, avec un disque central d'où rayonnent cinq bras, ces derniers portent les gonades, le prolongement des intestins du coelome et d'autres organes viscéraux.

La classification moderne divise la classe Asteroidea en 5 ordres, deux sont fossiles et les trois autres regroupent des échinodermes vivants :

- **Ordre- Phanerozonia** : Les représentants de cette classe possèdent des bras courts avec de larges bases et deux rangées de grandes plaques marginales, des papules limitées à la surface aborale, des pédicellaires généralement sessiles et des pieds tubulaires qui peuvent être dépourvus de ventouses, exemples : *Luidia*, *Oreaster*, *Astropecten*.
 - **Ordre- Spinulosa** : Cette classe se caractérise par la présence de 5 à 18 bras, d'un anus, de plaques marginales moins évidentes à distinguer, les pédicellaires y sont rares, et les pieds tubulaires sont toujours munis de ventouses, la surface aborale est tapissée de petites épines. Exemple : *Asterina*, *Solaster*, ***Echinaster*** (Brusca et Brusca, 2003).
 - **Ordre-Forcipulata** : Les plaques marginales ne sont pas visibles, le squelette aborale est en majeure partie réticulé avec des épines bien visibles. Les pieds tubulaires sont disposés en quatre rangées munies de ventouses et les deux surfaces sont tapissées de papules. Exemples : *Asterias*, *Heliaster*, *Brisingaster*.
 - **Ordre-Platysterida** : Cet ordre est éteint, il a pour particularité des bras avec des séries de longues ossicules interambulacraires. Exemple : *Platasterias*.
 - **Ordre- Hemizonida** : également éteint, cet ordre possède des ossicules ambulacraires creusées. Exemple : *Palasterina*, *Helianthaster*
- Classe- Ophiuroidea.
 - Classe- Echinoidea.

- Classe- Holothuroïde (Khanna, 2005).

I.2.3. Écologie des Astérides

I.2.3.1. Distribution et densité des astérides

Les astérides sont extrêmement diversifiées, avec environ 1900 espèces regroupées en 36 familles et environ 370 genres (Gilpin, 2006). Les astérides ont une large distribution dans tous les océans, même si la plupart d'entre elles sont plus abondantes à des profondeurs modérées, on en trouve également dans les régions abyssales (Woods, 1909). Elles habitent différents types de fond principalement dans la zone littorale ou elles nagent ou restent sédentaires parfois. Il existe cependant quelques préférences pour un type particulier de substrat chez de nombreuses espèces (Hyman, 1955).

I.2.3.2. Prédation et mode de défense

Les étoiles de mer ont plusieurs prédateurs, les plus fréquents étant les gastéropodes carnivores tel que *Charonia tritonis* qui est capable d'engloutir une astérie entière, les crevettes du genre *Hymenocera* qui se nourrissent surtout des organes internes des astéries qu'elles atteignent en déchirant le tégument de ces dernières ainsi que des prédateurs plus discrets tels que certains vers et crustacés carnivores qui eux ont une préférence pour les appendices tégumentaires (podia et papules). Les étoiles de mer se défendent à l'aide d'un système de protection très efficace, elles peuvent refermer leurs sillons ambulacraires pour abriter leur podia, certaines espèces quant à elle possède des structures venimeuses, c'est le cas par exemple d'*Acanthaster planci* dont certaines piquants fragiles cassent facilement libérant ainsi leurs toxine pour éloigner leurs prédateurs (Menou *et al.*, 1986).

I.2.3.3. Comportement

Les étoiles de mer sont grégaires, en effet elles préfèrent vivre en groupe de populations denses et sédentaires sur les rochers, leur déplacement se fait à l'aide de leurs pieds tubulaires. Durant la journée, leurs mouvements restent relativement inexistantes mais elles deviennent plus actives la nuit (Hegner, 1933). En effet la lumière semble jouer un rôle considérable dans la vie des astérides, la plupart la fuient en recherchant des zones ombragées (Hyman, 1955).

I.3. Morphologie externe et interne d'une "étoile de mer"

I.3.1. Morphologie externe

L'astéride possède deux faces comme indiqué sur la photo ci-dessous, l'une reposant sur le fond c'est la face orale, ambulacraire, actinale ou ventrale, et l'autre partie visible de l'animal qui est dite aborale, anti-ambulacraire, abactinale ou dorsale (**Fig. 2**), celle-là même où l'on trouve l'anus et la plaque madréporique (Woods, 1909). Quant à la première face, elle porte à partir de la bouche jusqu'aux extrémités des bras des rainures bien marquées surnommées "sillons ambulacraires" ces derniers renferment deux rangées de podia ou pieds ambulacraires pourvus de ventouses et ayant dans leur grande majorité une fonction locomotrice. Il existe aussi de part et d'autre de chaque sillon

ambulacraire une bordure dite ambulacraire sous forme de plaque armée de piquants (Menou *et al.*, 1986).

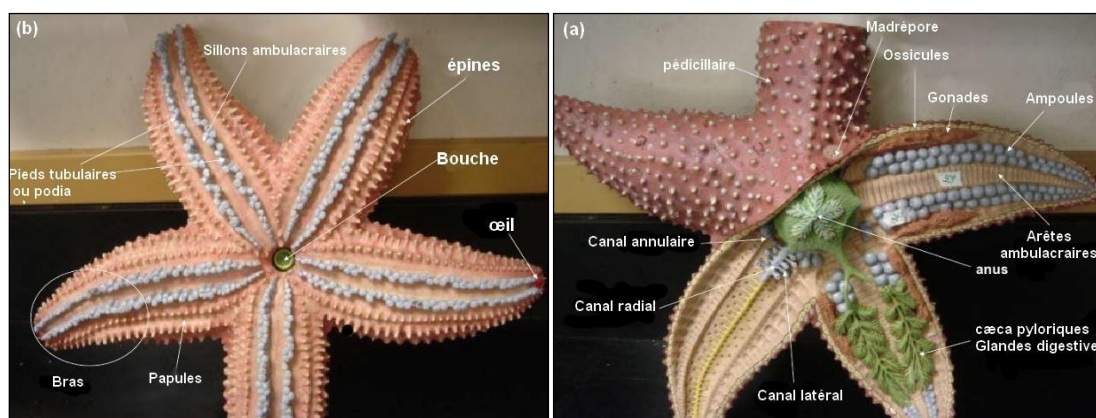


Figure 2 : Principales structures anatomiques d'une étoile de mer, (a) : Vue aborale (b) : Vue orale. slideshare.net

I.3.1.1. Le tégument

Le tégument est rugueux, épais, calcifié et tapissé par des protubérances en forme de piquants, il se compose d'un épiderme lui-même recouvrant un mésoderme qui contient des éléments squelettiques appelés ossicules, des cellules neurosensorielles et des cellules nerveuses. Le tégument entoure une vaste cavité générale où baignent les viscères, les appendices tégumentaires des astérides sont comme précédemment cité les podia et les papules, leurs répartition sur le corps des astérides ainsi que leurs relations mutuelles servent souvent de critères de classification (Menou *et al.*, 1986; Brusca et Brusca, 2003; Arab *et al.*, 2013).

I.3.1.1.1. Couleur du tégument et pigments

Les astérides sont généralement de couleur vive, certaines arborent un tégument jaune ou brun, d'autres orange ou violet, cette différence de coloration est due à des pigments caroténoïdes (Khanna, 2005), ces dernières ont déjà reçues beaucoup d'attention notamment de Lonnberg qui a trouvé ce qu'il a décrit comme de la carotène et de la xanthophylle dans différentes étoiles de mer, Von Euler et Hellstrom ont quant à eux, isolé en 1934 une caroténoïde acide du tégument d'*Asteria rubens*, ce pigment a ensuite été mis en évidence par Vevers en 1952 comme étant de l'astaxhanthine qui a également été trouvée par Nishibori et Tsumaki dans *Asterina pectinifera*. De Nicola et Goodwin ont trouvé en 1954 de la bêta-carotène, de l'échinénone ainsi qu'un certain nombre de caroténoïdes non identifiés dans des extraits d'*Echinaster sepositus* (Vever et Millott, 1957).

I.3.1.1.2. Appendices du tégument

La face orale comporte les structures suivantes :

▪ La bouche

Il existe au milieu du disque central une ouverture appelé actinosome ou bouche, c'est une ouverture pentagonale possédant cinq angles chacun dirigé vers un bras, elle est entourée d'une membrane délicate appelée membrane péristomiale et est munie de cinq groupes d'épines orales ou de papilles (Khanna, 2005).

▪ Les sillons ambulacraires

Ce sont des structures spécifiques à la face orale, ils se localisent au milieu de chaque bras partant de l'actinosome et s'étendant jusqu'à son extrémité, chaque sillon est bordé par deux rangées d'épines ambulacraires (Khanna, 2005), ce sont des cylindres creux avec des parois épaisses qui se redressent et se déplacent quand l'étoile de mer injecte de l'eau dans certaines vésicules dans son corps. Les sillons ambulacraires se terminent par des ventouses que l'animal utilise pour adhérer au substrat, leurs pieds ambulacraires ou podia se rétractent en se cachant derrière la rangée d'épines rigides si l'animal subit un assaut extérieur (Britannica, 2008).

▪ Les pieds tubulaires (Podia)

Les pieds tubulaires sont souples, extensibles et disposés en quatre rangées radiales dans chaque sillon ambulacraire. ils sont munis de ventouses permettant la fixation sur le substrat, ce sont des organes polyvalents car ils assurent notamment la locomotion, la nutrition la respiration et font même office d'organes sensoriels (Khanna, 2005). L'illustration ci-dessous retrace la structure de ces organes.

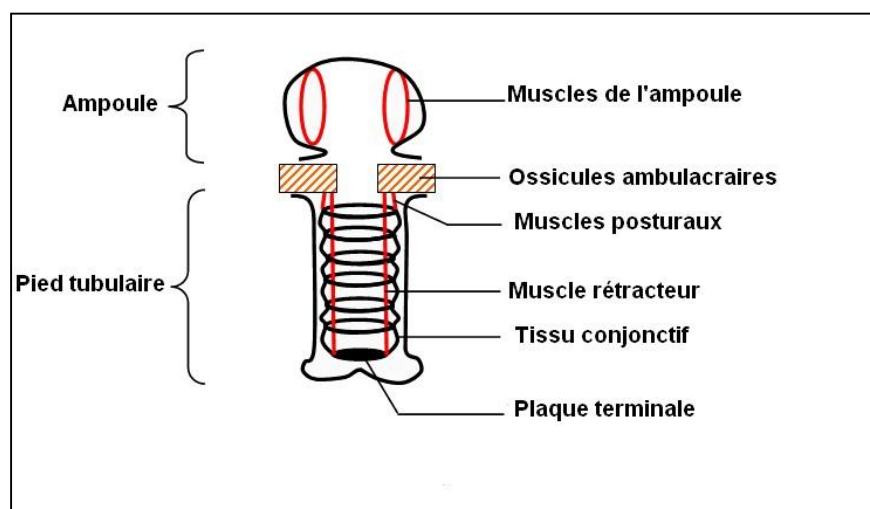


Figure 3 : Structure basique d'un pied tubulaire (Cronodon.com, 2017).

▪ Les organes sensoriels

Les pieds tubulaires sont les principaux organes sensoriels, ils reçoivent des fibres nerveuses des cordons nerveux radiaux, ces derniers se terminent par des masses pigmentaires de couleur rouge appelées "yeux" étant donné leur sensibilité à la lumière,

les papules peuvent également être considérées comme des organes de sens (Hegner, 1933).

La face aborale est dirigée vers l'extérieur, elle est généralement de couleur orange ou violacée, elle comporte les structures suivantes :

- **L'anus**

L'anus est situé près du centre du disque mais peut être absent chez certaines astérides (Woods, 1909). C'est une petite ouverture invisible à l'œil nu se situant dans un inter radius à côté de celui occupé par le madrépore (Khanna, 2005)

- **La plaque madréporique**

Il existe une plaque squelettique spéciale de couleur claire appelée le madrépore ou plaque de tamisage, elle est située au centre de la surface aborale sur un inter-radius. Le madrépore est perforé et profondément sillonné (**Fig. 4**) (Brusca et Brusca, 2003). Chaque sillon s'ouvre dans une ampoule en forme de sac à travers les canaux de pores minuscules, le nombre de pores peut être de 250 unités, les ampoules débouchent dans un canal appelé canal du sable et qui est en forme de S, ce dernier rejoint l'anneau ambulacraire entourant la bouche (Khanna, 2005).

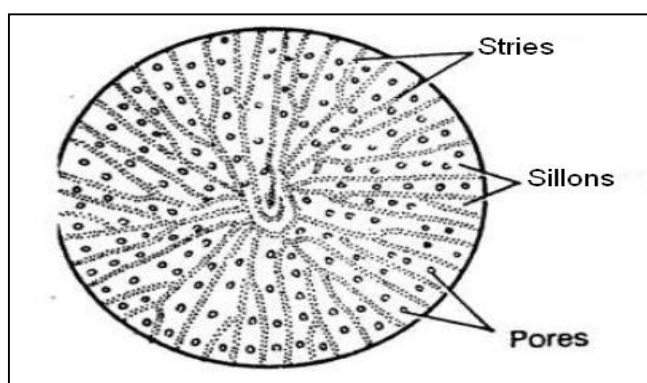


Figure 4 : Représentation du madrépore d'une astérie (Khanna, 2005).

- **les pédicellaires**

Ces structures se trouvent en protubérance entre les ossicules et sont en contact direct avec la cavité générale (Pechenik, 2009). Elles sont petites, blanchâtres avec une structure similaire à celle d'une mâchoire ou d'un piquant (Khanna, 2005). Les pédicellaires sont capables de répondre aux stimuli externes indépendamment du système nerveux principal et possèdent leurs propres composants neuromusculaires, elles ont pour rôle le nettoyage du tégument ainsi que la défense de l'animal (Brusca et Brusca, 2003).

- **Les papules**

Les papules sont des structures minces semblables à des filaments présentes sur des pores minuscules se trouvant entre les ossicules de la surface aborale, ce sont des extensions du cœlome qui peuvent aussi se retrouver complètement retranchées dans le

corps, leur fonction est non seulement respiratoire ce qui en fait des structures respiratoires supplémentaires essentielles étant donné le niveau d'activité des étoiles de mer mais aussi excrétrice (Clarkson, 1998; Khanna, 2005).

I.3.1. 2. L'endosquelette

L'endosquelette des astérides est une structure complexe, il consiste en des plaques calcaires pouvant être détachées ou unies se chevaucher ou s'unir de manière réticulée et qui sont appelés : les ossicules, ces dernières varient en taille, en forme et en fonction et peuvent être ornées de granules, d'épines ou d'autres structures caractéristiques, Cet ensemble est recouvert d'un tégument coriace et d'un tissu musculaire. Les plaques calcaires ont entre elles des articulations multiples. Deux rangées parallèles de plaques ambulacraires limitent le toit des sillons ambulacraires ces rangées sont disposées obliquement par paires et laissent entre elles, dans chaque rangée, des trous par lesquels passent les podia (Twenhofel et Shrock, 1935; Mutschke et Mah, 2009). Malgré le fait qu'il soit développé il ne constitue pas pour autant un test rigide comme chez les oursins. L'endosquelette confère aux astérides une certaine souplesse qui les rend capables de se mouler dans les anfractuosités du substrat (Twenhofel et Shrock, 1935; Menou *et al.*, 1986; Mutschke et Mah, 2009).

I.3.2. Organisation interne

L'organisation interne d'une astérie se présente comme dans la figure ci-dessous :

I.3.2.1. Système digestif

Le système digestif se compose de deux parties, la première étant un canal digestif complet mais très court et large à certains endroits et qui s'étend de la surface orale à la surface aborale, englobant la bouche, l'œsophage, l'estomac l'intestin et l'anus. Et une deuxième représentée par les glandes digestives ou cæca pyloriques (Khanna,2005).

La bouche s'ouvre dans un œsophage qui mène à un sac à paroi mince, l'estomac (Hegner,1933). Ce dernier est divisé en deux régions, La plus grosse, appelée estomac oral ou estomac cardiaque et qui reçoit la nourriture ingérée celui-ci rejoint ensuite un plus petit estomac appelé : estomac pylorique (Miller, 2001), à partir de celui-ci, un tube passe dans chaque bras puis se divise en deux branches chacune possédant un grand nombre de poches latérales s'étendant jusqu'aux extrémités des bras, ces branches sont appelées cæca pyloriques, ils sont longs, de couleur brunâtres ou verdâtres et suspendus à la paroi aborale du corps par une paire de mésentères longitudinaux (Hegner, 1933; Miller, 2001). Ils communiquent par un conduit commun avec la chambre pylorique reliée à un intestin de taille minimale qui s'ouvre par un anus excentrique. (Jones et Cleave, 1886) L'illustration ci-dessous retrace les organes impliqués dans la digestion d'une étoile de mer :

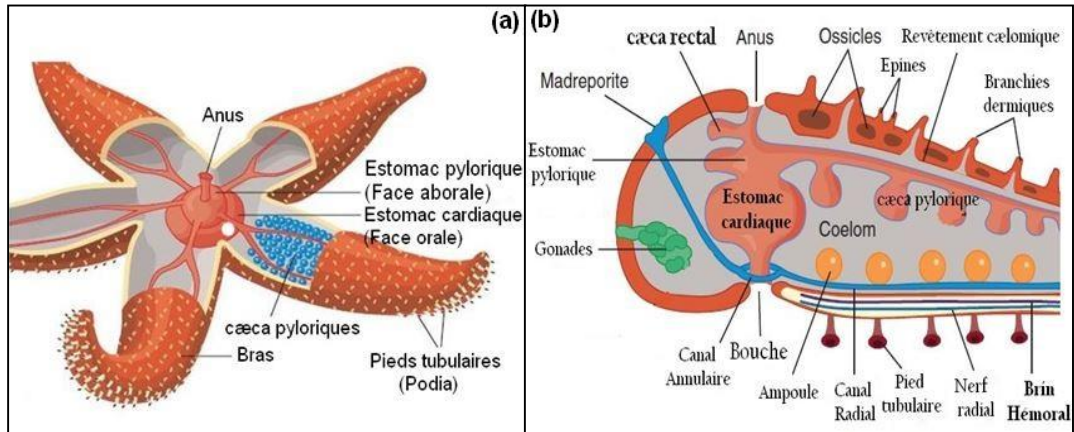


Figure 5 : Structures digestives dans une étoile de mer. Une bouche conduit à un large estomac cardiaque et à un estomac pylorique. Les cæca pyloriques s'étendent sur chaque bras (a) : Vue aborale. (b) : Vue latérale à travers le disque central et un bras (Miller, 2001).

I.3.2.1.1. Nutrition

De nombreuses astérides se nourrissent en dévaginant l'estomac cardiaque par la bouche pour englober leurs proies ou en insérant l'estomac rabattu à travers l'ouverture étroite des bivalves pour digérer l'animal (**Fig. 6**) (Lewbart, 2006), et lorsque elles finissent de s'alimenter l'estomac revient de nouveau à l'intérieur des étoiles de mer, il est à noter qu'elles sont par la suite capables de rester plusieurs mois sans nourriture sans que cela ait un effet négatif. (Clarkson, 1998) Les astéries sont connues pour leur appétit ainsi que leurs différentes stratégies d'alimentation, la plupart d'entre elles sont omnivores opportunistes, certaines pratiquent la prédation se nourrissant sur un large éventail d'invertébrés, d'éponges de corail ou d'autres échinodermes, quelques unes pratiquent le cannibalisme d'autres se nourrissent du sédiment en remplissant leurs estomacs de boue d'ou elles extraient des organismes microscopiques ainsi que de la matière organique. Une certaine partie est elle suspensivore et trouve son alimentation en forme de particules dans l'eau de mer (Dirk, 1970; Mutschke et Mah, 2009).

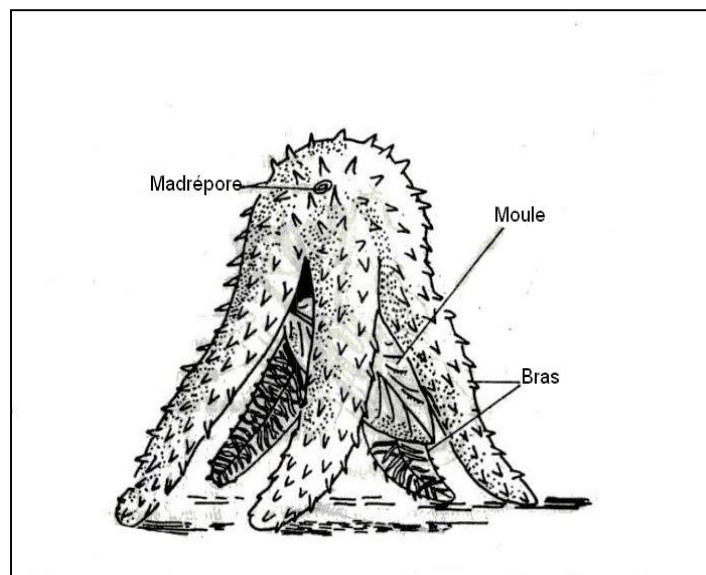


Figure 6 : Une astérie se nourrissant d'une moule (Khanna, 2005).

I.3.2.2. Cavités cœlomiques

Le cœlome est présent sous la forme d'une grande cavité située sous la paroi du corps et qui s'étend le long des bras. Il est bordée par un épithélium cilié. Il existe un grand cœlome périviscérale enveloppant les organes viscéraux, En outre, il existe également un certain nombre de compartiments cœlomiques notamment le système ambulacraire, les sinus axiaux, les canaux périhémoraux et les sinus génitaux (*Arab et al., 2013*).

I.3.2.3. Système ambulacraire

Une des structures les plus caractéristiques des étoiles de mer et qui prend ses origines du mésoderme consiste dans leur système ambulacraire ou aquifère (**Fig. 7**). Ce système hydraulique fait d'un assemblage clos de canaux est intimement impliqué dans de nombreux aspects de leur biologie, assurant notamment diverses fonctions entre autre la locomotion et la prise de nourriture (Jones et Cleave, 1886; Enay, 1993; Brusca et Brusca, 2003; Lewbart, 2006). Il est à noter également que la fine membrane du système ambulacraire permet les échanges respiratoires gazeux ainsi que l'excrétion des déchets azotés à travers la paroi du corps (Miller, 2001). Il communique avec l'extérieur par le biais d'un orifice pouvant être unique (pore aquifère ou hydro-pore) ou multiple (plaque madréporique ou madrépore) (Enay, 1993). Le fluide dans le système aquifère est similaire à l'eau de mer à l'exception de la présence de cœlomocytes, de certaines protéines et d'une concentration de potassium plus élevée (Lewbart, 2006). Les corps de Tiedemann et les vésicules de poli sont des poches qui ornent le canal annulaire dont la fonction peut être osmorégulatrice ou encore hydrorégulatrice au sein du système ambulacraire (Brusca et Brusca, 2003).

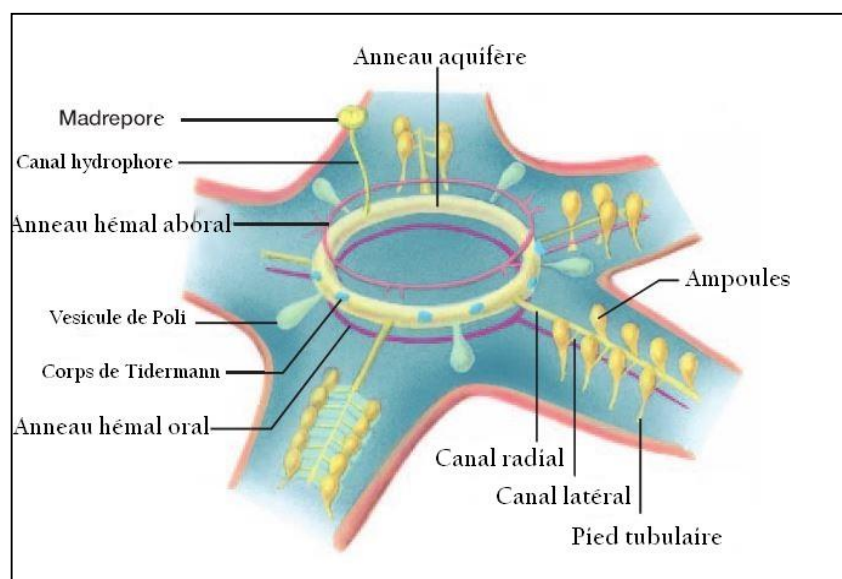


Figure 7 : Représentation du système ambulacraire d'une astérie (Miller, 2001).

I.3.2.4. Organes génitaux

Ce sont les gonades qui possèdent une structure dendritique et qui sont de taille variable dépendant de l'état de maturation sexuelle de l'animal. Ils sont contenues dans les bras de l'astérie, deux dans chacun ainsi qu'une ouverture appelé "gonopore" à la base de ses derniers et qui s'ouvre sur la surface orale chargée de l'émission des gamètes dans l'eau. Quand les astéries sont en période de reproduction les gonades gonflent pour remplir la quasi totalité de l'espace disponible au niveau des bras (**Fig. 8**) (Miller, 2001; Lewbart, 2006; Brusca et Brusca, 2003).



Figure 8 : Répartition des gonades matures sur les bras d'*Echinaster sepositus* (Photo©HADADIA).

I.3.2.4.1. Reproduction

Les sexes des astérides sont la majeure partie du temps séparés avec quelques cas d'hermaphrodisme, la reproduction asexuée par fission se produit chez certains genres mais la plupart des espèces se reproduisent sexuellement (Lawrence, 2013). Leur système reproducteur est relativement simple et intimement associé aux dérivés du coelome (Brusca et Brusca, 2003). Les organes reproducteurs en l'occurrence les gonades, déchargent les ovules ou les spermatozoïdes dans l'eau à travers des pores se trouvant à l'interstice entre deux bras adjacents, la fertilisation est donc externe (Hegner, 1933). Ces processus sont régis par une médiation biochimique bien connue, notamment la production de stéroïdes lors de la gamétogenèse, la libération des gamètes, la maturation des ovocytes et la méiose. Étant donné la difficulté des gamètes à survivre longtemps dans l'océan, la maturation de ces derniers et la ponte doivent être coordonnées, il existe également un certain nombre de facteurs pouvant conditionner l'activité reproductrice notamment le photopériodisme, la température mais aussi certains facteurs environnementaux. Afin d'induire d'autres étoiles de mer à libérer leurs gamètes et ainsi augmenter la probabilité de fertilisation, la ponte est accompagnée par la libération de phéromones. Les embryons sont planctonique et utilisent leurs cils pour nager, après la gastrulation les cils se différencient et une larve à symétrie bilatérale se forme appelée "Bipinnaria" (**Fig. 9**) (a) (b)", elle se développe par la suite en larve

"Brachiolaria"(Fig.9) (c)" qui se fixera au substrat et se métamorphosera en étoile de mer juvénile (Fig. 9) (d) (Dirk, 1970; Miller, 2001).

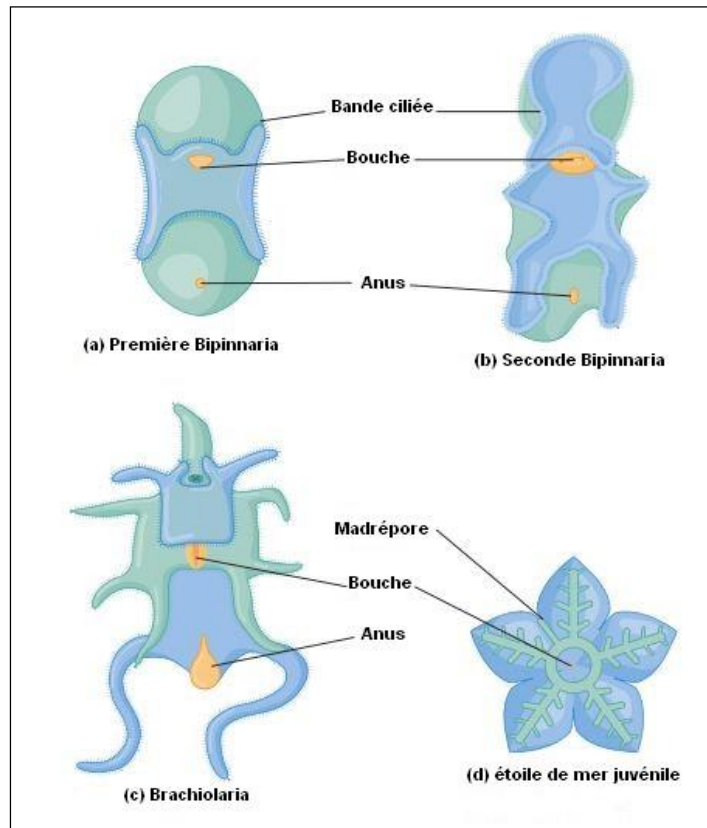


Figure 9 : Développement d'une étoile de mer après fécondation. Après les phases blastula et gastrula, les larves se développent. (a) larve bipinnaria précoce (0,5 mm). (b) larve tardive de bipinnaria (1 mm). (c) larve de brachiolaria (1 mm). (d) étoile de mer juvénile (1 à 2 mm) (Miller,2001).

I.3.2.5. Système nerveux, circulatoire et excréteur

Il n'existe pas d'organes hautement spécialisés pour l'excrétion, pas de système circulatoire bien défini, et le système nerveux présente un faible niveau de spécialisation (Van Cleave, 1931). En effet, mises à part de nombreuses cellules nerveuses qui se localisent au niveau des cellules de l'ectoderme, il existe des crêtes de tissu nerveux, Les cordons nerveux radiaux se trouvant le long des stries ambulacraires s'unissent avec un anneau nerveux encerclant la bouche. Concernant le système circulatoire, le fluide cœlomique est maintenu en mouvement grâce à des cils et fait parvenir les éléments nutritifs absorbés à toutes les parties du corps, L'excrétion quant à elle est accomplie par des amœbocytes présentes dans le liquide cœlomique aidées par le cæca rectaux (Hegner, 1933).

I.4. Pêche, commercialisation et consommation

De par leur aspect attrayant et le fait qu'elles soient considérées comme des créatures marines charismatiques et symbolique de la vie marine, les pressions mondiales sur la collecte des étoiles de mer et plus largement des échinodermes ne cessent de croître (Micael *et al.*, 2009). Cette pression se manifeste notamment par le biais de la pêche commerciale, par la consommation humaine par quelques pays asiatiques, par la vente comme espèces d'aquarium mais aussi comme objets souvenirs pour les touristes. Certains pêcheurs utilisent même les astérides comme appâts (Alvarado et Solís-Marín, 2014).

I.5. Rôle écologique, biologique et pharmaceutique des "étoiles de mer"

I.5.1. Rôle écologique

La diversité énorme des astérides contribue à leurs rôles écologiques de grande envergure (Gale, 2013). Elles sont généralement considérées comme des ravageuses surtout vis à vis des moules et aquacultures d'huîtres, et servent donc d'importants indicateurs de la structure des communautés dans certains écosystèmes (Lewbart 2006). Cela additionné à un nombre de caractéristiques importants qui viennent appuyer leur importance, notamment leurs nombre, leurs croissance indéterminée, leurs système digestif généralisé leur permettant de se nourrir sur plusieurs tailles de proies soit en interne ou en externe comme chez aucun autre phylum d'invertébrés, leurs mode de locomotion et leur morphologie qui leur permet d'occuper pratiquement tout les types de substrats et débits de courants, bien que d'autres taxons de consommateurs possèdent cette caractéristique, peu peuvent le faire avec autant de succès que les étoiles de mer (Lawrence,2013).

I.5.2. Rôle Biologique

Les étoiles de mer sont impliquées dans plusieurs relations interspécifiques, notamment de symbiose et de parasitisme, par exemple avec la "crevette arlequin" qui s'alimente d'un des bras abimés d'une étoile de mer pour l'en débarrasser afin qu'elle puisse le régénérer ou alors la crevette nettoyeuse *Periclimenes soror* qui se nourrit sur les débris ou les micro-organismes qui s'accroche au tégument des étoiles de mer, l'annélide polychète *Pherecardia striata* est un parasite de l'étoile de mer *Achanasther planci* qui s'infiltré dans les blessures de l'étoile pour la dévorer de l'intérieur (Dahmoune, 2015).

I.5.3. Rôle pharmaceutique

Une grande variété de substances biologiquement actives ont été isolées de plusieurs espèces d'échinodermes dont les astérides qui ont semblé contenir un nombre important de celles-ci, notamment des saponines, des glycolipides, des caroténoïdes, des porphyrines, des naphthoquinones des venins et bon nombre d'autres substances parfois uniques aux échinodermes et dont certaines ont montré un grand potentiel en tant que

nouveaux médicaments (Matranga, 2006). Dans le temps, des étoiles de mer entières et séchées telle que *Oreaster reticulatus*, *Luidia senegalesis* et *Ecinaster sp.* étaient utilisées comme médicament traditionnel pour traiter l'asthme, la bronchite, le diabète et les maladies cardiaques dans le nord-est du Brésil (Lee *et al.*, 2014).

I.6. Les espèces prises en compte pour l'étude

Les étoiles de mer étudiées dans ce mémoire sont *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*. Ces astéries sont communes dans les petits fonds de la marge Algérienne. Le **tableau I** récapitule les caractéristiques d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus*.

Tableau I : Caractéristiques des deux espèces prises en compte pour l'étude.

Caractéristiques	<i>Echinaster sepositus</i> (Retzius,1783)	<i>Ophidiaster ophidianus</i> (Lamarck,1846)	Références
Classification			
Ordre	Spinulosida Perrier,1884	Valvatida Perrier, 1884	(Boell, 1955).
Famille	Echinasteridae Verrill, 1870	Ophidiasteridae Verrill, 1870	(Boumediane et Bouras, 2014).
Genre	<i>Echinaster</i> Müller & Troschel, 1840	<i>Ophidiaster</i> L. Agassiz, 1836	
Distribution géographique			
Profondeur	Méditerranée (Algérie), Atlantique Est 0 à 40 m Signalée à 250 m	Méditerranée (Algérie), Atlantique Est 5 à 30 m Rarement à 100m	
Morphologie externe			
La couleur	Pour les deux espèces la face orale est un peu plus claire que la face aborale.		(Harmelin et Ruitton, 2010).
Longueur de l'espèce	Rouge intense, rouge brique, rouge orangé plus ou moins foncé 7 à 10 cm peut atteindre 15 à 20 cm	Rouge carmin très vif ou rouge orangé 18 à 20 cm, peut atteindre 25 cm	
Disque central	Petit	Petit	(Koehler, 1969).

I.7. Substances actives des échinodermes

Introduction

Durant la dernière décennie, la recherche de molécules ayant un potentiel biomédical et un impact minime sur l'environnement a connu un essor sans précédent, en effet, les avancées technologiques et chimiques ont été mises à profit pour valoriser la biodiversité présente dans le système aquatique susceptible de conduire à l'identification de la composition chimiques de nouvelles molécules à vertus biopharmacologiques et ce, afin d'accroître leur valeur scientifique et commerciale (Sottorff *et al.*, 2013). Ces organismes constituent une excellente source de composés bioactifs, environ 7000 substances d'origine marine dont 25% provenant des algues, 33% des éponges, 18% des cœlentérés, et 24% des autres représentants des phylum d'invertébrés tel que les ascidies, les opisthobranches, les mollusques et les échinodermes. Ces derniers possèdent des ressources importantes en terme de molécules d'intérêt thérapeutique dans des domaines tel que la recherche sur le cancer, dans le contrôle de la croissance bactérienne, en tant que substances ayant des propriétés antibiotiques et enfin dans le cadre d'applications techniques notamment des substances antialissure (Suguna *et al.*, 2013).

Tableau II : Les principales métabolites secondaires isolées à partir d'organismes marins.

Sources marines de métabolites secondaires	Métabolites secondaires majeurs	Activité	Références
Les spongiaires	Manzamine, phénols, alcaloïdes, terpénoïdes, Tryptamines bromées	Antipaludique, antivirale en particulier le virus du SIDA, antibactérienne, antifongique, anticancéreuse.	(Datta <i>et al.</i> , 2015).
Les cœlentérés	Prostaglandines, protéines, enzymes, stéroïdes, terpénoïdes, alcaloïdes bromés, macrolides et céramides.	Antibactérienne, antifongique, anti algale, anti tumorale, anticancéreuse, antinéoplasique.	
Les annélides	Peptides antimicrobienne	Arthrites, ostéoporoses, cancer des os, antimicrobienne, antibactérienne, antifongique.	
Les arthropodes	Lectines, carcinoscorpine, protéines, acides gras, triglycérides, caroténoïdes, lipides.	Antibactérienne, anticancéreuse, antioxydante, antiproliférative,	

		antimutagène, anti inflammatoire, réponse immunitaire.
Les mollusques	Dolostatine, lectines, stéroïdes, terpénoïdes, polysaccharides.	Réponse immunitaire, hypotension, anti nicotinique, antivirale.
Les échinodermes	Saponines et dérivés de stéroïdes, terpénoïdes, glycoprotéines, cérébrosides, pyrimidine, nucléosides, thymine, désoxyribose, polysaccharides, b carotène.	Hémolytique, antibactérienne, antifongique, antinéoplasique, anti tumorale, antivirale en particulier le virus du SIDA

Les étoiles de mer attirent de nombreux scientifiques qui les considèrent comme une source fascinante de produits bioactifs naturels, en effet, une multitude de métabolites secondaires notamment des stéroïdes, des glycosides stéroïdiens, des anthraquinones, des alcaloïdes, des phospholipides des peptides et des acides gras ont été mises en évidence et dont les activités cytotoxiques, hémolytiques, antivirales, antifongiques et antibactériennes sont certaines (Dong *et al.*, 2011).

I.7.1. Les stéroïdes

Les composés bioactifs isolés des animaux marins possédant un nucleus stéroïdien sont les hormones de mue des insectes, les stéroïdes et les saponines (Bhakuni et Rawat, 2006).

I.7.2. Les stéroïdes

Les stéroïdes rencontrés chez les astérides sont typiquement des stéroïdes Δ^7 , En effet, il a été suggéré en 1962 qu'ils pourraient être dérivés métaboliquement des stéroïdes Δ^5 prédominants chez les animaux dont se nourrissent les astérides (Smith et Goad, 1975). Les trois exemples les plus connus sont les analogues Δ^7 du 24-nor- Δ^22 -cholestérol, de l'occélastérol et du gorgostérol, respectivement astérostérol, amurestérol, et acanthastérol (**Fig. 10**) dont les noms dérivent des espèces chez qui ils ont été découverts. Des études ont aussi indiqués que les astérides étaient une des sources les plus abondantes de stéroïdes, particulièrement les polyhydroxystéroïdes. Une autre étude a examiné la composition de stéroïde d'*Echinaster sepositus* et a constaté que le cholestérol en était un composant mineur . Les animaux ont été recueillis à différents moments au cours de l'année, mais aucune mention d'une éventuelle variation de la quantité des stéroïdes durant le cycle reproductif annuel de l'espèce n'a été faite (Kornprobst, 2005; Lawrence, 2013).

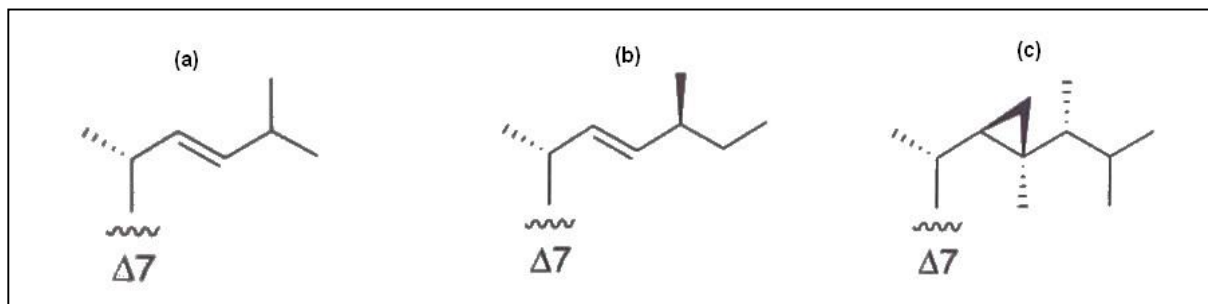


Figure : 10 : Stérols isolés à partir d'étoiles de mer, (a) : Astérostérol (isolé de *Asteria amurensis*), (b) : Amurestérol (isolé de *Asterias amurensis*), (c) : Acanthastréol (isolé de *Acanthaster planci*) (Kornprobst, 2005).

I.7.3. Les glycosides

Parmi les composés les plus fréquemment étudiés dans la recherche des substances actives des étoiles de mer, les glycosides sont en tête de liste, en effet les glycosides stéroïdiens se trouvent chez la quasi totalité des astérides et en sont des composés spécifiques, ils sont répandus dans tout leur corps sous forme de mélange complexe, les concentrations les plus élevées se trouvent dans l'estomac, les bras les gonades et les cæca pyloriques mais elles connaissent des variations selon les saisons et les périodes de reproduction des étoiles de mer (Dong *et al.*, 2011). Parmi les glycosides stéroïdiens les plus fréquemment rencontrés chez les astérides, les astérosaponines sont les plus notables.

I.7.4. Les astérosaponines

Les saponines sont une grande famille de composés comprenant un stéroïde ou une aglycone triterpénoïde liés à un ou plusieurs fragments d'oligosaccharide par une liaison glycosidique (**Fig. 11**). Le fragment de glucide se compose de pentoses, d'hexoses ou d'acides uroniques. La présence de groupe polaire (Les sucres) et de groupes apolaires (stéroïdes ou triterpènes) confère aux saponines diverses propriétés (Makkar *et al.*, 2007). Des saponines stéroïdiennes ont été isolées à partir d'un grand nombre de plantes terrestres, mais ont plus rarement été trouvés chez les animaux en général. Dans le règne animal, ils sont presque omniprésents chez les étoiles de mer, en effet elles représentent 27 % de leurs métabolites secondaires. Sur la base de leur structure chimique, les saponines d'étoiles de mer peuvent être subdivisées en trois groupes principaux: les astérosaponines sulfatées, les glycosides cycliques jusqu'ici trouvés uniquement chez deux espèces d'astérides, et les glycosides des polyhydroxystéroïdes (Oleszek et Marston, 2013). Ces dérivés amphiphiles s'associent en micelles dont les propriétés tensio-actives les rendent toxiques pour la plupart des autres organismes marins, provoquant des réactions de "fuite" de la part de ces derniers. Ces substances sont non seulement un moyen de défense mais aussi un répulsif protégeant les œufs par leur présence dans la "gelée" qui les entoure. Ces saponines sont également cytotoxiques, hémolytiques et antibactériennes, surtout contre les bactéries Gram positif comme *staphylococcus aureus* (Kornprobst, 2005).

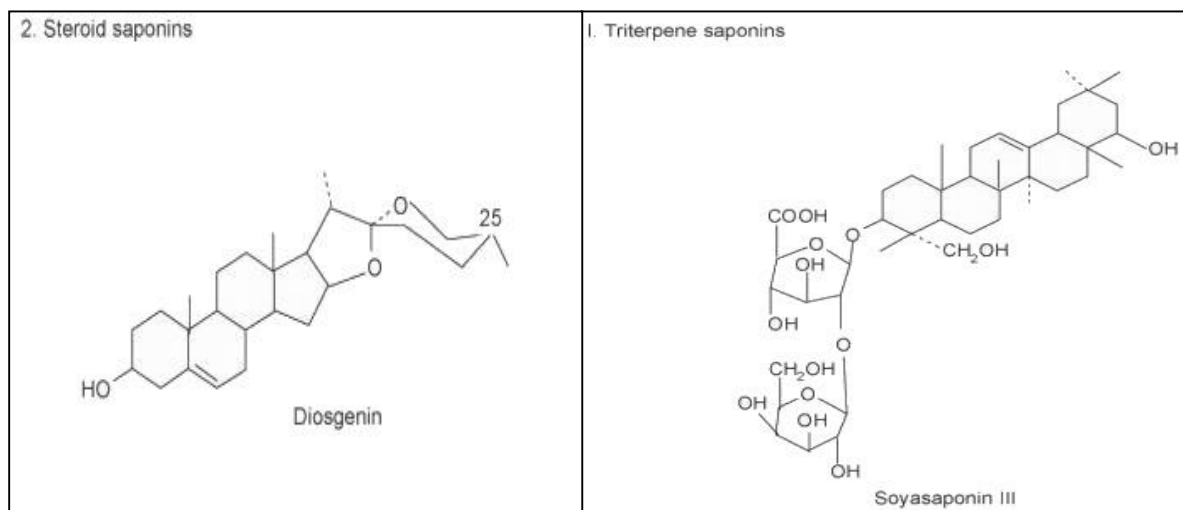


Figure : 11 : Structure des saponines stéroïdiennes et triterpéniques (Makkar *et al.*, 2007).

I.7.5. Les pigments

Les étoiles de mer et plus généralement les échinodermes possèdent un aspect fascinant de par leur large gamme de couleurs, ces dernières sont dues à la présence de pigments chimiques : les caroténoïdes, les mélanines, les porphyrines et les quinones. Certains de ses pigments sont connus comme antioxydants et sont largement utilisés comme complément alimentaire, c'est le cas par exemple des caroténoïdes. Et dont les principaux rencontrés chez les astérides sont l'astaxanthine, la 7,8-didéshydroastaxanthine, la b-doradéxanthine et la zéaxanthine, Quelques autres caroténoïdes plus courants (α et β carotènes, échinénone, lutéine, diatoxanthine...etc.) peuvent être présents à des teneurs variables chez plusieurs espèces (**Fig. 12**). Toutefois, l'obtention des caroténoïdes d'origine végétale reste plus économique que celle des échinodermes mais les pigments qui leur sont spécifiques font déjà l'objet d'un développement pharmaceutique (Kornprobst, 2005; Matranga, 2006).

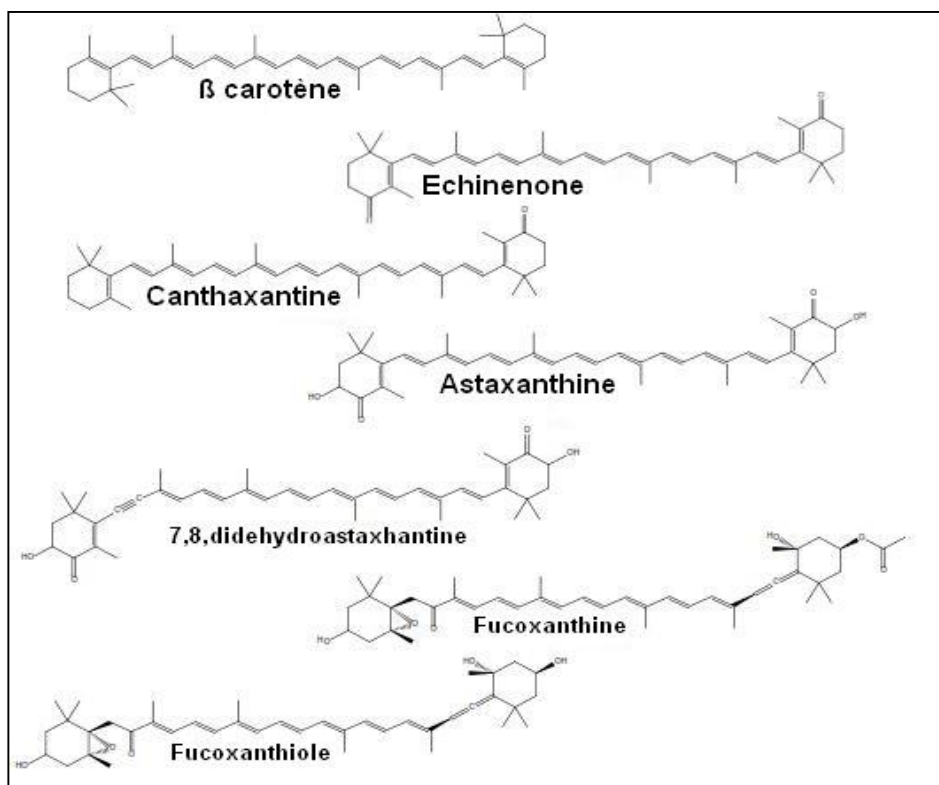


Figure 12 : Caroténoïdes majeures décrites chez les astérides (Pereira *et al.*, 2014).

I.7.6. Les alcaloïdes

Les alcaloïdes comprennent généralement des composés basiques contenant un ou plusieurs atomes d'azote habituellement en combinaison dans le cadre d'un système cyclique, ils sont chimiquement très hétérogènes allant de composés simples à des structures plus complexes. De nombreux alcaloïdes sont de nature terpénoïde et certains comme par exemple la solanine stéroïdiens, d'autres sont principalement des composés aromatiques. (Makkar *et al.*, 2007) À part les stéroïdes et les sphingosines, il existe un faible pourcentage d'autres métabolites plus rares (environ 6% des composés connus des étoiles de mer). Trois exemples intrigants d'alcaloïdes ont été rapportés. Le plus notable d'entre eux pour ses propriétés biologiques est l'imbricantine, un alcaloïde d'isoquinoléine isolé de *Dermasterias imbricata*. Une isoquinoline similaire, la fucusine a été signalée chez *Perknaster fucus antarticus*, Un troisième alcaloïde : la portion mercapto-N-méthylhisitidine de l'imbricantine (l'ovothiol A) a été trouvé dans les œufs d' *Evasterias troschelli*, et enfin un quatrième alcaloïdes isolé de *Lethasterias nanimesis chelifera* qui est l'acide 1-méthyl-1,2,3,4-tétrahydro- α -carboline-3-carboxylique (Lawrence, 2013).

I.7.7. Les Glycolipides

La plupart des publications sur les lipides des astérides concernent les sphingolipides, plusieurs enquêtes sur l'existence de ces derniers chez les invertébrés montrent que les échinodermes en possèdent le pourcentage le plus élevé notamment des céramides mais aussi des glycosphingolipides (cérébrosides et gangliosides) uniques à ce phylum d'invertébrés. Ces composés assurent bon nombre de fonctions

physiologiques, notamment en tant que récepteurs de cytotoxines, dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire mais aussi dans la transduction du signal. D'autres comme les gangliosides et les cérébrosides sont considérés comme pouvant être utiles dans l'élaboration de nouveaux médicaments (Ackman, 1989; Kornprobst, 2005; Matranga, 2006).

II. Matériel et méthode

Notre travail porte sur l'étude de la composition chimique et l'activité biologique de deux espèces d'étoiles de mer *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, pour se faire un certain nombre d'expériences a été mené au sein du laboratoire de recherche "Gestion et valorisation des ressources naturelles assurance qualité" de la faculté des sciences de la nature et de la vie sciences de la terre de l'université de Bouira.

II.1. Récolte et conservation du matériel biologique

Les étoiles de mer *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* utilisées pour l'étude proviennent d'une récolte faite en plongée sous-marine au mois de Décembre 2016 dans la région centre da la marge algérienne (Baie d'Alger et Baie de Bou-Ismaïl) (**Fig. 13**).18 individus sont prélevés à une profondeur allant de 18 à 20 m et conservés dans de l'eau de mer pendant 24h à température ambiante.



Figure 13 : Les étoiles de mer (a):*Ophidiaster ophidianus*, (b) :*Echinaster sepositus* (Dahmoune, 2015)

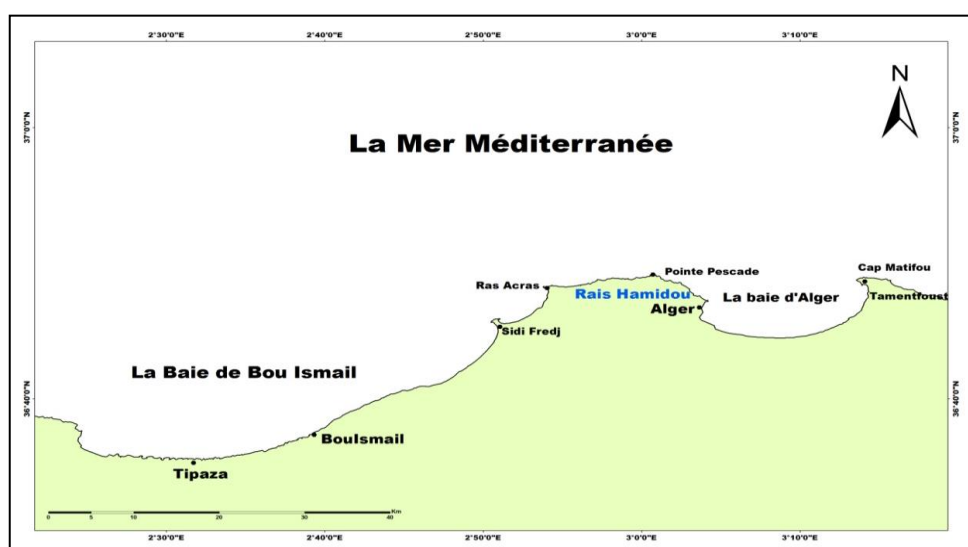


Figure 14 :Localisation de la zone de prélèvement des étoiles de mer. Réalisée par DAHMOUNE.B.

II.2. Reconnaissance des espèces et actualisation systématique

La position systématique de chaque espèce est effectuée en se référant à une documentation spécialisée : Boell (1955) ; Hyman (1955) ; Koehler, (1969) ; Göthel (1996) ; Augier (2010). De nombreux sites internet ont été consultés pour la vérification de l'espèce notamment : <http://doris.ffessm.fr> et <http://www.webplongee.com>.

Le registre taxonomique **WORMS (World Register of Marine Species)** est utilisée afin de valider la taxonomie des espèces étudiées (**Fig. 15**). Ce registre à pour but de fournir une liste officielle et complète des noms d'organismes marins, y compris des informations sur la synonymie.

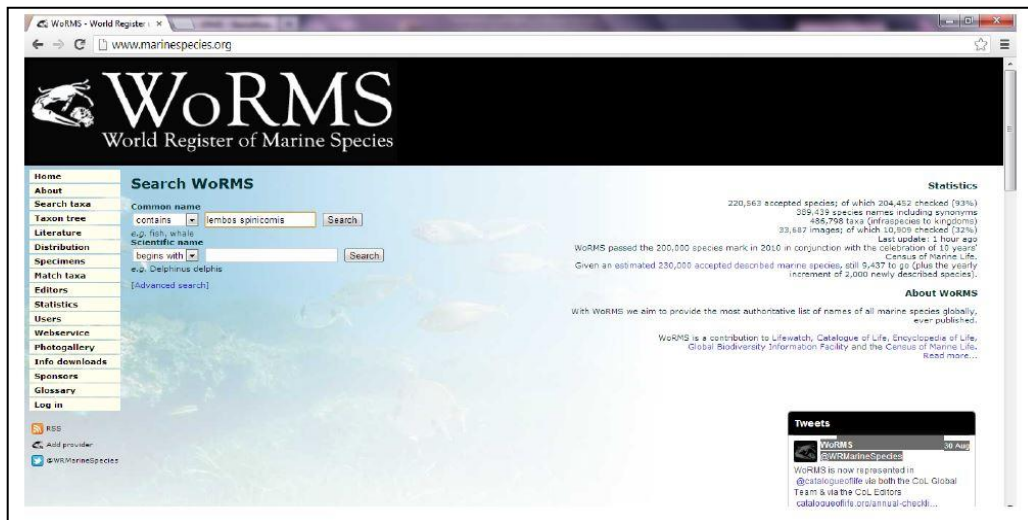


Figure 15 : Interface de World Register of Marine Species. <http://Marinespecies.org>

II.3. Mesures biométriques et dissection

Une série de mesure biométriques (**Fig. 16**) est réalisée sur chaque individu récolté dont leur poids respectifs, la longueur des bras (R) qui est mesurée depuis la bouche jusqu'à l'extrémité des bras, le rayon du disque centrale (r) de chaque individu mesuré de bout à bout de deux interradius. Le rapport R/r et l'indice gonadosomatique des espèces récoltées sont calculés.



Figure 16 : Mesures biométriques réalisées sur les individus d'étoiles de mer. Prise par HADADIA.

En vue de réaliser les extractions, les individus d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* sont disséqués (Fig.17) et quartes de leurs compartiments corporels sont isolés : les cæca pyloriques (CAE), les gonades (GON), le tégument oral (TEG ORL) et le tégument aboral (TEG ABO) (Fig. 18)

La figure ci-après résume l'ensemble des mesures réalisées sur les "étoiles de mer" étudiées.

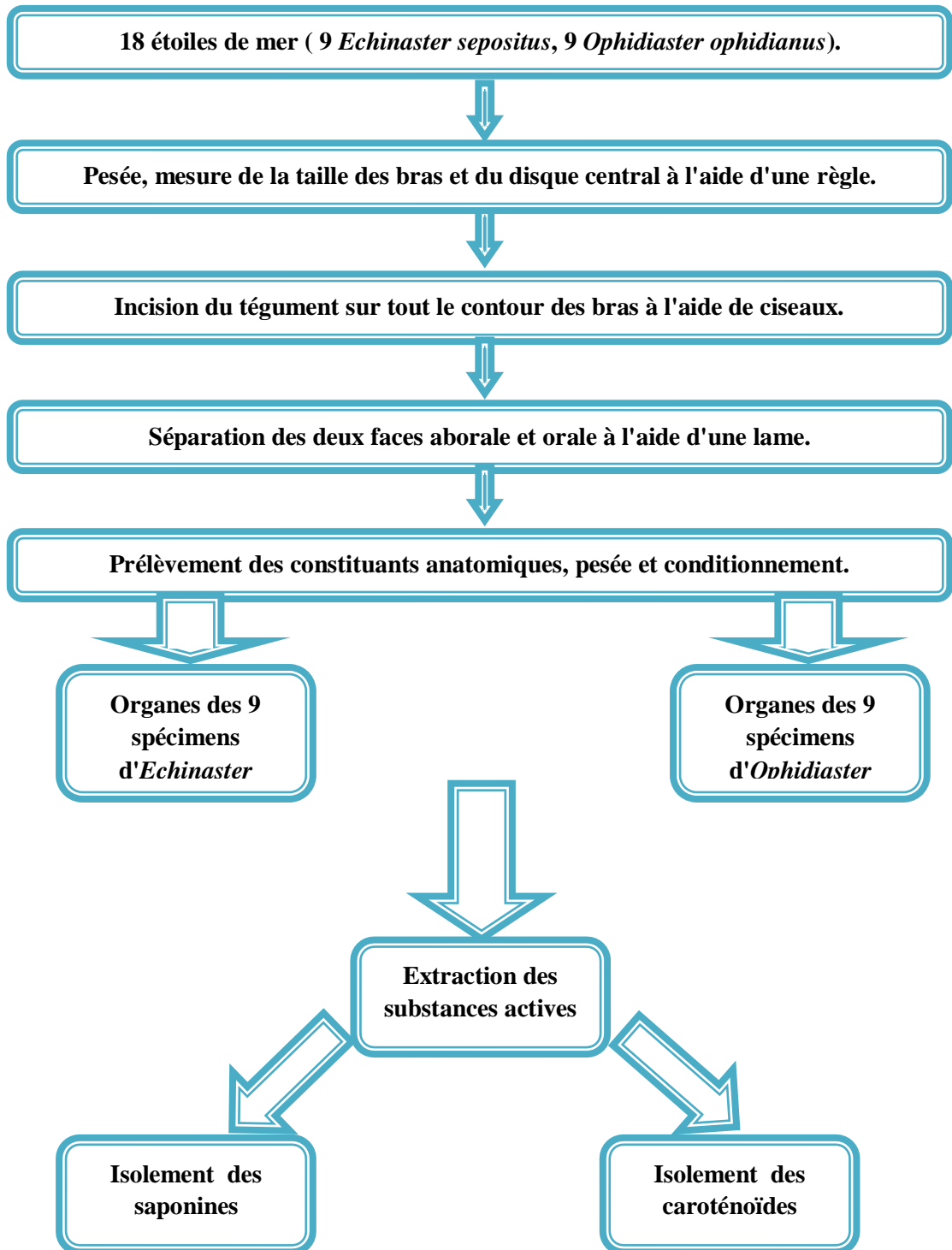


Figure 17 : Schéma récapitulatif des expériences menées sur les étoiles de mer.



Figure 18 : Constituants anatomiques prélevés des deux genres d'étoiles de mer. Prise par HADADI.A.

II.4. Extraction, fractionnement et purification des substances actives.

L'extraction de l'ensemble des substances actives a été effectuée en utilisant les organes suivant : Les téguments oraux et aboraux les cæca pyloriques et les gonades d'*Echinaster sepositus* et '*Ophidiaster ophidianus*, les étapes suivies sont décrites ci-dessous :

II.4.1. La congélation

Les organes sont pesés disposés séparément dans des tubes hermétiquement fermés et congelés à -30°C.

II.4.2. La lyophilisation

Cette technique consiste à déshydrater des éléments congelés sous vide poussé (Genin, 1966), c'est ainsi que nos constituants anatomiques ont été placés dans un lyophilisateur de type CHRIST® FRANCE, aux conditions expérimentale suivante : une température de -80°C, et une pression de 0,0001Bar durant 72h.

II.4.3. Broyage

Les téguments oraux, aboraux les cæca pyloriques et les gonades lyophilisés sont broyés dans un broyeur à billes de type FRITSCH® ALLEMAGNE, et réduits en poudre, les conditions opératoires concernant le temps et la vitesse sont de 15 minutes et 500 tr/min respectivement et la taille des billes est de 5 mm. La poudre est ensuite conservée dans un dessiccateur.

II.4.4. Extraction des substances actives

L'extraction est une étape du processus de transformation de la matière première en un extrait. Dans le présent travail l'extraction à été réalisée selon le protocole décrit par Cochard (2002) et Patel (2010).

Les opérations d'extraction sont les suivantes :

- **Macération**

5 g de la poudre lyophilisée de chaque organe sont ajusté à 100 ml avec le solvant d'extraction. Les solvants utilisés sont : eau/méthanol (MeOH) (30:70) (v/v), et l'eau bi-distillé (extrait A).

Pour une meilleur homogénéisation les solutions sont soumise à une agitation à l'abri de la lumière pendant 24h dans un incubateur qui permet de maintenir la température d'extraction à 20 °C.

- **Filtration et évaporation**

Après 24 h de macération, les solutions sont filtrées à l'aide de papier filtre. Les filtrats sont ensuite évaporés dans un évaporateur rotatif de type STUART® ROYAUMES UNIS, pour fournir des extraits méthanoïques bruts.

- **Premier partitionnage**

Les extraits méthanoliques bruts de chaque organe sont partitionnés contre le dichlorométhane (CH₂CL₂). Un volume équivalent de dichlorométhane est ajouté à l'extrait méthanolique, le mélange est agité vigoureusement et laissé dans une ampoule à décanter pour permettre la séparation des phases. Une fois les deux phases bien distinctes, on récupère les deux extraits : L'extrait B (phase aqueuse, phase supérieure) et l'extrait C (phase organique, phase inférieure).

Donc pour les étoiles de mer, on obtient trois extraits :

L'extrait A : issu de l'extraction à l'eau.

L'extrait B : issu de l'extraction hydro-alcoolique (H₂O/MeOH).

L'extrait C : Issu de l'extraction au dichlorométhane.

Les trois extraits de chaque organe sont séchés à l'étuve à une température de 35 °C jusqu'à à l'évaporation totale du solvant, les extrais sont ensuite reconstitués dans l'eau bi-distillée, lyophilisés et conservés à 4 °C pour d'éventuelle analyse. La figure ci-après récapitule le principe d'extraction.

II.4.5. Purification de l'extrait C

II.4.5.1. Purification de l'extrait C et isolement des saponines

Les saponines sont purifiées à partir de l'extrait C de chaque organe selon la procédure d'extraction établie par Van Dyck *et al.*, (2009).

Trois extractions liquide-liquide sont réalisées au départ de l'extrait méthanolique sec récupère après l'lyophilisation de l'extrait C de chaque organe, en augmentant a chaque fois la polarité du solvant d'extraction (n-hexane 0,09 D, dichlorométhane 1,60 D, chloroforme 1,04 D):

- **La première extraction** avec la solution méthanol : eau (90 :10) et le n-hexane (v/v).
- **La deuxième extraction** entre la solution méthanol : eau (80 : 20) et le dichlorométhane (v/v)
- **La troisième extraction** entre la solution méthanol : eau (60 : 40) et le chloroforme (v/v).

Les saponines restent dans le méthanol (1,70 D) pour chacune de ces extractions. La dernière fraction méthanoïque obtenue est évaporée à l'aide de l'évaporateur rotatif de type STUART® ROYAUMES UNIS puis re dissoute dans l'eau. Cette solution aqueuse est ensuite dépose sur une colonne contenant des billes d'amberlite XAD-4. Nous lavons la colonne avec de l'eau bi-distillée pour éliminer les sels inorganiques puis par du méthanol pour décrocher les saponines des billes.

La phase méthanolique recueillie est évaporée puis dissoute dans de l'eau bi-distillée. Ensuite, nous procédons a une dernière extraction liquide-liquide avec de l'isobutanol. Les saponines migrent dans la phase isobutanolique que nous récupérons et stockons dans des tubes eppendorf a raison de 1ml par tube (Demeyer *et al.*, 2014).

II.4. 5.2. Purification de l'extrait C et B et isolement des caroténoïdes

À partir de la poudre sèche de l'extrait C et B de chaque organe, l'extraction des caroténoïdes à été effectuée selon le protocole décrit par Maoka *et al.*, (2008).

L'isolement des caroténoïdes à été effectué par une macération de la poudre de l'extrait C dans un mélange d'eau/acétone (30 :70) (v/v). Les extraits obtenus sont filtrés sur papier filtre, puis évaporés dans une étuve à 35 °C. Les résidus obtenus sont reconstitués dans l'eau bi-distillé, lyophilisés, puis transférés dans l'éther/hexane (1:1) (v/v). La solution éther-hexane est évaporée et les résidus obtenus sont récupérés dans l'eau bi-distillée, lyophilisés, et conserves dans des tubes eppendorf à 4 °C.

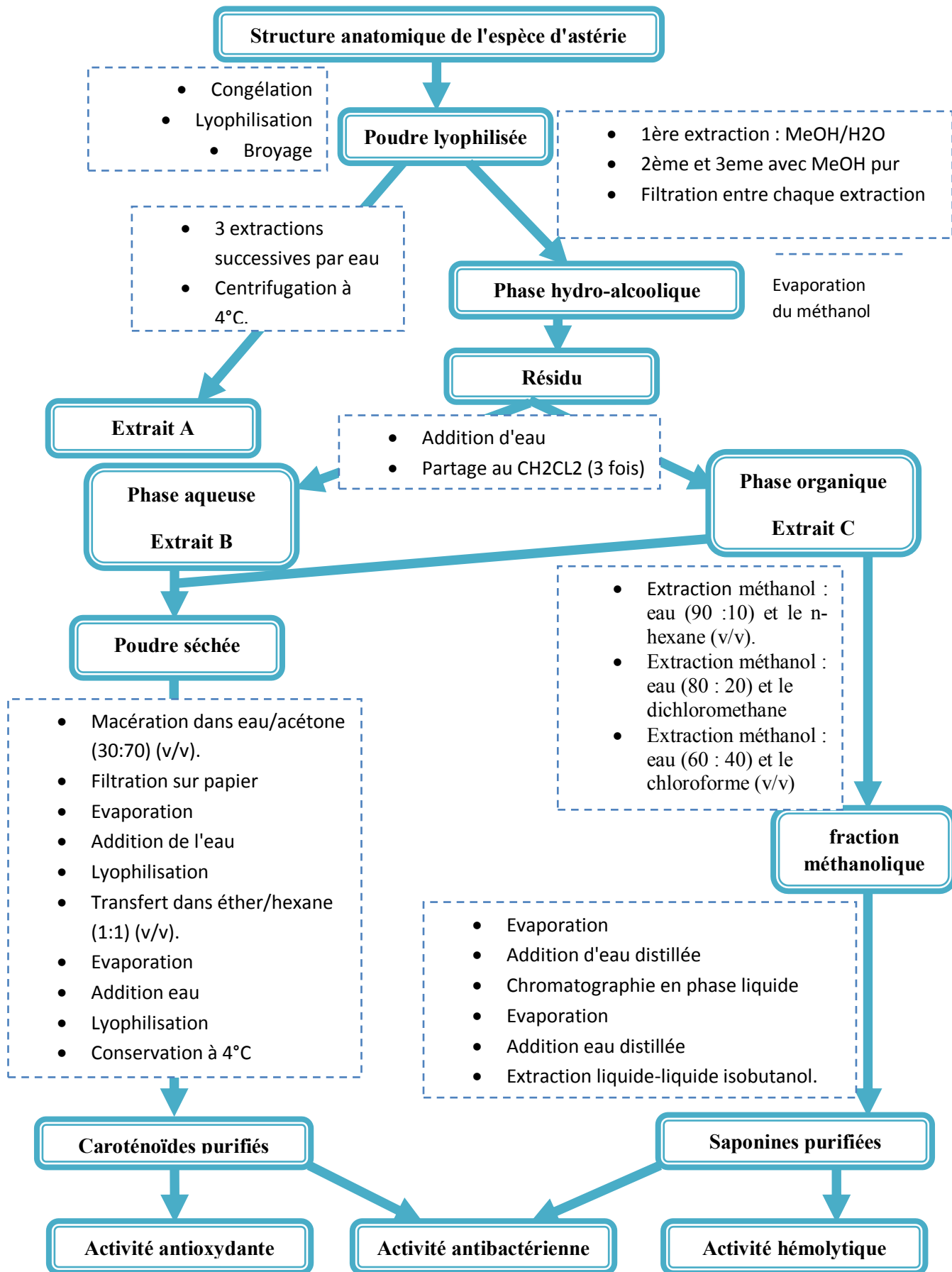


Figure 19 : Schéma récapitulatif des principes d'extraction de substances actives et activités biologiques testées.

II.5. Caractérisation des substances actives

II.5.1. Caractérisation qualitative

Cette démarche permet de mettre en évidence la présence de différentes familles chimiques des métabolites secondaires présentes chez les deux "étoiles de mer" étudiées *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, et ce par des réactions colorées, de précipitation et des observations sous lumière Ultra-violette.

II.5.1.1. L'extrait A

Dans l'**extrait A** on retrouve des protéines, des sels et des peptides, c'est ainsi que la caractérisation de ces derniers a été faite suivant les protocoles ci-dessous :

II.5.1.1.1. Les protéines et des peptides : Réaction de Biuret

Nous avons caractérisé les protéines par la réaction de biuret qui met en évidence les liaisons peptidiques, la méthode consiste à mettre en milieu basique (Hydroxyde de sodium : NaOH) des ions cuivre. à 1 ml de nos extraits chauds on a ajouté 5 à 8 gouttes de solution de NaOH à 10% suivie d'une ou deux gouttes de sulfate de cuivre (CuSO₄) à 3%. Le test est positif si la couleur change du bleu au violet (Saha,S *et al.*, 2011 ; Galewska,Z *et al.*,2013)

II.5.1.2. L'extrait B

Cet extrait représenté par la phase aqueuse est riche en composés polyphénoliques et en terpénoïdes.

II.5.1.2.1. Les terpénoïdes: Test de Slakowski

Les terpénoïdes sont caractérisés par l'addition de 1 ml de l'extrait B à 400µl de chloroforme (CHCl₃) et 600µl d'acide sulfurique (H₂SO₄), l'apparition d'un anneau marron-rouge témoigne de la présence de terpénoïdes (Khan *et al*, 2011).

II.5.1.3. L'extrait C

Ce dernier extrait compte notamment la présence des stéroïdes, des stérols, des terpénoïdes, des caroténoïdes, des anthraquinones et des alcaloïdes caractérisés comme suit :

II.5.1.3.1. Les stéroïdes

Pour la caractérisation des stéroïdes, on ajoute 5 gouttes de H₂SO₄ à 1 ml d'extrait, la formation d'un anneau de couleur rouge à l'interphase du tube indique la présence de stéroïdes. (Saha,S *et al.*, 2011)

II.5.1.3.2. Les stérols et triterpènes

Les stérols et triterpènes sont mis en évidence par ajout de 1 ml de CHCl_3 au résidu sec de l'extrait B de chaque organe. La solution obtenue est partagée dans deux tubes à essais, puis 1 à 2 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés au fond de l'un des tubes, l'autre servira de témoin. La formation d'un anneau rouge brunâtre à la zone de contact des deux liquides indique la présence des triterpènes, la formation d'un anneau violet à la zone de contact des deux liquides, révèle la présence des stérols.

II.5.1.3.3. Les terpénoïdes

On a utilisé le même protocole cité plus haut dans la caractérisation des terpénoïdes dans l'extrait B.

II.5.1.3.4. Les caroténoïdes

Les caroténoïdes sont mis en évidence par Le trichlorure d'antimoine (SbCl_3). On ajoute 2 à 3 gouttes de solution saturée de SbCl_3 dans le CHCl_3 pour reprendre 5ml de résidu d'extrait C. Le développement d'une coloration bleue devenant rouge indique la présence des caroténoïdes (Subramanyam, G. B. et Parrish, D. B., 1976).

II.5.1.3.5. Les anthraquinones : Réaction de Borntrager

On prépare une solution de NaOH à 1%, quelques gouttes de cette dernière sont ajoutées à 0,5 ml de l'extrait, la présence d'anthraquinones est caractérisée par l'apparition d'une couleur qui vire au jaune, rouge ou violet.

II.5.1.3.6. Les saponines

Les saponines sont des substances caractérisés par leur pouvoir moussant en solution aqueuse qui donne l'indice de mousse.

Pour détecter leur présence dans l'extrait C une décoction à 1% est préparée dans de l'eau bouillante et maintenue à une ébullition légère pendant 15 minutes puis la suspension est filtrée. On introduit dans 10 tubes à essai successivement 1 à 10 ml de filtrat en complétant le contenu de chaque tube à 10 ml avec de l'eau, puis on agite le contenu de chaque tube pendant 15 secondes à raison de 2 agitations par seconde. La hauteur de mousse est mesurée 15 minutes après l'agitation.

L'indice de mousse est calculé à partir du numéro de tube N dans lequel la hauteur de mousse est de 1 cm.

$$I_m = 1000/N.....(02)$$

Les saponosides (sapogénines) peuvent être mise en évidence par des réactions colorées, dans notre étude en utilise la réaction de Liebermann, avec l'anhydride acétique en milieu sulfurique, les colorations différent selon que la génine est triterpénique (rose à rouge) ou stéroïdique (bleu-vert). (Saha,S *et al.*, 2011)

II.5.2. Caractérisation quantitative des saponines

La quantification de saponines présentes dans nos extraits se fait selon le protocole d'évaluation de l'activité hémolytique décrit plus loin (partie III.I). La teneur en saponines de chaque organe des deux astéries étudiées a été déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisé avec une saponine standard.

Une gamme étalon a été préparée à partir d'une solution standard de saponines de concentration massique de 1mg/ml, les dilutions ont été faite par un tampon phosphate salin (PBS) aux concentrations suivantes : 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml, 60 µg/ml, 80 µg/ml, 100 µg/ml.

II.6. Les activités biologiques

Nos extraits ont été soumis à une série d'expériences afin d'en évaluer l'activité biologique impliquant respectivement l'hémolyse (pour l'extrait de saponine), le stress oxydatif pour les extraits des caroténoïdes) ainsi que l'activité microbienne (pour les extraits des saponines et de caroténoïdes), les procédures suivies sont décrites ci-dessous.

II.6.1. L'activité hémolytique

Le test de l'activité hémolytique des extraits de saponines a été effectué in cellulo, sur une suspension érythrocytaire à 2% de sang chevalin, incubée dans le PBS, pH = 7,4 selon le protocole décrit par Apers *et al.*, (2001).

II.6.1.1. Préparation du PBS

La solution de PBS a été préparée à partir des masses correspondantes aux composés suivants dans 1L d'eau bi-distillée :

- 8g de NaCl.
- 1,156g de Na₂HPO₄.
- 0,2g de KCL.
- 0,2g de KH₂PO₄.

II.6.1.2. Préparation de la suspension érythrocytaire

Le sang doit être prélevé dans un tube hépariné à partir d'un cheval sain, il est ensuite lavé au PBS plusieurs fois et centrifugé 15 min à 1000 tr/min en jetant à chaque fois le surnageant (le plasma). Le culot ainsi obtenu est resolubilisé à nouveau par un volume de PBS (49ml de PBS pour 1ml de culot) la suspension érythrocytaire ainsi obtenue est diluée par le PBS.

II.6.1.3. Test d'hémolyse

Dans des tubes eppendorf 1980µl de la solution érythrocytaire sont délicatement mélangé à 20µl d'extrait de saponine de chaque orange, les tubes sont agités et incubés pendant une heure à température ambiante, par la suite on les centrifuge 10 minutes à 1000tr/min pour en récupérer le surnageant, en lire la densité optique (la fuite d'hémoglobine) à 540 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible de type OPTIMA® contre un blanc contenant du PBS.

Un tube témoin négatif est préparé dans les mêmes démarches expérimentales. Il est composé de 1980 µl de suspension érythrocytaire et 20 µl de solution tampon de PBS, en absence d'extrait.

Un autre tube d'hémolyse totale qui contient 20 µl de la suspension érythrocytaire et 1980 µl d'eau bi-distillé a été préparé en absence d'extrait. Le taux d'hémolyse des différents extraits est calculé en pourcentage (%) par rapport à l'hémolyse totale (Bensalah, 2014)

$$\% \text{ d'hémolyse} = \frac{A(\text{extrait } 60\text{min}) - A(\text{témoin négatif } 60\text{min})}{A(\text{Hémolyse totale } 60)} \times 100 \dots (3)$$

La figure ci-dessous retrace les étapes majeures pour l'évaluation de l'activité hémolytique de nos extraits.

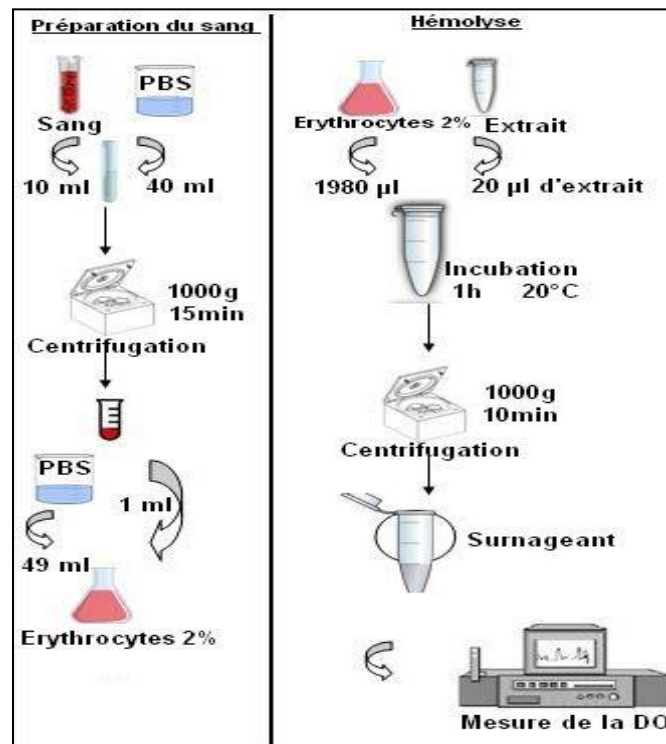


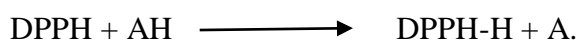
Figure 20 : Récapitulatif du protocole de l'évaluation de l'activité hémolytique.

II.6.2. L'activité antioxydante

Un antioxydant est toute substance présente à faible concentration par rapport au substrat oxydable capable de ralentir ou d'inhiber l'oxydation de ce substrat (Boubekri, 2014). L'activité antioxydante des extraits de caroténoïdes purifiés a été réalisée par le test de réduction du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

II.6.2.1. Test au DPPH

Ce test permet de mesurer le pouvoir réducteur par le calcul du pourcentage d'inhibition des caroténoïdes contenus dans nos extraits purifiés, le DPPH est un radical libre de couleur violette qui vire au jaune quand il est réduit par un donneur de proton H⁺.



(Où AH est un composé capable de céder un proton au DPPH) (El Nacer, 2012).

Une solution éthanolique de 60µM de DPPH est mélangée avec nos extraits purifiés d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* à raison de 975µl de DPPH et 2,5µl d'extrait, le mélange est incubé 20 minutes à l'abri de la lumière à température ambiante. L'absorbance est ensuite lue à 515nm contre un blanc qui contient 25µl d'H₂O et 975µl de méthanol. On réalise aussi un contrôle à base de 975µl de DPPH et 25µl d'eau distillée.

L'évaluation de l'activité antioxydante est exprimée en pourcentage selon la relation suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \frac{(A \text{ Contrôle} - A \text{ Echantillon})}{A \text{ Contrôle}} \times 100 \dots \dots (4)$$

II.6.3. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne a été testée sur des souches de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* par la méthode de diffusion de disques. Les souches bactériennes sont obtenues de l'institut Pasteur et sont réactivées au préalable car les tests doivent être réalisés sur des cultures en phase de croissance exponentielle.

La préparation de l'inoculum se fait en suivant les étapes ci-dessous :

- **Préparation de pré-culture**

Chacune des souches est repiquée dans un bouillon nutritif et incubée à 37°C pendant 24h. Ensuite les souches sont cultivées dans des boîtes de pétri contenant de la gélose nutritive pendant 18h à 37°C.

▪ Préparation de la suspension bactérienne

On racle 7 à 9 colonies identiques et bien isolées à partir des cultures sur GN dans 9 ml d'eau physiologique stérile, et on agite pendant quelques secondes au vortex. Comme les concentrations bactériennes sont évaluées par turbidité la suspension bactérienne doit être ajustée à une DO de 0,5 à 0,9 à 650nm. L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, soit de la culture si il est trop faible, soit de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

II.6.3.1. Méthode de diffusion en milieu solide

Cette méthode consiste à déposer à la surface de la gélose des disques de papier Whatman™ imprégnés des différents extraits testés. Chaque extrait diffuse au sein de la gélose à partir du disque. Si l'ensemencement est correctement fait, on peut observer au bout de 24h les disques entourés d'une zone d'inhibition dont le diamètre est mesuré afin de déterminer la sensibilité de la souche bactérienne vis à vis de nos extraits (Fig. 21) (Nafti, 2008)

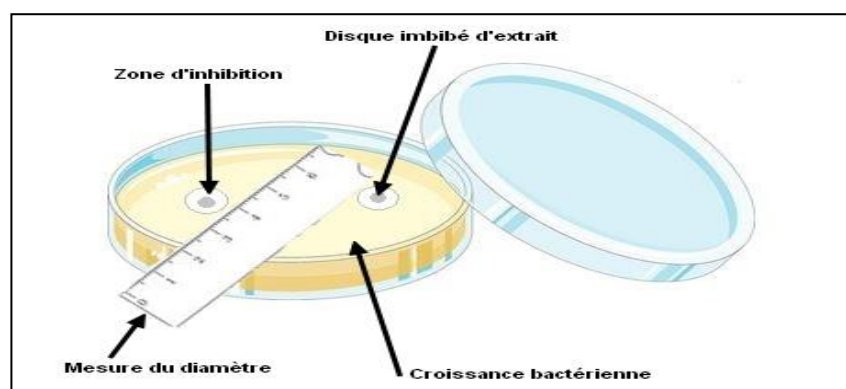


Figure 21 : Illustration de la méthode de diffusion sur milieu solide.

▪ L'ensemencement

Dans des boîtes de pétri de 9cm de diamètre, les milieux de cultures sont coulés aseptiquement sur une épaisseur de 4 mm et laissés refroidir et solidifier sur la pailleasse, gélose Mac Conkey pour *Escherichia coli* et Chapman pour *Staphylococcus aureus*. Par la suite on inocule chaque boîte avec 1ml de suspension bactérienne fraîchement préparée à l'aide d'un râteau.

▪ Dépôt des disques

Les disques d'antibiotiques sont imprégnés d'extraits et déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile.

- **Lecture**

Après diffusion de l'extrait, étuver les boîtes à 37°C durant 18 à 24h, l'activité antibactérienne est déterminée à l'aide d'une règle mesurant le diamètre de la zone d'inhibition.

Les résultats peuvent être symbolisés par des signes d'après la sensibilité des souches :

- **Non sensible ou résistante (-)** : diamètre < 8mm
- **Sensible (+)** : diamètre entre 9 et 14mm
- **Très sensible (++)** : diamètre entre 14mm et 20mm
- **Extrêmement sensible (+++)** : diamètre > 20mm

II.7. Analyse statistique

Les analyses statistiques réalisés pour ce travail se sont résumé au calcul de la moyenne et de l'écart type, pour se faire on s'est aidé de Microsoft Excel 2007.

III. Résultats et discussion

III.1. Mesures biométriques

Le tableau ci-après récapitule les résultats des mesures biométriques.

Tableau III : Mesures biométriques des deux étoiles de mer *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*.

Mesures	<i>Echinaster sepositus</i>	<i>Ophidiaster ophidianus</i>
Taille moyenne (cm)	15 (± 0.22)	17 cm (± 0.12)
Poids moyen (g)	43.35 (± 9.34)	58.08 (± 15.25)
Diamètre moyen du disque central (r) (cm)	2.08 (± 0.39)	2 (± 1)
Longueur moyenne des bras (R) (cm)	6.74 (± 0.83)	6.75 (± 2.31)
Rapport R/r (cm)	Varie entre 2.77 et 3.66 Moyenne = 3.22 ± 0.24	Varie entre 0.33 et 7 Moyenne = 3.51 ± 1.8

III.2. Caractérisation des substances actives

III.2.1. Caractérisation qualitative

III.2.1.1. L'extrait A

Les résultats de caractérisation des protéines et des peptides de différents compartiments anatomiques d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV : Résultats des caractérisations qualitatives de substances actives dans l'extrait A.

L'extrait et l'organe	Extrait A (Extrait aqueux).	
<i>Echinaster sepositus</i>	Protéines	Peptides
TEG ABO	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
TEG ORL	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
CAE	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
GON	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
<i>Ophidiaster ophidianus</i>		
TEG ABO	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
TEG ORL	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)
GON	++ (couleur violet)	++ (couleur violet)
CAE	++ (couleur mauve)	++ (couleur mauve)

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

D'après les résultats obtenus on conclue que l'extrait A est un extrait riche en protéines et en peptides.

III.2.1.2. L'extrait B

Deux tests sont effectués pour caractériser qualitativement l'extrait B. Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau ci-dessous :

Résultats et discussion

Tableau V : Résultats des caractérisations qualitatives de substances actives dans l'extrait B.

L'extrait et l'organe	Extrait B (Phase aqueuse de l'extrait méthanolique)	
<i>Echinaster sepositus</i>	Terpénoïdes	Caroténoïdes
TEG ABO	-	+
TEG ORL	+ rouge-marron	+
CAE	-	-
GON	+ rouge-marron	+
<i>Ophidiaster ophidianus</i>		
GON	+ rouge-marron	+
TEG ABO	-	+
TEG ORL	+ rouge-marron	+
CAE	-	-

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

D'après les résultats on note la présence de terpénoïdes et des caroténoïdes dans les extraits B des téguments et des gonades des deux espèces étudiées *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* (**fig. 22**).

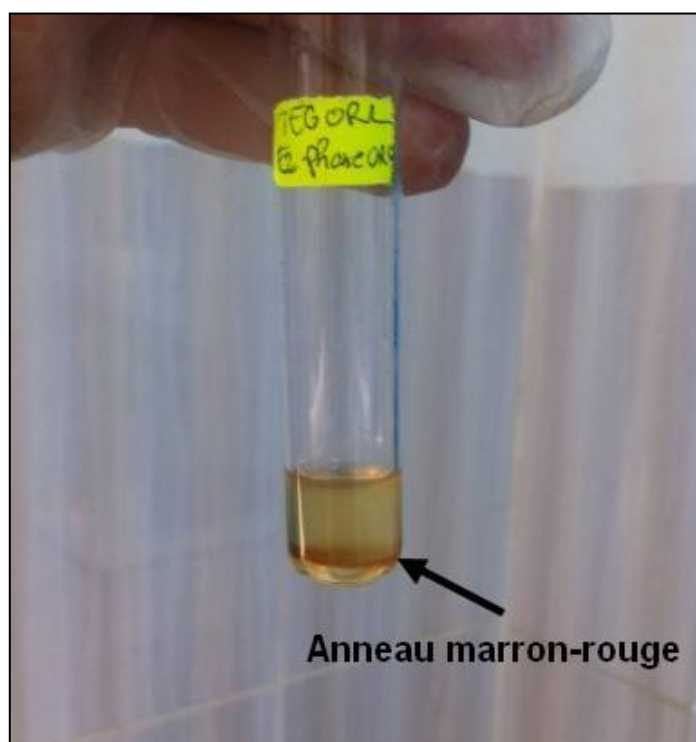


Figure 22 : Test positif pour la présence des terpénoïdes dans l'extrait B. (Image ©HADADIA)

III.2.1.3. L'extrait C

Tableau VI : Résultats des caractérisations qualitatives de substances actives dans l'extrait C.

L'extrait et l'organe	L'extrait C (Phase organique de l'extrait méthanolique)					
<i>Echinaster sepositus</i>	Stéroïdes	stérols et triterpènes	Saponines	Les terpénoïdes	caroténoïdes	Anthraquinone
TEG ABO	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	+ Rouge	+ (marron très clair)	+++ Jaune
TEG ORL	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	+ rouge	+++ Marron	+ Violet
CAE	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	-	++ marron	+ Violet
GON	+++ Anneau rouge	+++ Violet	+++ (bleu vert)	+ Rouge	+ marron Très clair	+ violet
<i>Ophidiaster ophidianus</i>						
GON	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	+ Rouge	+ marron très clair	+ Violet
TEG ABO	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	+ Rouge	+++ Bleu	++ Rouge
TEG ORL	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	+ Rouge	+ Marron clair	-
CAE	+++ Anneau rouge	+++ violet	+++ (bleu-vert).	-	+++ marron	+++ Jaune

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

On a testé la présence de stéroïdes de stérols de saponines de terpénoïdes et d'antraquinones dans l'extrait C, les résultats des tests sont mentionnés dans le tableau ci-dessus.

D'après les résultats obtenus, nous remarquons la présence des stéroïdes, des stérols, des saponines et des anthraquinones dans les différents organes (tégument oral et aboral, gonades et cæca pyloriques) d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster*

ophidianus. Et la présence des caroténoïdes dans les téguments et les gonades seulement des deux espèces. La couleur bleu-vert obtenue lors de la caractérisation des saponines indique que leur génine est stéroïdique.

L'analyse des résultats de dosage qualitative des différents extraits de chaque organe d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* permet d'en tirer les conclusions suivantes :

- **l'extrait A** : Issu de l'extraction à l'eau, c'est l'extrait qui regroupe les produits les plus polaires, comme les protéines et les peptides.
- **l'extrait B** : issu de l'extraction hydro-alcoolique, est un extrait qui contient les produits de polarité intermédiaire comme les triterpénoïdes.
- **l'extrait C** : Issu de l'extraction au dichlorométhane, est un extrait qui contient les produits peu polaires comme les acides gras et les stérols, les saponines, les caroténoïdes et les anthraquinones.

III.2.1.4. Test de saponification et l'indice de mousse

L'agitation des extraits des saponines obtenus du tégument aboral, du tégument oral, des gonades et des caeca pyloriques d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* provoque la formation d'une mousse importante.

La hauteur de mousse formée au niveau des différents tubes testés dépasse 1 centimètre et l'indice calculé pour tous les extraits est de 100 %.

III.2.2. Caractérisation quantitative

III.2.2.1. Les saponines

Selon la courbe d'étalonnage établie à partir d'une saponine standard (**Fig. 23**) les concentrations de saponines dans nos extraits sont mentionnées dans le **tableau VII**

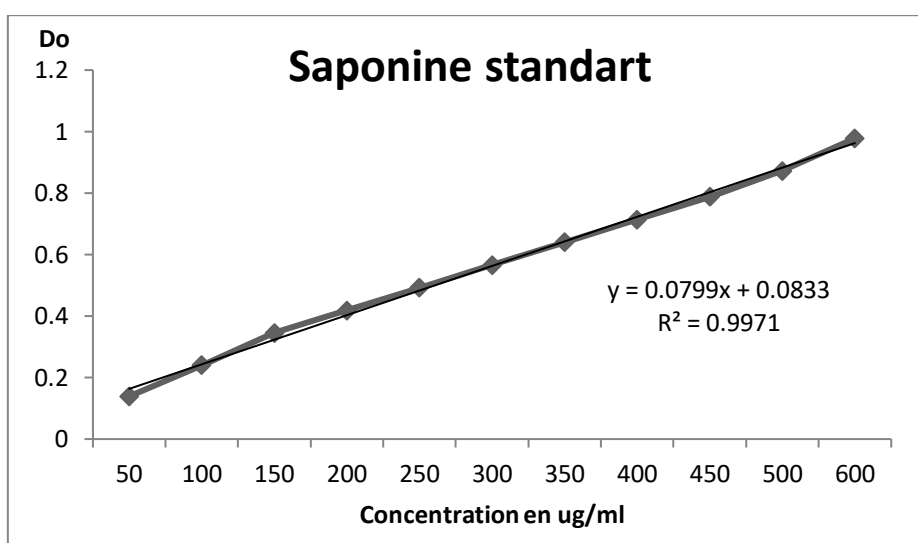


Figure 23 : Courbe d'étalonnage établie à partir d'une saponine standard.

Résultats et discussion

Tableau VII : Concentrations des saponines dans les extraits organiques des deux étoiles de mer.

Extraits	DO	Concentration en $\mu\text{g/ml}$	Concentration en mg/g de poids sec
<i>Echinaster sepositus</i>			
TEG ORL	0.868	9.821	3.274
TEG ABO	0.743	4.877	1.626
GON	0.812	9.120	3.040
CAE	0.532	5.615	1.872
<i>Ophidiaster ophidianus</i>			
TEG ORL	0.854	9.646	3.215
TEG ABO	0.775	8.657	2.886
GON	0.792	8.870	2.957
CAE	0.926	10.547	3.516

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

Les valeurs des saponines obtenues par la méthode d'hémolyse sont relatives. Et d'après les résultats reportés dans le **Tableau VII** la teneur des saponines montre une hétérogénéité inter-organes chez les deux espèces *Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*.

Chez *Echinaster sepositus* les valeurs obtenues, telles qu'exprimées en mg/g de poids sec dans le **Tableau VII** sont de 3.040 mg/g pour les gonades, de 3.274 mg/g pour le tégument oral, de 1.872 mg/g pour les cæca pyloriques, et de 1.626 pour le tégument aboral.

Chez *Ophidiaster ophidianus*, les concentrations de saponines les plus élevées sont retrouvées dans les cæca pyloriques et les téguments oraux avec 3.516 et 3.215 mg/g respectivement. Leur concentration dans les gonades et les téguments aboraux sont relativement proches et de l'ordre de 2.957 et 2.866 mg/g respectivement.

Plusieurs auteurs signalent cette répartition hétérogène des saponines dans les constituants anatomiques d'une même espèce et entre différentes espèces. Yasumoto (1966) parle d'une prépondérance des saponines dans les cæca pyloriques et les gonades de *Asteria rubens*, chez *Asteria murensis* c'est l'estomac et les gonades qui en possèdent la concentration la plus élevée. Mayo et Mackie (1976) ont désigné les podia comme constituant anatomique le plus riche en saponines. Ces auteurs ont émis des hypothèses pouvant expliquer cette hétérogénéité de répartition des saponines dans les différents organes d'étoiles de mer en se basant sur le rôle de ces dernières dans ces organes, Il a été suggéré que l'abondance des saponines au niveau des gonades et des larves reviendrait au rôle de défense que jouent ces molécules contre les agents chimiques et la prédation. Ceci pourrait expliquer la concentration de saponines élevée dans les gonades d'*Echinaster sepositus*, Il a été abordé plus tôt dans le document que la propriété toxique des saponines provoquait une réaction de fuite de la part des autres organismes marins, Ceci pourrait expliquer leur concentration élevée au niveau du tégument oral d'*Echinaster sepositus* étant donné que c'est le constituant anatomique en première ligne en cas d'assaut extérieur.

Mackie (1976) émet l'hypothèse que les saponines jouerait un tout autre rôle au niveau des cæca pyloriques et de l'estomac en solubilisant le cholestérol des proies, la prépondérance des saponines au niveau des cæca pyloriques d'*Ophidiaster ophidianus* pourrait donc être expliqué par son régime alimentaire, en effet, cette dernière est carnivore et se délecte habituellement de mollusques bivalves dont elle aspire le contenu après les avoir liquéfiés au moyen de son système digestif dévaginable, cette particularité est inexistante chez *Echinaster sepositus* qui est détritivore et dont la nourriture microscopiques ne nécessite pas une forte intervention des saponines dans l'estomac et les cæca pyloriques. [http:// http://doris.ffessm.fr/ww](http://doris.ffessm.fr/ww)

D'autres paramètres peuvent influencer l'évaluation de la teneur des saponines dans les étoiles de mer à savoir la méthode d'extraction, les méthodes et le degré de purification, les méthodes et le degré de quantification, l'état du matériel biologique avant l'extraction, la période de prélèvement.

III.3. Les activités biologiques

III.3.1. Activités hémolytique des extraits de saponines

Les résultats des tests d'hémolyse réalisés, montre une activité hémolytique remarquable concernant les saponines obtenues à partir des différents compartiments anatomiques d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* (**Tab. VIII**)

Tableau VIII : Pourcentage d'hémolyse des extraits d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus*.

Extraits	% d'hémolyse	Concentration en mg/g de poids sec
<i>Echinaster sepositus</i>		
TEG ORL	84.093	3.274
TEG ABO	45.781	1.626
GON	78.661	3.040
CAE	51.503	1.872
<i>Ophidiaster ophidianus</i>		
TEG ORL	82.735	3.215
TEG ABO	75.073	2.886
GON	76.722	2.957
CAE	89.719	3.516

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

Les résultats obtenus montrent que les extraits des saponines des différents oranges d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* ont un pouvoir hémolytique important.

Chez *Echinaster sepositus* un pouvoir hémolytique très fort est enregistré pour les saponines **du tégument oral** avec un pourcentage d'hémolyse de l'ordre de 84.093 %. En effet, le degré de l'activité hémolytique de saponines de cette espèce sera décrit

selon le classement décroissant suivant : taux d'hémolyse des saponines de tégument oral (84.093%)> taux d'hémolyse des saponines des gonades (78.661%) >taux d'hémolyse des cæca pylorique (15,503) > taux d'hémolyse des saponines de tégument aboral (45.781%). Cette différence dans le degré de toxicité des différentes saponines d'*Echinaster sepositus* à l'encontre des globules rouges peut être attribuée à la quantité des saponines dans les différents organes. **La quantité des saponines dans les différents organes d'*Echinaster sepositus* suit le même classement que le pouvoir hémolytique (Tab. 8) :** teneur des saponines du tégument oral (3.274mg/g)> teneur des saponines des gonades (3.040 mg/g)> teneur des saponines des cæca pyloriques (1.872 mg/g) > teneur des saponines du tégument aboral (1.626 mg/g).

Concernant *Ophidiaster ophidianus* le pouvoir hémolytique est tout aussi important avec le pourcentage le plus élevé d'hémolyse de l'ordre de 89.719% observé dans les cæca pyloriques, Le degré de l'activité hémolytique des saponines chez cette espèce est décrit selon le classement décroissant suivant : Saponines des cæca pyloriques (87.719%) > saponines du tégument oral (82.735%) > saponines des gonades (76.722%) > saponines du tégument aboral (75.073%). On peut en conclure une fois de plus que la différence de degré de toxicité des différentes saponines d'*Ophidiaster ophidianus* revient à la différence de concentration des saponines dans les différents organes, on en dégage alors le classement suivant :

teneur des saponines des cæca pylorique (3.516mg/g)> teneur des saponines du tégument oral (3.215mg/g)> teneur des saponines dans les gonades (2.957 mg/g) > teneur des saponines du tégument aboral (2.886 mg/g).

III.3.2. Activité antioxydante des caroténoïdes

Le piégeage du radical stable de DPPH⁺ est l'une des méthodes les plus utilisées pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de la stabilité du radical de DPPH à température ambiante et la simplicité de l'analyse.

Les résultats relatifs à l'activité anti-oxydante des caroténoïdes isolés à partir du tégument oral, du tégument aboral et des gonades d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* sont rapportés dans le **tableau IX**.

Les résultats obtenus sont exprimés en pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH.

Tableau IX : Pourcentage d'inhibition des extraits de caroténoïdes purifiées des deux étoiles de mer.

Extraits	% d'inhibition moyens	Écart type
<i>Echinaster sepositus</i>		
TEG ORL	81.897	±0.072
TEG ABO	77.434	±0.072
GON	88.742	±0.143
<i>Ophidiaster ophidianus</i>		
TEG ORL	92.039	±0.072
TEG ABO	75.406	±0.072
GON	85.243	±0.072

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

D'après les résultats obtenus (**Tab IX**), les extraits de caroténoïdes isolés à partir d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* ont montré une activité anti oxydante importante, pour *Echinaster sepositus* les gonades enregistre le pourcentage de piégeage de radical DPPH le plus élevé avec 88.742 %, suivi du tégument oral et aboral qui ont montré un pourcentage un peu moins élevé de l'ordre de 81.897 % et 77.434% respectivement. Ceci peut être expliqué par la coloration foncée de leurs gonades observées durant la dissection et pouvant revenir aux pigments caroténoïdes. (**Fig. 8**).

Concernant *Ophidiaster ophidianus* c'est le tégument oral qui possède le pourcentage d'inhibition le plus élevé notamment 92.039 % suivi des gonades et du tégument aboral avec respectivement 85.243 et 75.406 %. Ce résultat peut être expliqué par l'abondance des caroténoïdes dans le tégument d'*Ophidiaster ophidianus* lui donnant cette couleur orange foncé.

La différence dans l'activité anti-oxydante des différents extraits des caroténoïdes des deux espèces étudiés peut aussi être attribuée à la différence dans leurs compositions chimiques.

Le DPPH entre en réaction avec les caroténoïdes testés (agent réducteur) donneur d'atomes d'hydrogènes qui sont capable de réduire ce radical. Les travaux réalisés par les différents chercheurs sur plusieurs espèces d'astéries ont démontré que les caroténoïdes de ces espèces notamment l'astaxanthine, la 7,8-didéshydroastaxanthine, la b-doradéxanthine , la zéaxanthine, α et β carotènes, échinénone, lutéine, diatoxanthine...etc sont des antioxydants puissants et font déjà l'objet d'un développement pharmaceutique (Kornprobst, 2005; Matranga, 2006).

III.3.3. Activité antibactérienne

Méthode de diffusion en milieu solide :

Le tableau suivant résume l'ensemble des observations effectuées sur l'effet des extraits des saponines et des caroténoïdes d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* sur la croissance de souches bactériennes testées (*S. aureus* et *E. coli*) :

Tableau X : l'activité antibactérienne in vitro obtenus à l'aide de la méthode de diffusion sur milieu solide.

Organes et extraits	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Extraits de saponines		
1. <i>Echinaster sepositus</i>		
TEG ORL	4.1 (± 0.05) Résistantes	5.4 (± 0.04) Résistantes
TEG ABO	0,12 (± 0.05) Résistantes	5.8 (± 0.06) Résistantes
CAE	6,75 (± 0.03) Résistantes	5.9 (± 0.06) Résistantes
GON	10.5 (± 0.04) Sensibles	Résistantes
2. <i>Ophidiaster ophidianus</i>		
TEG ORL	18,2 (± 0.05) Très sensibles	5.4 (± 0.05) Résistante
TEG ABO	1.5 (± 0.05) Résistantes	1 (± 0.05) Résistantes
CAE	25,2 (± 0.05) Extrêmement sensibles	1 (± 0.05) Résistantes
GON	9.7 (± 0.04) Sensibles	10 (± 0.05) Sensibles
Extrait de caroténoïdes		
1. <i>Echinaster sepositus</i>		
TEG ORL	6 Résistantes	2 (± 0.05) Résistantes
TEG ABO	4 (± 0.06) Résistantes	2.5 (± 0.05) Résistantes
GON	1,12 Résistantes	4 (± 0.05) Résistantes
2. <i>Ophidiaster Ophidianus</i>		
TEG ORL	4.7 (± 0.04) Résistantes	7 (± 0.04) Résistantes
TEG ABO	6.5 (± 0.07) Résistantes	8 (± 0.05) Résistantes
GON	9.7 (± 0.05) sensibles	8.5 (± 0.04) mm Faiblement sensibles

TEG ABO : Tégument aboral, TEG ORL : Tégument oral, CAE : Cæca pyloriques
GON : Gonades.

- **Activité antimicrobienne des saponines**

D'après les résultats obtenus, il s'est avéré qu'aucune zone d'inhibition autour des disques n'a été observée vis-à-vis de *E. Coli*. Ces bactéries ont montré un grand potentiel de résistance contre l'action antibactérienne de l'ensemble des extraits de saponine d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*. En revanche, *S. aureus* a

montré une sensibilité à l'extrait de saponine des gonades d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus*. Le diamètre de la zone d'inhibition est de 10.5 mm (± 0.04) pour l'extrait des saponines des gonades d'*Echinaster sepositus*, de 9.7 mm (± 0.04) pour l'extrait des saponines des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* (**Fig. 24**)

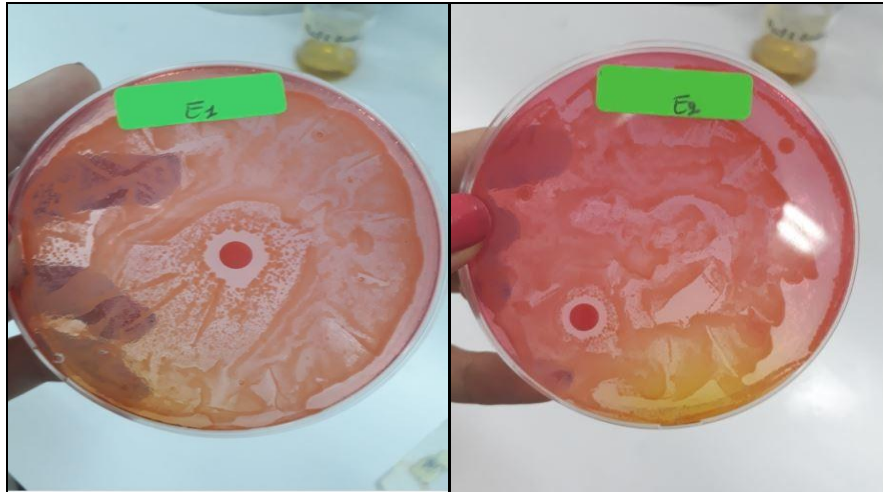


Figure 24 : Zones d'inhibition des extraits de saponines des gonades des deux genres d'étoiles de mer, (E1 : *Ophidiaster ophidianus*, E2 : *Echinaster sepositus*)

Ces résultats indiquent que les saponines des gonades d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* présentent une activité intéressante contre les bactéries à gram⁺, mais elles sont inactives contre les bactéries gram⁻. Ces dernières sont connues par leur résistance élevée à cause des lipopolysaccharides qui se trouvent à la surface de leurs membranes externes.

Les extraits de saponines des cæca pyloriques et du tégument oral d'*Ophidiaster ophidianus* ont montré une activité antibactérienne importante contre *S. aureus* avec des diamètres d'inhibition de 25,2 (± 0.05) et 18,2 mm (± 0.05) respectivement. Ce résultat peut être attribué à la quantité de saponines plus importantes dans ces organes comme il a été précédemment discuté dans la partie de l'activité hémolytique.

- **Activité antimicrobienne des caroténoïdes**

Presque la totalité des extraits de caroténoïdes des deux genres d'étoiles de mer ont été inactifs sur les souches d'*E. coli*. Cette inactivité peut être attribuée au fait qu'elles soient des bactéries Gram - et donc pourvues d'une structure bi membranaire les rendant plus résistantes aux antibiotiques.

Les extraits de caroténoïdes des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* ont eu un léger effet antibactérien contre les souches d'*E. coli* avec une zone d'inhibition de 8.5 mm (± 0.04) (Fig.).

Vis à vis de *S. aureus* les extraits de caroténoïdes d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* ont montré la même inactivité, seul les extraits de

caroténoïdes des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* ont montré une légère activité antibactérienne avec une zone d'inhibition de 9,7 mm (± 0.05) (**Fig. 25**). Ceci peut être expliqué par la différence dans leurs compositions chimiques par rapport aux autres organes ou même dans leurs teneurs, d'autant plus que les extraits de caroténoïdes des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* ont réussi à légèrement sensibiliser une bactérie Gram - malgré sa résistance bien connue.



Figure 25 : Zones d'inhibition des extraits de caroténoïdes des gonades des deux étoiles de mer, G *E.coli* : *E.coli*, Staph Gon carot : *S. aureus*.

La sensibilité des bactéries aux saponines et aux caroténoïdes des gonades d'*Echinaster sepositus* et d'*Ophidiaster ophidianus* est due à l'affinité de ces substances pour les stérols des membranes en particulier le cholestérol (Jorg et al., 2011) avec lesquels se forment des complexes insolubles. Ces complexes générant des canaux et des pores dans la membrane (Stonik et al., 1999; Jorg et al., 2011) En effet, les saponines avec le cholestérol des membranes cellulaires et l'ergostérol des membranes fongiques forment des complexes qui génèrent des petits canaux solitaires et qui deviennent de plus en plus larges avec de fortes doses.

Conclusion

Notre étude a consisté à extraire les substances actives de deux étoiles de mer Algériennes et d'en évaluer les activités biologiques, L'établissement d'une conclusion unique et définitive serait difficile étant donné la nature des résultats obtenus dans ce travail c'est pour cela qu'on en dégage différentes conclusions dont la solution finale nécessite la continuité de cette étude.

Tout d'abord l'indice de mousse a effectivement révélé la présence en abondance des saponines dans nos différents extraits d'étoiles de mer.

L'étude de l'activité hémolytique des saponines nous a facilité la compréhension de leurs fonctions biologiques, lors des tests, il a été constaté que l'incubation des globules rouges chevalines avec les saponines conduit à libérer l'hémoglobine après leur contact. Les performances d'hémolyse diffèrent d'un organe à un autre, en effet les extraits de saponines des organes ayant montré l'effet le plus important se trouve être les gonades et le tégument oral concernant *Echinaster sepositus* avec des taux d'hémolyse allant de 45.781 % à 84.093%, en revanche ce sont les cæca pyloriques d'*Ophidiaster ophidianus* qui enregistre le taux d'hémolyse le plus élevé avec 89.719%. De ces résultats se sont dégagés deux hypothèses pour justifier la différence de performance, notamment la grande diversité chimique de ces molécules et leur distribution hétérogène dans les organes.

L'analyse quantitative réalisée par la détermination du pourcentage d'hémolyse des globules rouges produit par chaque extrait démontre aussi que les teneurs des saponines sont relativement différentes dans les organes. Ces distributions sont probablement corrélées aux rôles des saponines dans les différents organes.

Notre intérêt s'est aussi porté sur l'étude de l'activité antioxydante des caroténoïdes isolés des extraits d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, il en est ressorti des résultats intéressants notamment des taux d'inhibition élevés pour les extraits de caroténoïdes des gonades et du tégument oral d'*Echinaster sepositus* respectivement 88.742 et 81.897%. D'après les résultats obtenus les extraits de caroténoïdes isolés à partir d'*Ophidiaster ophidianus* ont montré une activité antioxydante plus importante avec respectivement 92.039 et 85.243 % pour le tégument oral et les gonades. Au terme du test de l'activité antioxydante on a présumé que la différence des résultats des extraits des caroténoïdes des deux espèces étudiés est dû à la différence dans leurs compositions chimiques et leurs teneurs.

Les travaux menés lors de notre étude ont permis de mettre en évidence l'activité antibactérienne des saponines d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, en effet, les saponines des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* et *Echinaster sepositus* ont exercé une activité antimicrobienne à l'encontre de *S. aureus* par rapport aux saponines des autres organes. Les saponines des gonades d'*Ophidiaster ophidianus* ont entraîné

Conclusion

une légère sensibilité des souches d'*E.coli* malgré la résistance de ces dernières à l'ensemble des autres extraits.

Pour conclure, la démarche pluridimensionnelles adoptée dans cette étude à permis de mieux assimiler l'activité biologique des substances actives d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, les résultats encourageants qui ont été obtenus ouvrent de nombreuses perspectives relatives à la recherche des substances actives des étoiles de mer en général et d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* en particulier, notamment :

- L'étude des relation structure-fonction pour mieux assimiler et expliquer l'hétérogénéité de la distribution inter-organe des substances actives.
- L'utilisation d'approches plus sophistiquées pour comprendre les fonctions de chaque substance actives chez nos deux étoiles de mer.
- Des études plus poussées de l'activité antibactérienne pour confirmer ou infirmer l'efficacité des saponines d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, éventuellement sur d'autres souches bactériennes.

Bibliographie

- Ackman, R. G. (1989). Marine biogenic lipids, fats and oils. **2**: 504.
- Alvarado, J. J. and F. A. Solís-Marín (2012). Echinoderm research and diversity in Latin America. S. S. B. Media, Springer: 658.
- Apers, S., Baronikova, S., Sindambiwe, J. B., Witvrouw, M., De Clercq, E., Berghe, D. V., & Pieters, L. (2001). Antiviral, haemolytic and molluscicidal activities of triterpenoid saponins from *Maesa lanceolata*: establishment of structure-activity relationships. *Planta medica*, 67(06), 528-532.
- ARAB, A., CHERBI, M., -ABROUS, O., SANOUN, G. (2013). Zoologie Office des publications universitaires
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435-457.
- BENSALAH, F. (2014). Contribution à l'étude phytochimiques et l'effet hémolytique de l'extrait brut hydroalcoolique de la partie aérienne de *Marrubium vulgare* L (Doctoral dissertation).
- Bessas, A., Benmoussa, L., & Kerarma, M. (2008). Dosage biochimique des composés phénoliques dans les dattes et le miel récoltés dans le sud Algérien. Diplôme d'Etat en biologie, faculté des sciences, Université Djillah Liabes, Sidi Bel Abbes, Algérie, 81.
- Bhakuni, D. S. and D. S. Rawat (2006). Bioactive marine natural products. Springer. New York, Springer Science & Business Media: 382.
- Boell, E.J. (1955). The invertebrates: Echinodermata. The Coelomate Bilateria. New-york: McGraw-Hill, 329.
- Boubekri, C. (2014). Etude de l'activité antioxydante des polyphénols extraits de *Solanum melongena* par des techniques électrochimiques. Sciences de la matière Mohamed Khider -Biskra-. **Doctorat en sciences** 176.
- Boumediene, H., et Bouras, D. (2014). First observation of the macrozoobenthos biodiversity of Oran coastal area, Algeria. Biodiversity and Environmental Sciences, **5**: 625-637.
- Britannica Illustrated Science Library. (2008). Chicago, IL: Britannica, 504.
- Brueggeman, P. (1998). Underwater field guide to Ross Island & McMurdo Sound, Antarctica. UC San Diego, USA, Scripps Institution of Oceanography Library.
- Brusca, R. C. and G. J. Brusca (2003). Invertebrates. S. Associates, Sinauer Associates: 936.
- Chamundeeswari, K., Saranya, S., & Rajagopal, S. (2012). Exploration of potential antimicrobial activity of sea star *astropecten indicus*.
- Clarkson, E. N. K. (1998). Invertebrate palaeontology and evolution, John Wiley & Sons.

Cochard, C. (2002). Recherche de substances naturelles bioactives chez des invertébrés marins: les spongiaires: rapport de stage. Sciences de la matière Nouméa, Université de la Nouvelle Calédonie **DEUG 57**.

Corning, W. C., Dyal, J. A., & Willows, A. O. D. (Eds.). (1975). Invertebrate learning. Plenum Press.

Cronodon.com.Asteroids_hydraulics. [En Ligne] Disponible sur : <http://cronodon.com/BioTech/Asteroids_hydraulics.html (15/06/2017)>

Dahmoune, B. (2015). Extraction et évaluation de l'activité biologique des saponines (glycosides de stéroïde) de l'étoile de mer Echinaster (Echinaster) sepositus (Retzius, 1783). Science de la Mer et de l'Aquaculture, Abdelhamid Ibn Badis-MOSTAGANEM-. **Magister en sciences de la mer** 136.

Datta, D., Talapatra, S. N., & Swarnakar, S. (2015). Bioactive compounds from marine invertebrates for potential medicines-an overview. *International Letters of Natural Sciences*, 7.

Demeyer, M., De Winter, J., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P., & Gerbaux, P. (2014). Molecular diversity and body distribution of saponins in the sea star *Asterias rubens* by mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 168, 1-11.

Dirk, E. (1970). Asteroidea of Mombasa Marine National Park And Reserve Vrije Universiteit Brussel. **Masters** 82.

Dong, G., Xu, T., Yang, B., Lin, X., Zhou, X., Yang, X., & Liu, Y. (2011). Chemical constituents and bioactivities of starfish. *Chemistry & biodiversity*, 8(5), 740-791.

Doris.ffessm.fr. DORIS - Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatique. [En ligne] Disponible sur : <<http://doris.ffessm.fr>> (16/06/2017)

El Nacer, H. A. (2012). *Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de Rhamnus alaternus L* (Doctoral dissertation, Université Ferhat Abbas de Sétif 1).

Enay, R. (1993). The Paleontology Of Invertebrates United States, Springer-Verlag New York Inc.

Gale, K. S. P. (2013). Ecology of deep-sea Asteroidea from Atlantic Canada. Biology, Memorial University of Newfoundland. **Master of science** 114.

Galewska, Z., Gogiel, T., Małkowski, A., Romanowicz, L., Sobolewski, K., & Wolańska, M. (2013). *Biochemistry Workbook*. Poland: Medical University of Białystok.

Genin, G. (1966). "Le séchage par lyophilisation et ses applications aux produits laitiers." Le Lait **46**(459-460): 621-630.

Gilpin, D. (2006). Starfish, Urchins, and Other Echinoderms, Compass Point Books.

- Göthel, H. (1996). Guide de la faune sous-marine: la Méditerranée: invertébrés marins et poissons. Editions Eugen Ulmer.
- Harmelin, J. G., & Ruitton, S. (2010). The thermophilic Asteroidea *Ophidiaster ophidianus* on the NW Mediterranean coasts: evidence of frequency increase. *Sci. Rep. Port-Cros natl. Park*, 24, 127-137.
- Guille, A., Laboute, P., & Menou, J. L. (1986). Guide des étoiles de mer, oursins et autres échinodermes du lagon de Nouvelle-Calédonie (Vol. 25). IRD Editions.
- Hegner, R. W. (1933). Invertebrate zoology New York The Macmillan Company.
- Hyman, L. (1955). The Invertebrates: Echinodermata. The Coelomate Bilateria. McGraw-Hill. New York.
- Ivanchina, N. V., Kicha, A. A., Kalinovsky, A. I., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A., Riguera, R., & Jiménez, C. (2000). Hemolytic Polar Steroidal Constituents of the Starfish *Aphelasterias japonica*. *Journal of natural products*, 63(8), 1178-1181.
- Jha, R. K. and X. Zi-Rong (2004). "Biomedical compounds from marine organisms." Marine drugs 2(3): 123-146.
- Khacheba, I. and H. Benamar (2008). Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur l'alpha-amylase. Biologie, Amar Telidji-LAGHOUAT-. **Ingénieur d'état en biologie** 75.
- Khan, R. A., Khan, R. M., Sahreen, S., Bokhari, J., Rashid, U., & Jan, S. (2011). Phytotoxic characterization of various fractions of *Launaea procumbens*. *African Journal of Biotechnology*, 10(27), 5377-5380.
- Khanna, D. R. (2005). *Biology of Echinodermata*. D. P. House: 393.
- Koehler, R. (1969). *Echinodermes* (Vol. 1). Librairie de la Faculté des sciences.
- Kornprobst, J. M. (2005). Substances naturelles d'origine marine Nantes: Tec&Doc Lavoisier
- Lawrence, J. M. (2013). *Starfish: biology and ecology of the Asteroidea*. J. H. U. Press. Baltimore (Maryland): 267.
- Lee, C. C., Hsieh, H. J., Hsieh, C. H., & Hwang, D. F. (2014). Antioxidative and anticancer activities of various ethanolic extract fractions from crown-of-thorns starfish (*Acanthaster planci*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 38(3), 761-773.
- Lee, C. C., Tsai, W. S., Hsieh, H. J., & Hwang, D. F. (2013). Hemolytic activity of venom from crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* spines. *Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases*, 19(1), 22.
- Lewbart, G. (2006). *Invertebrate Medicine*. Wiley, Blackwell publishing: 327.
- Macalister, A. and A. S. Packard (1879). *Zoology* New York, Henry Holt And Company. **2**: 134.

- Mah, C. L. and D. B. Blake (2012). "Global diversity and phylogeny of the Asterozoa (Echinodermata)." PloS one 7(4): e35644.
- Makkar, H. P. S., Norvsambuu, T., Lkhagvatseren, S., & Becker, K. (2007). Plant secondary metabolites. Method in molecular biology H. Press.
- Marinespecies.org. WoRMS - World Register of Marine Species. [En ligne] Disponible sur: <<http://www.marinespecies.org>> (16/06/2017)
- Maoka, T., Akimoto, N., Kuroda, Y., Hashimoto, K., & Fujiwara, Y. (2008). Pittosporumxanthins, Cycloaddition products of Carotenoids with α -Tocopherol from seeds of Pittosporum tobira. Journal of natural products, 71(4), 622-627.
- Matranga, V. (2006). Echinodermata. S. S. B. Medi: 275.
- Mayo, P., & Mackie, A. M. (1976). Studies of avoidance reactions in several species of predatory British seastars (Echinodermata: Asterozoa). Marine Biology, 38(1), 41-49.
- Meyer, A. (2004). Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés.
- Micael, J., Alves, M. J., Costa, A. C., & Jones, M. B. (2009). Exploitation and conservation of echinoderms. Oceanogr Mar Biol Annu Rev, 47, 191-208.
- Miller, S. A., Harley, John P. (2001). Zoology. M.-H. Education. Massachusetts, Boston 540.
- Mutschke, E. and C. Mah (2009). "Asterozoa–Starfish." Marine Benthic Fauna of Chilean Patagonia. Nature in Focus, Santiago, Chile.
- Nafti, Y. (2008). Contribution à l'étude de la cinétique de libération d'un principe actif: oxacilline sodique encapsulé en vue de déterminer les conditions de conservation. Biologie, ZIANE Achour-DJELFA-. **Ingénieur d'état en biologie**
- Ojeil, A., El Darra, N., El Hajj, Y., Mouncef, P. B., Rizk, T. J., & Maroun, R. G. (2010). Identification et caractérisation de composés phénoliques extraits du raisin chateau KSARA. Lebanese science journal, 11(2), 117-131.
- Oleszek, W. and A. Marston (2013). Saponins in food, feedstuffs and medicinal plants. Proceedings of the phytochemical society of europe S. S. B. Media. **45**: 292.
- Patel, K. (2010). Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud. Chimie Ecole Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227. DOCTEUR DU MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE: 229.
- Pechenik, J. (2009). Biology of the invertebrates. M.-H. H. Education: 624.
- Pereira, D. M., Andrade, P. B., Pires, R. A., & Reis, R. L. (2014). Chemical ecology of echinoderms: impact of environment and diet in metabolomic profile. Echinoderms: ecology, habitats and reproductive biology, 1-20.
- Pichon, E. (2016). Recherche de molécules naturelles bioactives issues de la biodiversité marine de la zone sud-ouest de l'océan Indien, Université de la Réunion **Doctorat** 244.

Prabhu, K. and S. Bragadeeswaran (2013). "Antibacterial activity of starfish *Stellaster equestris* from Southeast Coast of India." J Coast Life Med **1**(3): 210-216.

Saha, S., Subrahmanyam, E. V. S., Kodangala, C., & Shastry, S. C. (2011). Isolation and characterization of triterpenoids and fatty acid ester of triterpenoid from leaves of *Bauhinia variegata*. *Der Pharma Chemica*, 3(4), 28-37.

Slideshare.net. Exam 5 models. [En ligne] Disponible sur : <<https://www.slideshare.net/jaymillan21/exam-5-models>> (15/06/2017)

Smith, A. G. and L. J. Goad (1975). "Sterol biosynthesis in the echinoderm *Asterias rubens*." Biochemical Journal **146**(1): 25-33.

Sottorff, I., Aballay, A., Hernández, V., Roa, L., Muñoz, L. X., Silva, M., ... & Astuya, A. (2013). Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 48(1).

Stonik, V. A., Kalinin, V. I., & Avilov, S. A. (1999). Toxins from sea cucumbers (holothuroids): chemical structures, properties, taxonomic distribution, biosynthesis and evolution. *Journal of natural toxins*, 8(2), 235-248.

Subramanyam, G. B., & Parrish, D. B. (1976). Colorimetric reagents for determining vitamin A in feeds and foods. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 59(5), 1125-1130.

Suguna, A., Bragadeeswaran, S., Natarajan, E., & Mohanraj, M. (2014). Studies on antioxidant properties of starfish *Luidia maculata* (Muller & Troschel, 1842) off Parangipettai, Southeast coast of India. *J Coast Life Med*, 2(6), 466-470.

Suguna, A., Bragadeeswaran, S., Prabhu, K., Priyatharsini, S., Mohanraj, M., & Sivaramakrishnan, S. (2013). Cytolytic and antinociceptive activities of starfish *Protoreaster linckii* (Blainvilli, 1893). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(41), 2734-2742.

Twenhofel, W. H. and R. R. Shrock (1935). *Invertebrate paleontology*. M.-H. B. Company. USA Californie 511.

Van Cleave, H. J. (1931). *Invertebrate Zoology*. I. Mcgraw-Hill Book Company. New York And London: 282.

Van Dyck, S., Caulier, G., Todesco, M., Gerbaux, P., Fournier, I., Wisztorski, M., & Flammang, P. (2011). The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1347-1356.

Vevers, H. and N. Millott (1957). "CAROTENOID PIGMENTS IN THE INTEGUMENT OF THE STARFISH *MARTHASTERIAS GLACIALIS* (L)." Proceedings of the Zoological Society of London **129**: 75-80.

Woods, H. (1909). *Palaeontology Invertebrate* C. U. Press: 388.

Yasumoto, T., Tanaka, M., & Hashimoto, Y. (1966). Distribution of saponin in echinoderms. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 32, 673-6.

YEE KWANG, S. I. M., SHAU-HWAI, A. T., & YASIN, Z. (2009). The diversity and abundance of the sea stars (Echinodermata: asteroidea) from coral reefs of the Central South China sea.

Zhang, W., Wang, J., Jin, W., & Zhang, Q. (2013). The antioxidant activities and neuroprotective effect of polysaccharides from the starfish *Asterias rollestoni*. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 9-15.

1. Verrerie utilisée au laboratoire

Les expériences conduites au laboratoire ont nécessité l'utilisation de la verrerie suivante :

Tableau 1 : Verrerie utilisée durant l'étude.

Matériel	Contenance (ml)
Béchers	25
	50
	100
	500
Eprouvettes	250
Erlenmeyers	50
Pipettes	1
	2
	5
Matraz	1000
Ampoule à decanter	250 ml
Entonnoir	-

2. Produits chimiques utilisés au laboratoire

Les produits chimiques utilisés lors des expériences sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Récapitulatif des caractéristiques des produits chimiques utilisés.

Formule	Denomination	Fabriquant
CH₂CL₂	Dichlorométhane	Sigma-Aldrich
CHCL₃	Chloroforme	Sigma-Aldrich
DPPH	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl	Sigma-Aldrich
H₂O	Eau distillée	Sigma-Aldrich
H₂SO₄	Acide sulfurique	Sigma-Aldrich
KCL	Chlorure de potassium	Sigma-Aldrich
KH₂PO₄	Phosphate de monopotassium	Sigma-Aldrich
MeOH	Méthanol	Sigma-Aldrich
NA₂CO₃	Carbonate de sodium	Sigma-Aldrich
NA₂HPO₄	Hydrogénophosphate de sodium	Sigma-Aldrich
NaCL	Chlorure de sodium	Sigma-Aldrich
NaOH	Hydroxyde de sodium	Sigma-Aldrich

3. Appareils utilisés au laboratoire

Les appareils décrits dans le tableau ci-dessous ont été utilisés lors de l'étude :

Tableau 3 : Appareils utilisés pour les expérimentations au laboratoire.

Appareils	Fabriquants
Centrifugeuse	EZ swing 3k®
Rotavapor	STUART®
Lyophilisateur	CHRIST®
Balance de précision	OHAUS®
Plaque chauffante	STUART®
Agitateur	2MAG®
Etuve	Venticell®
Spectrophotomètre UV	optima sp-3000 nano®
Hotte	CRURA®
Broyeur à billes	FRITSCH®
pH mètre	OHAUS®
Pompe à vide	LABOPORT, KNF LAB®
Vortex	NAHITA®



4. Composition des milieux de culture

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de nos substances actives a nécessité l'utilisation de milieux de cultures préparés comme décrit dans le tableau ci-dessous :

Tableau 3 : Mode de préparation des milieux de culture pour l'évaluation de l'activité antibactérienne.

Milieux de culture solides			Milieux de culture liquides	
Gélose nutritive	Milieu Chapman	Milieu Mac Conkey	Bouillon nutritif	Eau physiologique
<ul style="list-style-type: none"> • Peptone 10g. • Extrait de viande 3g. • Extrait de levure 3g. • Chlorure de sodium 5g. • Agar-Agar 18g. • Eau distillée 1L. 	<ul style="list-style-type: none"> • Peptone 10g. • Extrait de viande de boeuf 1g. • Chlorure de sodium 7g. • Mannitol 10g. • Rouge de phénol 0,025g. • Agar-Agar 15g. • pH = 7,4. 	<ul style="list-style-type: none"> • Peptone pancréatique de gélatine 10g. • Phosphate dipotassique 2g. • Lactose 10g. • Eosine jaune 0,4g. • Bleu de méthylène 0,065g • Agar-Agar 15g. • pH : 6,8. 	<ul style="list-style-type: none"> • Peptone 10g. • Extrait de viande 3g. • Extrait de levure 3g. • Chlorure de sodium 5g. • Eau distillée 1L. 	<ul style="list-style-type: none"> • Chlorure de sodium 9g. • Eau distillée 1L. • pH= 7.

Tableau 4 : Tableau comparatif des bactéries Gram + et Gram - S. aureus et E. coli.

	Bactéries à Gram positif  (S. aureus)	Bactéries à Gram négatif  (E. coli)	Références
Aspect en microscopie électronique	Une couche épaisse et amorphe.	Deux couches séparés par un espace clair	(Meyer <i>et al.</i> , 2014)
Présence d'une membrane externe	Non	Oui	
Présence d'un espace périplasmique	Non	Oui	
Peptidoglycane	Epais (10 à 80nm) représente 40% du poids sec, détermine la morphologie bactérienne.	Mince (2 à 6nm), représente moins de 10% du poids sec, détermine la morphologie bactérienne.	
Acides téchoïques	Présents	Absents	
Présence de protéines	Possible : liaisons covalentes avec le peptidoglycane, rôle éventuel dans le pouvoir pathogène. Rôle éventuel dans l'antigénicité spécifique.	Fréquente	
Présence de polysaccharides	Possible : antigènes spécifiques de groupe pour certaines espèces	Possible	
Lipopolysaccharides	Absents	Présents	

5. Données biométriques

Les tableaux suivants résument les mesures qu'ont subi les populations d'étoiles de mer étudiées.

Tableau 5 : Poids corporel et valeur des indices gonosomatiques et du rapport R/r de la population d'*Ophidiaster ophidianus* étudiée.

L'individu	Poids (g)	Taille du disque r (cm)	Moyenne taille des bras R (cm)	Poids des gonades (g)	Indice gonosomatique IGS	Rapport R/r
1 E1	67,64	2	7,5	0,59	0,008722649	3,75
2 E1	74,09	2,5	7,3	4,38	0,05911729	2,92
3 E1	78,08	3	1	0,36	0,004610656	0,33333333
4 E1	58,32	2,7	8	3,88	0,066529492	2,96296296
5 E1	64,02	1,8	9	1,48	0,023117776	5
6 E1	57,5	2,6	8	2,47	0,042956522	3,07692308
8 E1	32,68	2,1	6	1,63	0,049877601	2,85714286
9 E1	52,41	1,9	7	0,53	0,010112574	3,68421053
10 E1	38,04	1	7	0,06	0,001577287	7

Annexe 4

Tableau 6 : Poids corporel et valeur des indices gonosomatiques et du rapport R/r de la population d'*Echinaster sepositus* étudiée.

L'individu	Poids (kg)	r (cm)	R (cm)	Poids des gonades (g)	IGS	R/r
1E2	45,4	2,5	6,92	1,05	0,023127753	2,768
2E2	52,51	2,3	7,325	0,17	0,003237479	3,18478261
3E2	32,31	1,8	5,88	0,87	0,026926648	3,26666667
4E2	35,92	1,5	5,5	1,45	0,040367483	3,66666667
5E2	34,68	2	6,74			3,37
6E2	46,8	2,5	8,2	0,63	0,013461538	3,28
7E2	59,12	2,1	6,44	2,92	0,049391069	3,06666667
8E2	40,08	2,2	6,92	2,53	0,063123752	3,14545455

Tableau 7 : Poids des organes de la population d'*Ophidiaster ophidianus*.

L'individu	Poids TEG Abo (g)	Poids TEG Orl (g)	Poids des cæca pyloriques (g)	Poids des gonades (g)	Poids de l'estomac (g)
1E1	11,85	20,03	7,36	0,59	0,39
2E1	14,58	25,71	10,43	4,38	0,44
3E1	16,27	30,32	12,5	0,36	0,15
4E1	9,1	20,23	5,51	3,88	0,19
5E1	14,09	20,93	8,17	1,48	0,41
6E1	9,02	23,36	8,65	2,47	0,42
7E1	7,31	15,24	4,65	0,13	0,08
8E1	6,15	16,41	5,02	1,63	0,17
9E1	11,36	23,13	7,84	0,53	0,3
10E1	7,9	17,45	3,44	0,06	0,07

Tableau 8 : Poids des organes de la population d'*Echinaster sepositus*.

L'individu	Poids TEG Abo (g)	Poids TEG Orl (g)	Poids des ceaca pyloriques (g)	Poids des gonades (g)	Poids de l'estomac (g)
1E2	7,74	17,66	4,5	1,05	0,16
2E2	10,77	19,77	4,02	0,17	0,41
3E2	6,44	12,49	0,71	0,87	0,35
4E2	6,69	13,96	4,95	1,45	/
5E2	6,99	18,32	3,3	2,33	0,01
6E2	8,08	21,04	2,22	0,63	0,05
7E2	13,58	22,14	5,75	2,92	/
8E2	7,13	20,94	Morte/noir	2,53	/

Glossaire

Antifongique : Médicament utilisé dans le traitement des mycoses (infections par des champignons microscopiques).

Antinéoplastique : Anti-néoplasique (ou anti-cancéreux) est le terme médical désignant un médicament ou un traitement destiné à tuer les cellules malignes

Antiviral : Médicament utilisé dans le traitement des maladies virales.

Asteroidea : Nom de classe donné aux étoiles de mer, ou astéries.

Cæca pyloriques : Ce sont des tubes appariés dans chaque bras d'une étoile de mer qui ont des diverticules glandulaires latéraux constituant le foie et qui communiquent par un conduit commun avec la chambre pylorique.

Caroténoïdes : Tétraterpène apparenté aux carotènes et abondamment répandu dans les règnes animal et végétal (xanthophylle, lycopène...).

Cérébrosides : variété de lipides (corps gras) présents dans le tissu cérébral nerveux. Ils font partie des sphingolipides.

Coelotrés : Le terme de coelentéré est parfois utilisé pour désigner le groupe des cnidaires, mais il inclut en réalité l'embranchement voisin des cténophores, ce qui en fait un synonyme vieilli de Radiata.

Crinoïdes : Nom de classe de quelques espèces actuelles d'échinodermes fixés au fond des mers, qui ont connu un grand développement au début de l'ère secondaire, et laissé de puissants sédiments (calcaires à entroques).

Cytotoxique : Se dit d'une substance capable de détruire les cellules de tumeur maligne.

Dendritique : Qui se rapporte à la dendrite ou qui en a la forme ramifiée.

deutérostomiens : Animal dont la bouche n'est pas issue du blastopore embryonnaire, mais se forme secondairement (échinodermes, stomocordés, procordés et vertébrés).

Echinoidea : Les échinidés ou échinides sont des organismes marins portant des piquants sur la totalité du corps. Ce sont des invertébrés marins de l'embranchement des Echinodermata, du grec ekhinos, « épine » et derma « derme ». Ils sont de proches parents des concombres de mer et des étoiles de mer.

Eleuthérozoaires : Membre d'un taxon d'échinodermes à vie libre et dont la bouche est dirigée vers le bas, regroupant les astérozoaires (étoiles de mer et ophiures) et les échinozoaires ou oursins.

Épithélioneuriens : Animal deutérostomien à système nerveux sous-épithélial. (Le groupe des épithélioneuriens comprend surtout les échinodermes.)

Erythrocytes : Cellule sanguine transportant l'oxygène des poumons vers les tissus.

Glossaire

Gamétogénèse : Mécanisme de formation des gamètes.

Gangliosides : Les gangliosides sont des glycolipides acides dont les chaînes oligosaccharidiques sont terminées par des résidus d'acides sialiques (N-acétylneuraminique), dérivé d'ose pourvu d'une fonction acide carboxylique (voir section 3.6). Ce sont des constituants des membranes des cellules du système nerveux.

Gonochorisme : Caractère d'une espèce animale dans laquelle chaque individu n'a qu'un seul sexe.

Gonopore : Parfois appelé gonadopore, est le nom de l'orifice génital chez certains invertébrés

Hémolyse : Destruction des globules rouges du sang.

Hermaphrodisme : désigne un phénomène biologique dans lequel l'individu est morphologiquement mâle et femelle, soit simultanément soit alternativement.

Holothurie : Échinoderme marin, allongé, au tégument relativement mou, dont la symétrie bilatérale masque souvent la pentamérie. (Les holothuries forment une classe.)

îlot : Un îlot ou un ilot est une île de petite superficie. ... Il peut se trouver en pleine mer comme à proximité d'une île plus grande.

Métabolites secondaires : Les métabolites secondaires sont des molécules qui ne sont pas directement impliquées dans les processus de croissance des organismes vivants, contrairement aux métabolites primaires mais (e manifeste dans des compartiments particuliers ou à des moments précis de la vie d'un organisme comme les toxines des végétaux et des invertébrés marins.

métazoaires : Animal dont le corps est constitué de plusieurs cellules organisées en tissus et organes.

Naphtoquinones : élément d'une famille de quinones à laquelle appartient la vitamine K.

Ophiures : Classe d'échinodermes marins voisins des étoiles de mer, mais qui s'en distinguent par 5 très longs bras souples, indépendants du disque central.

Pelmatozoaires : Nom d'un sous-embranchement d'échinodermes fixés, très divers à l'ère primaire, mais dont un seul ordre, les crinoïdes, subsiste actuellement.

Photopériodisme : Le photopériodisme est le rapport entre la durée du jour et de la nuit. Ce paramètre est un facteur écologique qui joue un rôle prépondérant sur les végétaux¹ et les animaux.

Porphyrine : Pigment formé de quatre molécules d'une substance appelée pyrrole, qui sont attachées entre elles.

Glossaire

Zone abyssale : Fond océanique de plus de 2 000 m de profondeur.
Grégaire : Se dit d'une espèce animale qui vit en groupe ou en communauté, mais sans structure sociale.

Zone intertidale : Partie du littoral située entre les limites extrêmes des plus hautes et des plus basses marées.

Résumé

Les extraits d'étoiles de mer ont attiré l'attention de plusieurs scientifiques notamment pour leur large spectre d'effets biologiques. Cette étude a été menée pour mettre en évidence l'activité antioxydante, hémolytique et antibactérienne des extraits d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus* mais aussi l'hétérogénéité inter organes de la distribution des substances actives responsables de ces activités. Le tégument (oral et aboral), les cæca pyloriques et les gonades ont été sélectionnés pour l'analyse.

Les échantillons d'étoiles de mer ont été prélevés dans un îlot à Rais Hamidou puis disséqués. Enfin, les extraits méthanoliques bruts des organes ont été préparés séparément par des solvants de différentes polarité, Les extraits ont ensuite servi à l'isolement des saponines et des caroténoïdes.

A partir de la réactivité avec le radical libre 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl, nous avons noté une activité antioxydante importante des caroténoïdes isolés qui dépend de l'origine de l'extrait et de l'espèce étudiée.

L'activité hémolytique des saponines purifiées a été évaluée à l'aide de globules rouges chevalines, Les extraits ont montré des résultats probants, leurs performances diffèrent selon les organes testés. Les saponines des gonades et du tégument sont plus actives sur les globules rouges et les mécanismes qui pourraient expliquer cette différence sont discutés.

Les bactéries Gram+ et Gram - respectivement *staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ont été sélectionnés pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des saponines et des caroténoïdes purifiées en utilisant la méthode de diffusion en milieu solide. Un effet antibactérien modéré contre *Staphylococcus aureus* a été observé chez les saponines des gonades d'*Echinaster sepositus* et *Ophidiaster ophidianus*, *Escherichia coli* quant à elle a montré une résistance vis à vis de la quasi totalité des extraits.

Mots clés

Echinaster sepositus, *Ophidiaster ophidianus*, activité hémolytique, activité antioxydante, activité antibactérienne, substances actives.

Abstract

Starfish extracts have attracted the attention of several scientists especially for their broad spectrum of biological effects. This study was carried out to demonstrate the antioxidant, haemolytic and antibacterial activity of the extracts of *Echinaster sepositus* and *Ophidiaster ophidianus* but also the inter-organ heterogeneity distribution of the active substances responsible of these activities. The tegument (oral and aboral), pyloric caeca and gonads were selected for analysis.

The starfish samples come from an island in Raïs Hamidou and have been dissected. Finally, the crude methanolic extracts of the organs were prepared separately by solvents of different polarity. Extracts were then used for the isolation of saponins and carotenoids.

From the reactivity with the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, we noted an important antioxidant activity of the isolated carotenoids which depends on the origin of the extract and tested starfish.

The haemolytic activity of the purified saponins were evaluated using horse's red blood cells. The extracts showed convincing results, the haemolysis performance was different according to the organs tested. The saponins of the gonads and the integument are more active on the red blood cells. The mechanisms that could explain this difference were discussed.

The Gram+ and Gram - bacteria respectively *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was selected for the evaluation of the antibacterial activity of the purified saponins and carotenoids using the agar well diffusion method. A moderate effect against *Staphylococcus aureus* was observed in the saponins of the gonads of *Echinaster sepositus* and *Ophidiaster ophidianus*. *Escherichia coli* showed resistance to almost all the extracts.

Keywords

Echinaster sepositus, *Ophidiaster ophidianus*, Haemolytic activity , antioxydant activity, antibacterial activity, active substances.

ملخص

لقد جذبت مستخلصات نجم البحر انتباه العديد من العلماء خاصة بالنسبة لطيفها الهائل من الآثار البيولوجية، وقد أجريت هذه الدراسة لإظهار النشاط المضاد للأكسدة و انحلال كريات الدم و النشاط المضاد للبكتريا لمستخلصات *إشيناستر سيوسيتوس* و *أوفيدياستر أوفيديانوس*، و لكن أيضا عدم تجانس توزيع هذه المواد النشطة بيولوجيا بين اعضاء نجم البحر تم اختيار الاغشية السفلى و العليا، الأمعاء و الغدد التناسلية لإجراء التحاليل. التقطت العينات في جزيرة برايس حميدو و بعد عملية التشريح اعدت مستخلصاتها عن طريق مذيبات ذات قطبية مختلفة و استخدم الناتج لعزل الصابونيين و الكاروتينات.

من التفاعل مع الراديكالية الحرة 2،2-ثنائي-1-picrylhydrazyl لاحظنا نشاط مضاد للأكسدة من طرف الكاروتينات المعزولة و قد توقف هذا النشاط على العضو و النجم المختبر.

تم تقييم النشاط الانحلالي للصابونيين المنقاة باستخدام خلايا الدم الحمراء للحصان، اظهرت المستخلصات نتائج لا بأس بها و قد كان أداء انحلال الدم مختلفا وفقا للأعضاء المختبرة. كانت صابونيين الغدد التناسلية و الاغشية هي الاكثر نشاطا على خلايا الدم الحمراء. و قد نوقشت الآليات التي يمكن أن تفسر هذا الاختلاف.

تم انتقاء البكتريا غرام + و غرام - على التوالي *المكورات العنقودية الذهبية* و *الإشريكية القولونية* لتقييم النشاط المضاد للبكتريا باستخدام طريقة الانتشار بالأقراص. لوحظ تأثير معتدل ضد *المكورات العنقودية الذهبية* بالنسبة لصابونيين الغدد التناسلية لكل من *إشيناستر سيوسيتوس* و *أوفيدياستر أوفيديانوس* اما *الإشريكية القولونية* فقد أظهرت مقاومة لجميع المستخلصات تقريبا

الكلمات المفتاحية

إشيناستر سيوسيتوس، *أوفيدياستر أوفيديانوس*، النشاط الانحلالي، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتريا، المواد النشطة بيولوجيا.