

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



Réf :/UAMOB/F.SNV.ST/DEP.BIO/2019

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME MASTER

Domaine : SNV Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie Appliquée

Présenté par :

Mohand Wassila & Haddadi Sarah

Thème

**Etude de l'activité antimicrobienne et antioxydante du
Dromia personata et *Callistoctopus macropus*.**

Soutenu le : 04 / 07/ 2019

Devant le jury composé de :

| | | | |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------|
| <i>M.REMINI Hocine</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Président</i> |
| <i>M. KADRI Nabil</i> | <i>MCA</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Promoteur</i> |
| <i>Mlle. ADOUANE Meriem</i> | <i>Doctorante</i> | <i>Univ. de Béjaia</i> | <i>Co-Promotrice</i> |
| <i>Mme. MEDBOUA Chafiaa</i> | <i>MCB</i> | <i>Univ. de Bouira</i> | <i>Examineur</i> |

Année Universitaire : 2018/2019

Remerciements

Avant tout, on tient à exprimer nos remerciements les plus sincères tout d'abord au « Bon Dieu » de nous avoir donné la patience et la santé pour réaliser ce travail.

On tiens à remercier très sincèrement Monsieur KADRI Nabil notre promoteur d'avoir accepté de nous encadrés.

Nous remercions profondément notre Co-promotrice Melle ADOUANE Meriem pour ses remarques, sa suivie attentive pour la réalisation de ce modeste travail

Nous remercions Monsieur REMINI Hocine d'avoir accepté de présider le jury chargé d'évaluer ce travail.

Nous tenons également à exprimer nos remerciement à madame MEDBOUA Chafiaa d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Un grand merci à tous nos enseignants de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et particulièrement nos enseignants de spécialité Biochimie appliquée.

Enfin, nos remerciements vont à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicaces

C'est avec un très grand honneur que
Je dédie ce travail à mes parents qui Ont
sacrifiés pour que je grandisse avec un
savoir faire

Et qui ont fait de moi ce que je suis
aujourd'hui

Que dieux les protège et les accorde une
longue vie Pleine de santé et de bonheur.

Je dédie aussi cette réalisation à :

Mes sœurs et Mes frères

Toute ma famille

Mon binôme Sarah

Mes amis et camarades de promotion

A tous ceux que j'aime

A tout qui sont dans mon cœur et de mes yeux

Wassila

Dédicaces

C'est avec un très grand honneur que
Je dédie ce travail à mes parents qui
Ont sacrifiés pour que je grandisse avec un savoir
faire
Et qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui
Que dieux les protège et les accorde une longue vie
Pleine de santé et de bonheur.

Je dédie aussi cette réalisation à :

Ma chère grand mère

Ma sœur et Mes frères

Toute ma famille

Mon binôme Wassila

Mes amis et mes camarades de promotion

Tous ceux que j'aime

Sarah

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure01 : Figure presente <i>Dromia personata</i> | 04 |
| Figure 02 : Photo d'un Crabe..... | 05 |
| Figure03 : Photo d'une Ecrevisse..... | 05 |
| Figure 04 : Nombre estimé des espèces existantes dans chaque classe du phylum des Mollusques..... | 08 |
| Figure05 :Figure <i>Callistoctopus macropus</i> | 08 |
| Figure06 :Figure du <i>Dromia personata</i> | 13 |
| Figure07 :Figure du <i>Callistoctopus macropus</i> | 13 |
| Figure 08 : Protocole d'extraction de l'extrait brut des deux espèces d'invertébrés marins par macération..... | 14 |
| Figure 09 : Protocole d'extraction par macération..... | 14 |
| Figure 10 : Protocole de dosage des polyphénols | 15 |
| Figure 11 : Protocole de dosage des flavonoïdes | 16 |
| Figure 12 : Etude de l'activité antimicrobienne des deux extraits d'invertébrés marins..... | 17 |
| Figure 13 : étude de l'activité antibactérienne | 18 |
| Figure 14 : Protocole de mesure de l'activité antioxydante par DPPH..... | 18 |
| Figure 15 : Mesure des absorbances pour les phénols et l'activité anti-radicalaire..... | 19 |
| Figure 16 : Taux de rendement des extraits rapportés des deux espèces d'invertébrés marins..... | 20 |
| Figure 17 : Teneur en polyphénols totaux de <i>C. macropus</i> et <i>D. personata</i> | 21 |
| Figure 18 : Teneur en flavonoïdes de <i>C. macropus</i> et <i>D. personata</i> | 22 |
| Figure 19 : Activité antibactérienne des deux extraits bruts marins vis-à-vis des bactéries à gram négatif et les bactéries à gram positif | 23 |
| Figure 20 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH..... | 25 |
| Figure 21 : Pouvoir réducteur des extrais méthanoliques des deux invertébrés marins..... | 26 |
| Figure 22 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique mg/ml..... | 26 |

Liste des tableaux

| | |
|---|--------|
| Tableau 1 : Classification du genre de <i>Dromia personata</i> | 04 |
| Tableau 2 : Classification du genre <i>Callistoctopus macropus</i> | 09 |
| Tableau 3 : Caractères morphologiques et biochimiques des espèces bactériennes..... | Annexe |
| Tableau 4 : Pouvoir pathogène des souches bactériennes..... | Annexe |
| Tableau 5 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de <i>E.coli</i> | Annexe |
| Tableau 6 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de <i>Klibsilla sp.</i> | Annexe |
| Tableau 7 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de <i>Pseudomonas sp.</i> | Annexe |
| Tableau 8 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de <i>proteus sp.</i> | Annexe |
| Tableau 9 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de <i>Staphylococcus aureus</i> | Annexe |
| Tableau 10 : rendement des extraits bruts des deux invertébrés marins..... | Annexe |
| Tableau 11 : zones d'inhibition des souches bactériennes vis-à-vis des extraits méthanoliques des deux espèces d'invertébrés marins..... | Annexe |
| Tableau 12 : dosage des phénols chez les deux espèces d'invertébrés marins..... | Annexe |
| Tableau 11 : Pouvoir réducteur des extrais méthanoliques des deux invertébrés marins..... | Annexe |

Liste des abbreviations

| | |
|-------------------|--------------------------------|
| ADN | Acide Désoxyribonucléique. |
| AlCl ₃ | Trichlorure d'aluminium. |
| C. macropus | Callistoctopus macropus. |
| DCM | Dichlorométhane. |
| D.personata | Dromia personata. |
| DPPH | 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl. |
| E.coli | Escherichia coli. |
| ERN | Espèces Réactives d'azote. |
| ERO | Espèces Réactives Oxygénées. |
| ERS | Espèces Réactives de Soufre. |
| FDA | Food and Drug Administration. |
| GPx | Glutathion Peroxydase. |
| KLH | Keyhole Limpet Hemocyanin. |
| MeOH | Méthanol. |
| S. aureus | Staphylococcus aureus. |
| SOD | Superoxyde Dismutase. |

Table des matières

| | |
|------------------------|--|
| Remerciements | |
| Dédicace | |
| Liste des figures | |
| Liste des tableaux | |
| Liste des abréviations | |

Introduction

CHAPITRE I SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

| | |
|---|-----------|
| I.I Généralité | 01 |
| I.I.1.Les crustacés | 01 |
| I.I.1.1 Définition..... | 01 |
| I.I.1.2 Composition chimique..... | 01 |
| I.I.1.2.1 Métabolisme primaire..... | 01 |
| I.I.1.2.2 Métabolisme spécialisé | 02 |
| I.I.1.3 Description (<i>Dromia personata</i>)..... | 03 |
| I.I.1.4 Utilisation médicale | 04 |
| I.I.2.Les mollusques | 07 |
| I.I.2.1 Définition..... | 07 |
| I.I.2.2 Composition chimique..... | 07 |
| I.I.2.3 Description (<i>Callistoctopus macropus</i>)..... | 08 |
| I.I.2.4 Utilisation médicale..... | 09 |
| I.I.3.Etude de l'activité antibactérienne | 10 |
| I.I.3.1 Evolution de la résistance des bactéries..... | 10 |

| | |
|--|-----------|
| I.I.3.2 Evaluation de l'activité antibactérienne sur les invertébrés marins..... | 10 |
| I.I.4. Étude de l'activité antioxydante..... | 11 |
| I.I.4.1 Antioxydants | 11 |
| I.I.4.2 Composés phénoliques..... | 11 |
| I.I.4.2.1 Polyphénols..... | 11 |
| I.I.4.2.2 Flavonoïdes..... | 11 |
| I.I.4.3 Le stress oxydatif et les radicaux libres..... | 12 |
| I.I.4.3.1 Antioxydants endogènes..... | 12 |
| I.I.4.3.2 Antioxydants exogènes..... | 12 |

CHAPITRE II MATERIELS ET METHODES

| | |
|---|----|
| II.I. Matériel animal..... | 13 |
| II.I.1 Récolte et congélation..... | 13 |
| II.I.2 Extraction des composés bioactifs..... | 13 |
| II.I.2.1Extraction par macération..... | 13 |
| II.I.2.2 Détermination du rendement..... | 15 |
| II.I.3.Dosage des composés phénoliques..... | 15 |
| II.I.3.1.Dosage des polyphénols..... | 15 |
| II.I.3.2.Dosage des flavonoïdes..... | 16 |
| II.I.4 Etude de l'activité antimicrobienne des invertébrés marins..... | 16 |
| II.I.4.1 Souches cibles..... | 16 |
| II.I.4.2 Repiquage sur une gélose nutritive..... | 17 |
| II.I.4.3.Détermination de la zone d'inhibition maximal sur gélose (Mueller-Hinton)..... | 17 |
| II.I.5.Etude de l'activité antioxydante au DPPH..... | 18 |

CHAPITRE III RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|-------------------------------------|----|
| III.1.Taux d'extraction | 20 |
| III.2.Dosage des antioxydants | 21 |

| | |
|---|----|
| III.2.1.Polyphénols totaux | 21 |
| III.2.2.Flavonoïdes | 22 |
| III.3.Activité antibactérienne..... | 23 |
| III.4.Evaluation de l'activité antioxydante | 24 |
| III.5.Activité antiradicalaire DPPH | 25 |

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RESUME

Introduction

Introduction

Dès l'antiquité, la mer a fasciné l'humanité. Les aventuriers à la recherche de nouveaux territoires ont été, très tôt, à la fois attirés et terrifiés par cette immensité liquide et par les profondeurs océaniques aux insondables mystères. Pour mieux assurer sa subsistance, l'homme a appris de bonne heure à exploiter le domaine marin le plus accessible : pêche de poissons, mollusques, crustacés, etc (**Braekman et al.,1983**).

La surface de notre planète est recouverte à 71% par des océans, lesquels sont riches d'une biodiversité estimée entre 3 et 500*10 espèces marines (**Haug et al., 2002**). A elle seule, la macrofaune marine comprend entre 0.5 et 10.10⁶ espèces (**De Vries et Hall, 1994**).

Le milieu marin comporte également une très grande diversité de microorganismes(champignons, bactéries, microalgues et virus) dont la concentration moyenne est estimée a minima à 10³ -10⁶ par millilitre d'eau, pour les bactéries (**Benkendorff et al., 2001**). Avec plus de 100 000 espèces, le phylum des mollusques est le 2ème en importance après celui des arthropodes. Plus 50 000 espèces de mollusques marins ont été décrites (**Kornprobst, 2005**).

La biodiversité marine, fournit des molécules très originales sans équivalent terrestre (plantes ou micro-organismes terrestres), a suscité un vif engouement chez les chercheurs. Leurs travaux sur les métabolites marins sont en général menés dans des perspectives de valorisation. Deux secteurs sont particulièrement concernés : celui de la santé et celui de l'écologie (**Mayer et al., 2010**).

L'utilisation abusive et intensive des antibiotiques a considérablement contribué à l'augmentation de la résistance de nombreuses souches bactériennes (**Orhan et al., 2010**), soit par des mutations spontanées ou par transfert de plasmides ou transposons provenant d'autres microorganismes (**Donskey et al., 2003**). Ceci pose à l'heure actuelle de très sérieux problèmes. Ainsi les scientifiques, se sont orientés vers la recherche de nouvelles sources de composés bioactifs d'origine naturelle (**Keita et al., 2004**).Depuis quelques années, le monde des sciences biologiques et médicales est envahi par un nouveau concept, celui du stress oxydant, qui se définit par un déséquilibre de la balance entre la formation des radicaux libres à

Introduction

caractère pro oxydants et le système de défense antioxydants. Ces radicaux libres sont une conséquence inévitable dans les organismes aérobies, produits pendant la respiration dans des circonstances quotidiennes normales, en permanence et en faible quantité comme médiateurs tissulaires (**Mahadik et al., 2001**).

Les invertébrés marins ont été une source importante de métabolites bioactifs ayant un large spectre d'activités intéressantes, prometteuse pour l'avenir en biochimie et pharmacologie (**Garcia-Dvis et al., 2018**).

L'objectif de ce travail est l'évaluation de l'activité antimicrobienne et antioxydante des extraits de deux invertébrés marins : *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata* collectés de la côte de Bejaia.

Pour cela, notre étude englobe deux parties, dont :

- ✓ La première est une synthèse bibliographique de quelques rappels sur la résistance aux antibiotiques, l'activité antibactérienne, composés phénoliques, radicaux libres, stress oxydatif, activité anti-radicalaire.
- ✓ La deuxième partie est consacrée à l'étude expérimentale, qui porte sur l'extraction par macération des extraits bruts de deux espèces d'invertébrés marins, ainsi l'étude de leurs activité antibactérienne ainsi l'étude de l'activité anti-radicalaire.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Synthèse bibliographique

I. Généralité

I.1 Les crustacés

I.1.1 Définition

Comme tous les arthropodes, les crustacés sont caractérisés par un corps métamérisé où l'on observe une céphalisation et la présence de chitine sur le tégument. Les crustacés peuvent être caractérisés comme des arthropodes mandibulés, antennates. La carapace est constituée notamment de 50 % de carbonate de calcium et de 5 à 19 % de phosphate de calcium et de magnésium. Leurs appendices sont à l'origine biramés. Les crustacés représentent l'un des groupes d'invertébrés les plus diversifiés (**Land, 1996 ; Monod et Laubier, 1996**). Ils occupent la quatrième place en terme de nombre d'espèces parmi les Métazoaires, après les insectes, les mollusques et les Chélicérates (**Martin et Davis, 2001**). Les crustacés incluent des organismes de très petite taille ou de taille imposante. Présents en milieu aquatique ainsi que terrestre, ils sont présents aussi bien dans les zones polaires que tempérées et tropicales. Ils sont libres et mobiles ou bien fixés sur un support inerte ou vivant. Certains sont parasites ou commensaux d'autres animaux (**FAO, 2003**).

I.1.2 Composition chimique

I.1.2.1 Métabolisme primaire

L'ensemble des êtres vivants ont en commun un ensemble de voies métaboliques appelé métabolisme primaire aboutissant à la biosynthèse de métabolites primaires.

Ces derniers sont synthétisés à partir des apports nutritifs et vont assurer les fonctions vitales chez tous les organismes vivants, telles que la croissance et la reproduction. Parmi ces métabolites, on retrouve les polysaccharides, les acides gras, les protéines et les acides nucléiques. Si les plantes synthétisent ces molécules à partir de composés inorganiques via la photosynthèse, les micro-organismes et les animaux utilisent les composés organiques obtenus des plantes pour les transformer selon leurs besoins.

Synthèse bibliographique

Les métabolites primaires cités précédemment sont des polymères, hormis les acides gras : les polysaccharides sont formés de différents oses simples, les protéines contiennent des acides aminés et les acides nucléiques sont synthétisés à partir de nucléotides. Au cours des différentes réactions chimiques de biosynthèse, ces molécules de base subissent des transformations qui permettent l'élaboration des métabolites primaires. Ceux-ci sont à leur tour les éléments de base pour la mise en place du métabolisme spécialisé (**Dewick, 2002**).

I.1.2.2 Métabolisme spécialisé

Le métabolisme spécialisé, aussi appelé métabolisme secondaire, s'est développé au cours de l'évolution par les micro-organismes, les plantes et les animaux selon leurs besoins spécifiques. Contrairement aux métabolites primaires, les métabolites spécialisés ne sont donc pas communs à l'ensemble des êtres vivants.

Ils sont soit le résultat d'une convergence évolutive c'est-à-dire la conséquence biologique de contraintes environnementales communes soit une homologie c'est-à-dire un caractère biologique résultant de l'évolution d'un ancêtre commun. Dans le second cas, ces métabolites peuvent alors être des marqueurs taxonomiques de choix.

L'intérêt croissant pour les produits naturels marins depuis les années 1970 a mis à jour plus de 6500 molécules produites par des éponges, qui représentent ainsi le phylum le plus prolifique en termes de composés bioactifs (**Blunt et al., 2015**). La plupart des familles chimiques des composés produits par ces organismes marins sont également présentes dans le milieu terrestre : stéroïdes, alcaloïdes, polyacétylènes, terpènes, phénols, peptides, etc (**Laport et al., 2009 ; Mehbub et al., 2001**).

Néanmoins, les invertébrés ont développé des voies métaboliques originales conduisant à des composés encore jamais décrits dans le monde terrestre. Ces molécules à bio activité plus ou moins marquée participent à la protection de l'éponge grâce à leurs propriétés antivirales, antifongiques et anti-inflammatoires. Ces propriétés pharmacologiques justifient l'engouement scientifique pour leur exploitation dans le domaine médical : anticancéreux, antiviraux, antibiotiques, antifongiques, anti-inflammatoires, immunosuppresseurs et neuro-protectifs (**Jaspars et al., 2016 ; Blunt et al., 2014 ; Munro et al., 2011 ; Molinski et al., 2009**). A ce jour,

Synthèse bibliographique

deux molécules dérivées de composés synthétisés par des invertébrés ont été approuvées par la FDA comme anticancéreux. La cytarabine, analogue synthétique d'un nucléoside isolé de l'éponge *Cryptothethya crypta* permet de traiter certaines formes de leucémies aiguës. L'éribuline est un dérivé de l'halicondrine A, polyéther extrait de l'éponge *Halichondria okadai*, qui présente un pharmacophore reproduit synthétiquement permettant de traiter les cancers du sein résistants aux traitements existants sur le marché pharmaceutique.

D'un point de vue écologique, le principal rôle de ces composés serait de prévenir les infections au sein du tissu des invertébrés mais aussi d'établir une communication chimique avec son environnement direct (Paul et al., 2004 ; Puglisi et al., 2014 ; Ternon et al., 2016). En effet, en l'absence d'organes spécifiques, les invertébrés utilisent la chimie de leur métabolisme spécialisé pour se défendre contre la prédation, signaler leur présence ou lutter pour l'occupation de l'espace (Pawlik, 2011).

Si à ce jour plus de 6500 métabolites spécialisés ont été isolés et caractérisés chez les 8000 espèces de spongiaires identifiées, une immense diversité de composés reste à découvrir. Parmi les espèces étudiées, nombreuses sont celles issues d'environnements tropicaux (Caraïbes, Pacifique,...) (Blunt et al., 2014 ; Munro et al., 2011). Les espèces de Méditerranée, aussi nombreuses soient-elles, sont encore à ce jour sous-représentées au sein des études ciblant la diversité métabolique des spongiaires. Afin de développer et d'approfondir les connaissances concernant la diversité métabolique des invertébrés en Méditerranée.

1.1.3 Description (*Dromia personata*)

L'ensemble de l'animal est couvert de poils courts lui donnant un aspect feutré. La carapace est sub-globuleuse et assez convexe, ovale. Les tailles maximales pour les mâles et les femelles diffèrent peu (Zariquiey, 1946). Sur la carapace, le front présente trois saillies triangulaires dont une médiane plus forte; le bord antérolatéral porte 4 fortes dents. Il y a 14 branchies. Le premier segment du pédoncule antennaire est mobile et le pore excréteur bien visible. Les pinces sont fortes, sub-égales, à peu près sans épines. Elles sont plus petites chez la femelle que chez le mâle. Les péréiopodes 2 et 3 ont un dactyle court et en forme de griffe. Les pattes des deux

Synthèse bibliographique

dernières paires sont très courtes, aplaties, et terminées par une pseudo-pince. Elles sont dirigées vers le dos de l'animal. Le coxa du cinquième péréiopode porte un long pénis chez le mâle. Les juvéniles peuvent avoir des couleurs variées et vives : jaune, rouge... (Vadon, 1981 ; Reguieg et al. 2008). Une fois adulte, ce crabe est uniformément brun sombre ou gris, parfois pourpre; les doigts (dactyle et propode) des pinces sont roses.



Figure 01 : *Dromia personata* (Linnaeus, 1758).

Tableau01: Classification du genre *Dromia personata* (Linnaeus, 1758).

| | |
|------------|------------------|
| Règne | Animal |
| Phylum | Arthropoda |
| Sub-phylum | Crustacea |
| Classe | Malacostraca |
| Ordre | Decapoda |
| Famille | Dromiidae |
| Genre | <i>Dromia</i> |
| Espèce | <i>Personata</i> |

I.1.4 Utilisation médicale

Depuis des temps immémoriaux, les crustacés servent à l'alimentation humaine. Certes, les écrevisses étaient aussi connues et utilisées depuis l'antiquité, mais leur emploi se développa surtout au cours du moyen âge. Il en fut de même pour les crabes. L'augmentation de consommation des crustacés pendant le moyen âge et à l'époque de la renaissance est due en grande partie au fait que ces animaux, considérés

Synthèse bibliographique

comme « exsangues », pouvaient être mangés durant les jours de jeûne. Un exemple peut illustrer l'importance de la consommation des crustacés aux environs de l'année 1500. Les crustacés sont étudiés sous l'angle de la diététique, et de plus il est bien souligné que les humeurs des langoustes la chair des crabes ont un pouvoir diurétique et purgatif (**Armand et al., 1965**).

L'opinion classique sur les vertus thérapeutiques des crustacés nous est connue en premier lieu grâce à Dioscoride (I siècle) dans sa matière médicale, consacre un chapitre aux crabes, et grâce à Pline (I siècle) qui, dans histoire naturelle, aborde ce sujet à plusieurs reprise (**Armand et al., 1965**).

Selon Dioscoride, la cendre obtenue par la combustion des crabes d'eau douce sert de remède aux gens mordus par un chien enragé. Cette même cendre, enduite de miel cuit, mitige, toujours d'après Dioscoride, les fissures et les crevasses des pieds et des mains, les mules au talon, et toutes sortes d'ulcérations carcinomateuses. Crus, broyés et mélangés à du lait d'ânesse, les crabes sont préconisés comme antidote contre le venin des serpents, des scorpions et des araignées. Cuits et mangés avec leur brouet, ils sont, croit-on, fort bons aux phtisiques et à ceux qui ont été empoisonnés par le « lièvre de mer » (aplysie) (**Armand et al., 1965**).

La principale vertu médicale des crabes serait donc, selon le médecin d'Anazarbe, d'agir comme contrepoison dans les cas d'intoxication d'origine animale. Notons que la rage était autrefois tenue pour un empoisonnement (**Armand et al., 1965**).

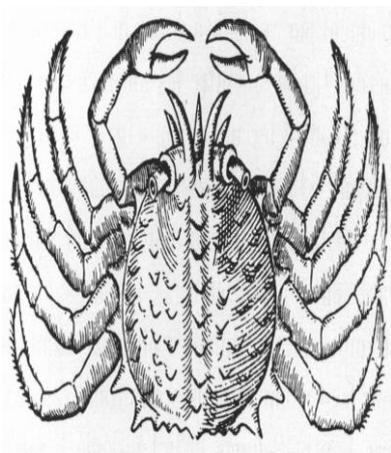


Figure 02 : Dessin d'un Crabe

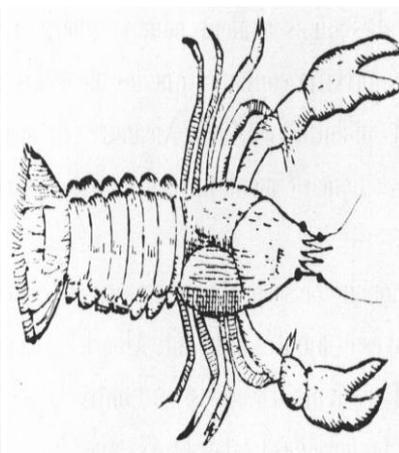


Figure03 : Dessin d'une Ecrevisse

(**Armand et al., 1965**).

Synthèse bibliographique

Les crustacés sont recommandés pour la nourriture des personnes amaigries et desséchées, convalescentes ou faibles ; par contre, ils sont défendus à ceux qui souffrent de coliques intestinales ou qui ont un estomac fragile. Selon Galien, les crustacés bouillis dans l'eau sont un aliment fortifiant pour les mal-portants, mais doivent être évités par les obèses qui veulent suivre un régime d'amaigrissement. En réfrigérant et en diluant les humeurs du corps, ils conviennent dans les cas de fièvre chronique ou intermittente (**Armand et al., 1965**).

Selon Hippocrate et Dioclès de Caryste, les parties dures, la chair et le jus des crustacés ont des propriétés diurétiques. Et par la suite, tout au long des siècles, ces animaux furent employés pour le traitement de la plupart des maladies des voies urinaires, et notamment de la lithiase rénale et vésicale (**Armand et al., 1965**).

Alexandre Benedetti écrit que le crabe marin ajouté au lait de la mère ou de la nourrice guérit les troubles de la miction chez le nourrisson. Jérôme Cardan conseille de soigner la maladie de la pierre par l'ingestion de jus d'écrevisses broyées. D'après d'autres, il convient mieux d'expurger les calculs rénaux avec de la cendre de carapaces de crabes ou de rostrés de Langoustes. Pour le même usage, c'est surtout la poudre de lapilli, dont il sera question plus loin, qui est appréciée. En outre, les médecins d'autrefois croyaient que la chair cuite et la cendre des crustacés étaient des purgatifs. Par exemple, contre les ténésmes et pour la purge, Gesner cite un remède populaire dont le composant principal est formé par des parties de crabes une autre utilisation thérapeutique des crabes contre les ulcérations carcinomateuses et en particulier contre le cancer du sein (**Armand et al., 1965**).

L'utilisation relativement fréquente des crustacés en gynécologie et dans l'art obstétrical se rattache à une très vieille tradition, dont l'expression se trouve dans le traité pseudo-hippocratique sur les maladies des femmes. On recommande les crustacés notamment après l'accouchement, pour accélérer l'évacuation des lochies. L'odeur des crabes est censée faciliter l'expulsion du fœtus mort. L'emploi des crustacés est préconisé aussi dans le traitement du cancer des organes féminins.

Le « pouvoir extractif » des crustacés ne se limite pas à attirer le fœtus mort hors du ventre de la mère, mais se manifesterait également dans l'extraction de toutes

Synthèse bibliographique

sortes de corps étrangers. Un onguent préparé à partir d'Écrevisses est appliqué localement pour retirer les pointes de flèches, les clous et les épines (**Armand et al., 1965**).

I.2. Les mollusques

I.2.1. Définition

Le terme mollusque vient du latin « mollusca » signifiant « une noix à écorce molle » en référence à leur corps mou. Cet embranchement très diversifié est représenté par plus de 100 000 espèces actuelles dont 46 000 marines, le classant donc à la seconde place après les arthropodes. L'étude des mollusques se fait par le biais de deux disciplines distinctes. La première est la malacologie, étudiant les mollusques en général, tandis que la seconde nommée conchyliologie, concerne l'étude de leur coquille (**Vicente, 2008**).

I.2.2 Composition chimique

L'embranchement des mollusques comporte huit classes : les Solénogastres et les Caudofovéates (qui constituaient auparavant une seule classe appelée Aplacophora), les Polyplacophores, les Monoplacophores, les Scaphopodes, les Céphalopodes, les Gastéropodes et les Bivalves(**Lecointre et al., 2001**).Les Bivalves représentent la deuxième plus grande classe des mollusques après celle des Gastéropodes(**Sharma et al., 2011**).Ceci explique pourquoi les études chimiques ont majoritairement porté sur la classe des Gastéropodes d'où 1288 métabolites ont été isolés contre 176 chez les Bivalves d'après Marin Lit(**Base de données des substances naturelles d'origine marine, version en ligne, 2017**).

Les espèces des mollusques Gastéropodes et Bivalves (moins de 1%) ont peu été étudiés pour leurs métabolites secondaires. Certains de ces métabolites secondaires présentent des activités biologiques et d'autres n'en présentent pas ou plutôt leurs activités biologiques demeurent inconnues voire inexplorées (**Wassermann et al., 2015**).

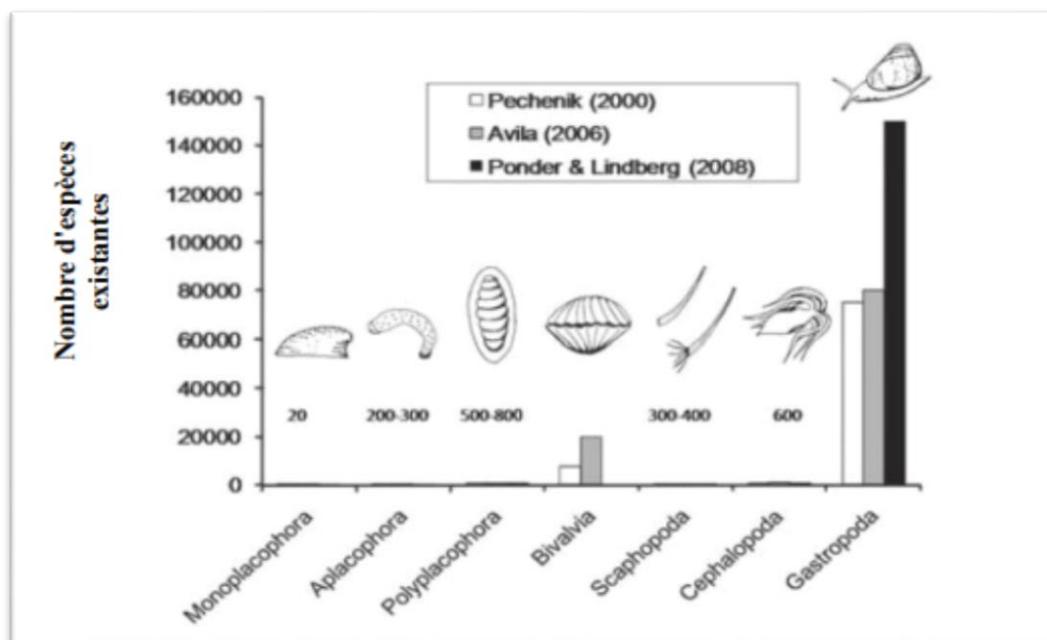


Figure 04 : Nombre estimé des espèces existantes dans chaque classe du phylum des Mollusques (Benkendorff, 2010).

I.2.3. Description (*Callistoctopus macropus*)

Espèce allongée de taille moyenne. La longueur du manteau peut atteindre 15,5 cm, les bras atteignant 7 fois la longueur du manteau. Poids commun environ 2 kg. La longueur totale du corps était normalement d'environ 80 cm, mais des exemplaires d'une taille totale de 120 à 150 cm ont été observés. Couleur de la peau rouge brique avec plusieurs taches blanches (FAO, 2016).



Figure 05 : *Callistoctopus macropus* (FAO, 2016).

Synthèse bibliographique

Tableau 02 : Classification du genre *Callistocopus macropus* (Risso ,1826).

| | |
|----------------------|-----------------------|
| Régne | <i>Animal</i> |
| Embranchement | Mollusca |
| Classe | Cephalopoda |
| Ordre | Octopoda |
| Famille | Octopodidae |
| Genre | <i>Callistoctopus</i> |
| Espèce | <i>Macropus</i> |

I.2.4 Utilisation médicale

Parmi les nouvelles structures originales décrites chez les mollusques, certaines ont conduit, ou conduiront, à de nouveaux médicaments après de nombreuses années de recherche. L' ω -conotoxin MVIIA par exemple, est un peptide isolé d'un cône marin tropical venimeux *Conus magus* (Mollusque Gastéropode)(**Olivera et al.,1985**).La forme synthétique a été nommée Ziconotide (**Miljanich, 2004**)et a été commercialisé sous le nom de Prialt en 2004, comme puissant pour le traitement des douleurs chroniques (**Garber, 2005**). Un autre peptide, cette fois isolé de l'aplysie (généralement appelé lièvre de mer) *Dolabella auriculata* en 1972 (Mollusque Gastéropode Opisthobranche) a été baptisé Dolastatine et présente une forte cytotoxicité liée à l'inhibition de la tubuline. Il agit comme un antimitotique (**Pettit et al.,1987 ; Pettitet al.,1989**). En revanche, son analogue synthétique lié à un anticorps, l'Adcetris (Brentuximab vedotin) présente une activité cytotoxique (**Feng et al.,2004**).Le Kahalalide isolé du nudibranche *Elysia rufescens* (Mollusque Gastéropode) en 1993 est un depsipeptide antitumoral et cytotoxique(**Hamann et al.,1993 ;Goetz et al., 1999**).Le Kahalalide est comme l'ES285 isolé du bivalve *Mactromeris polynyma*(**López-Maciá et al., 2001 ; Faircloth et al., 2006**).

Synthèse bibliographique

Dans le cadre de la recherche de substances à activité anticancéreuse d'une espèce de Mollusque particulièrement intéressante, une macromolécule isolée à partir de son hémolymphe, le KLH présente une activité anticancéreuse et est utilisée notamment dans le traitement des cancers de la vessie (**Harris & Harris, 1999, 2000**). Enfin, le KLH est un stimulant immunitaire, utilisé seul ou associé à d'autres antigènes (**Markl et al., 2001**). Le KLH est une protéine complexe associée au cuivre d'environ 8 MDa, présentant une structure quaternaire cylindrique et constituée de vingt chaînes polypeptidiques d'environ 400 kDa, repliées en huit sous-unités globulaires. Cette protéine, non synthétisable, fait partie des 6 principes actifs disponibles sur le marché (**Bourguet-Kondracki & Kornprobst, 2005**). L'importance économique du marché déjà établie par la commercialisation du KLH, l'intérêt médical de l'outil thérapeutique que constitue le KLH et le fait que celui-ci ne soit pas synthétisable mais extrait des animaux, font un sujet de recherche particulièrement pertinent.

II. Activité antibactérienne

II.1 Evolution de la résistance des bactéries

La consommation croissante d'antibiotiques reflète l'intérêt de ces molécules pour traiter et prévenir les infections humaines et animales. L'évolution lente, progressive et préoccupante de nombreuses espèces bactériennes vers la résistance influe sur la thérapeutique et nécessite la recherche de molécules nouvelles. La contamination de l'environnement par des bactéries résistantes traduit l'impact à plus long terme de ces phénomènes. Une telle évolution des bactéries résistantes est très liée aux bases moléculaires et aux mécanismes de résistance qui conditionnent l'épidémiologie de l'antibiorésistance(**Guillot, 1989**).

II.2 Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits d'invertébrés marins

De nombreuses molécules extraites à partir d'invertébrés marins, sont connues pour présenter un large spectre d'activités antimicrobiennes. Ainsi, il a été mis en évidence que certaines molécules affectaient la croissance et le développement de bactéries, de virus, de champignons et de levures (**Nakamura et al., 1988; Mitta et al., 2000c; Zasloff, 2002**). Chez les mollusques marins, des activités antibactériennes et antivirales ont été décrites plus spécifiquement chez des gastéropodes tels que

Synthèse bibliographique

Dolabella auricularia et *Elysia rufescens* au niveau de sécrétions, du ventricule digestive ou de la glande de l'albumen (Hamann et al., 1996; Iijima et al., 2003; Ashour et al., 2006) et chez les bivalves tels que les moules et les huîtres au sein de l'hémolymphe, dans les branchies et le manteau (Charlet et al., 1996; Hubert et al., 1996; Mitta et al., 1999a; Seo et al., 2005; Roch et al., 2008).

III. Activité antioxydante

III.1 Antioxydants

Un antioxydant peut être défini comme étant une substance qui présente à des faibles concentrations par rapport à un substrat, peut significativement retarder ou inhiber l'oxydation de ce substrat (Favier, 2003).

Cette définition peut être élargie et le terme « antioxydant » englobe ainsi toutes les substances qui protègent les systèmes biologiques contre les effets délétères potentiels des processus ou réactions qui engendrent une oxydation excessive (Shimizu, 2004).

Les antioxydants arrêtent la réaction, la plupart du temps parce que la structure des antioxydants est relativement stable (Haton, 2005).

III.2. Composés phénoliques

III.2.1 Polyphénols

Les polyphénols sont des molécules bioactives très recherchées car ils sont réputés pour leurs excellentes propriétés biologiques (antioxydantes, antimicrobiennes, etc...)(Benidiri et al., 2016).

III.2.2 Flavonoïdes

C'est le groupe le plus représentatif des composés phénoliques. Ces molécules ont des structures chimiques variées et des caractéristiques propres. Elles sont omniprésentes dans les fruits, les légumes, les graines, les boissons tels le thé et le vin rouge et d'autres parties de la plante (Tsimogiannins et Oreopoulou, 2006). Elles sont considérées comme des pigments quasi universels des végétaux qui peuvent participer dans les processus photosynthétiques (Mukohata et al., 1978), dans la régulation de gène et dans le métabolisme de croissance (Havsteen, 2002).

Actuellement, environ de 4000 composés flavoniques sont connus (**Edenharder et Grünhage, 2003**)

III.3. Le stress oxydatif et les radicaux libres

Les radicaux libres sont des espèces chimiques très réactives, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ces composés peuvent réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Ils comprennent les ERO, les ERN et les ERS.

Ils peuvent également causer des dommages cellulaires. Selon **Hussain et al.2003**), plusieurs moyens de défense ont évolué pour protéger nos cellules contre les radicaux et pour réparer les dommages de l'ADN.

D'après **Reuter et al.(2010)**,le déséquilibre entre la production de radicaux libres et de métabolites réactifs, que l'on appelle des oxydants ou des ROS, et leur élimination par des mécanismes de protection, dénommés antioxydants. Induire ce qu'on appelle le stress oxydatif.

On distingue au niveau des cellules deux lignes de défense inégalement puissantes pour détoxifier la cellule :

➤ **Antioxydants endogènes**

L'organisme humain possède un système enzymatique, constitué principalement de trois enzymes : le SOD, la catalase et la GPx(**Avissar et al, 1989**). Ces enzymes ont une action complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène, conduisant finalement à la formation d'eau et d'oxygène moléculaire (**Marfak, 2003**).

➤ **Antioxydants exogènes**

De nombreuses molécules issues de notre alimentation : vitamines, nutriments, composés phénoliques, flavonoïdes, caroténoïdes, ...etc. sont considérées comme des antioxydants.

MATERIEL ET
METHODE

I. Matériel animal

I.1 Récolte et congélation

Cette étude est réalisée, sur des tissus de deux espèces d'invertébrés marins, le mollusque *Callistoctopus macropus* et le crustacé *Dromia personata*, qui ont été récoltées au mois de mai 2019 dans la côte de Bejaia Aiguade, dans un endroit naturel loin de la pollution.



Figure 06 : lieu de récolte

Les récoltes ensuite étaient directement acheminées dans une glacière au laboratoire et stockés à -20°C. Pour une utilisation ultérieure.



Figure 07: *Dromia personata*



Figure 08 : *Callistoctopus macropus*

II. Extraction des composés bioactifs

II.1 Extraction par macération

Les extraits utilisés au cours de cette étude sont préparés selon la méthode de macération.

➤ Principe

Le principe de cette méthode est basé sur l'extraction sélective liquide-solide en utilisant deux solvant différent : méthanol et dichlorométhane (**Benidiri et al., 2016**).

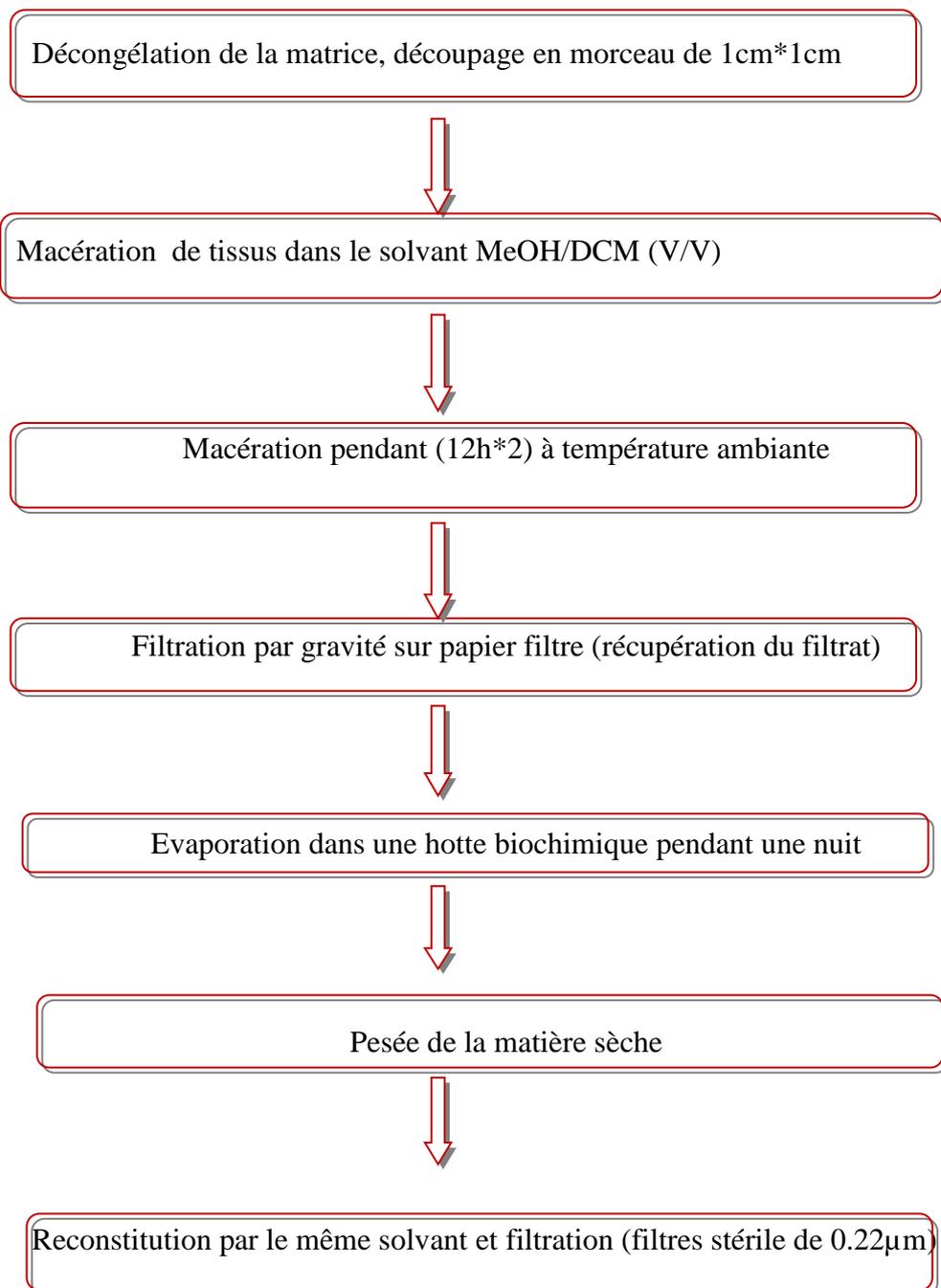


Figure 09: Protocole d'extraction des deux espèces d'invertébrés marins par macération (Garcia-Davis., 2018)

II.2 Détermination du rendement

Le rendement en extrait sec est déterminé par la différence entre le poids du bécher avec l'extrait sec et celui du bécher vide sur le poids initial de l'échantillon.

Le rendement d'extraction est calculé comme suite :

$$RE\% = (P_1 - P_0) / E * 100$$

P₀ : Poids du bécher vide (mg).

P₁ : Poids du bécher après évaporation (mg).

E : Poids de l'échantillon (mg).

RE% : Rendement d'Extraction exprimé en pourcentage.

III. Dosage des composés phénoliques

III.1 Dosage des polyphénols

Les polyphénols sont estimés par la méthode de Folin-Ciocalteu. Ce dosage repose sur le réactif de Folin Ciocalteu qui est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. L'oxydation des phénols réduit, ce réactif en un mélange d'oxyde bleu de tungstène et de molybdène. L'intensité de la couleur est proportionnelle au taux de **composés phénoliques oxydés (Boizot et Charpentier., 2006).**

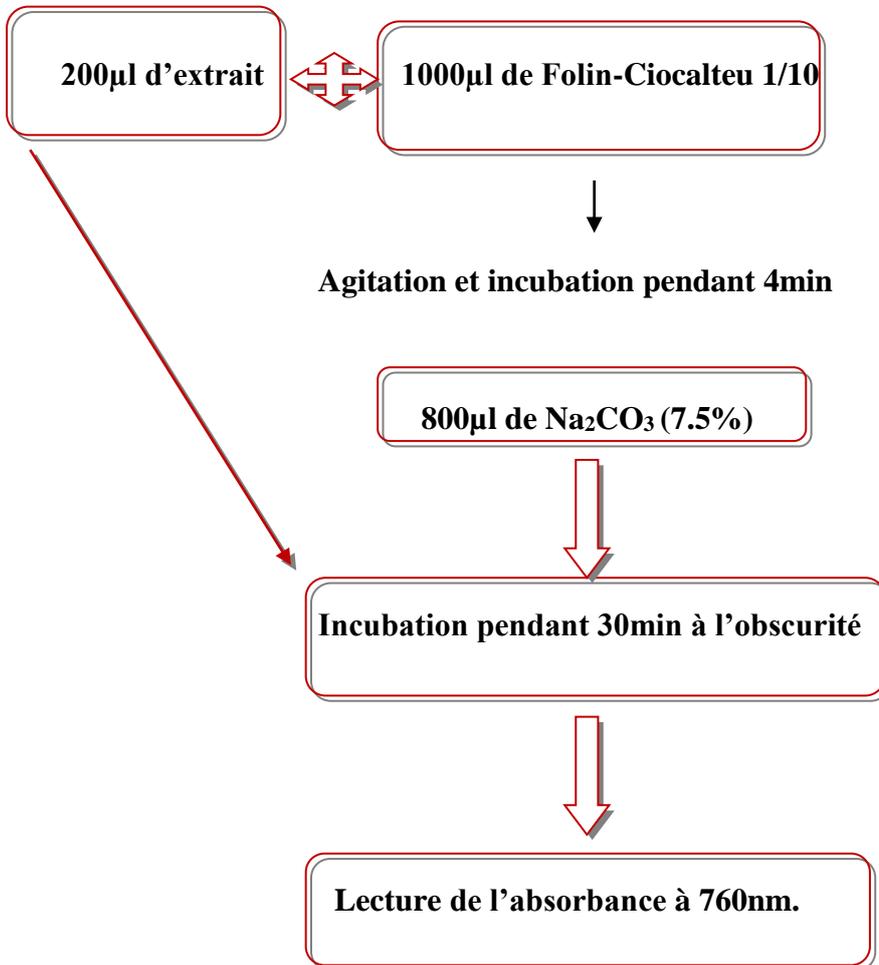


Figure 10 : Protocole de dosage des polyphénols (Boizot et Charpentier., 2006).

Les concentrations des polyphénols sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec l'acide gallique et sont exprimées en mg équivalent d'acide gallique par 1 g d'extrait, présenté dans l'Annexe 4, figure 21.

III.2.Dosage des flavonoïdes

La méthode utilisée de trichlorure d'aluminium décrite par (Bahoum et al. 1996).

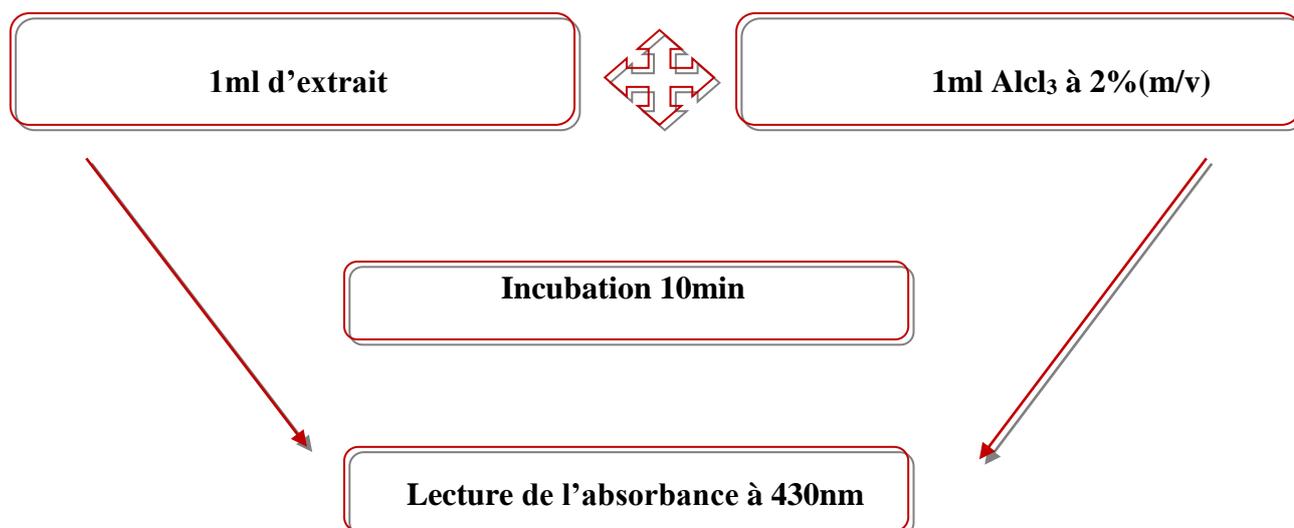


Figure 11 : Protocole de dosage des flavonoïdes (Bahoum et al. 1996).

Les concentrations des flavonoïdes sont déduites à partir des gammes d'étalonnage établies avec la quercétine et sont exprimées en mg équivalent quercétine par 1 g d'extrait, présenté dans l'Annexe 4, figure 22.

IV. Etude de l'activité antimicrobienne des invertébrés marins.

IV.1. Souches cibles

Les souches qui ont fait l'objet des tests antibactériens sont au nombre de 6 (2 bactéries à Gram positif « Staphylococcus aureus ; Bacillus sp » et 4 bactéries à Gram négatif « E.coli ; Klebsiella sp ; Pseudomonas sp ; Proteus sp »), issus des patients hospitalisés et à titre externe responsable d'infection urinaire, ces germes sont fournis par le laboratoire microbiologique de l'hôpital de Bejaia.

Les caractères morphologiques, biochimiques des souches bactériennes sont présentés dans le tableau 03et 04 en annexe 1

IV.2. Repiquage des souches bactériennes sur une gélose nutritive

La gélose nutritive est utilisée pour avoir une culture jaune, les troubles sélectionnées à partir des tubes de transport ont été repiquées et incubées à 37°C pendant 24h.

IV.3. Détermination de la zone d'inhibition maximal sur gélose (Mueller-Hinton)

La sensibilité des souches aux extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose Mueller Hinton. le profile de sensibilité des souches bactériennes aux antibiotiques sont présentés dans le tableau 05 en annexe 2

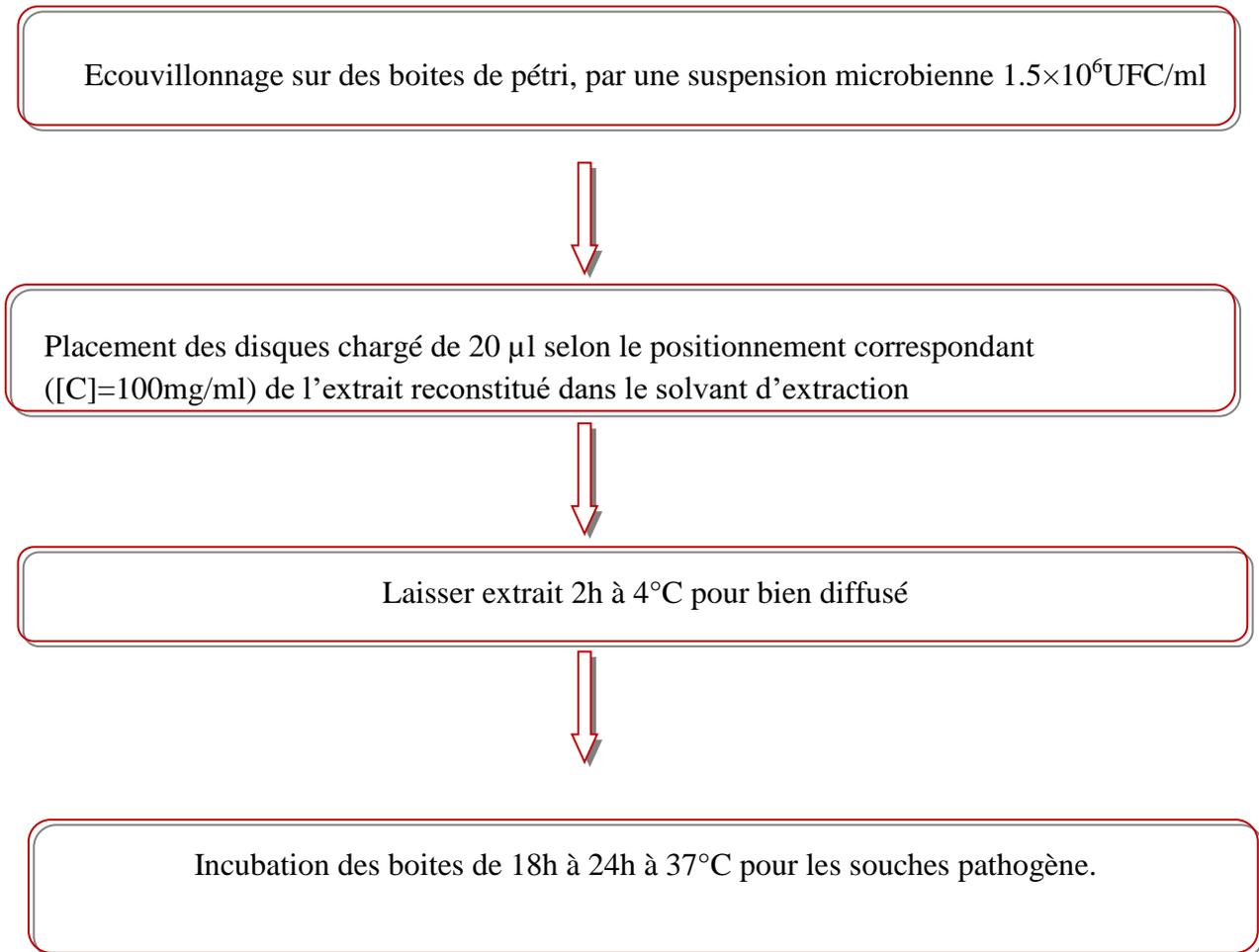


Figure 12 : Etude de l'activité antimicrobienne des deux extraits d'invertébrés marins.

Le méthanol et le dichlorométhane ont été utilisés comme témoins négatifs.

La composition des milieux de culture sont présenté dans l'annexe 3.

V. Etude de l'activité antioxydante au DPPH

L'étude de l'activité antioxydante des deux extraits, est réaliser par la méthode de piégeage des radicaux DPPH (2.2-diphényl-1-picrylhydrazyle), selon le protocole décrit par (Viveros-Valdez et al., 2008).

Dans ce test les antioxydants réduisent le diphénil picryl hydrayl, ce qui permet de passer d'une couleur violet au jaune, dont l'intensité de la couleur est liées à la capacité des antioxydants présents dans le milieu, a cédé des protons (Sanchez-Moreno.,2002).

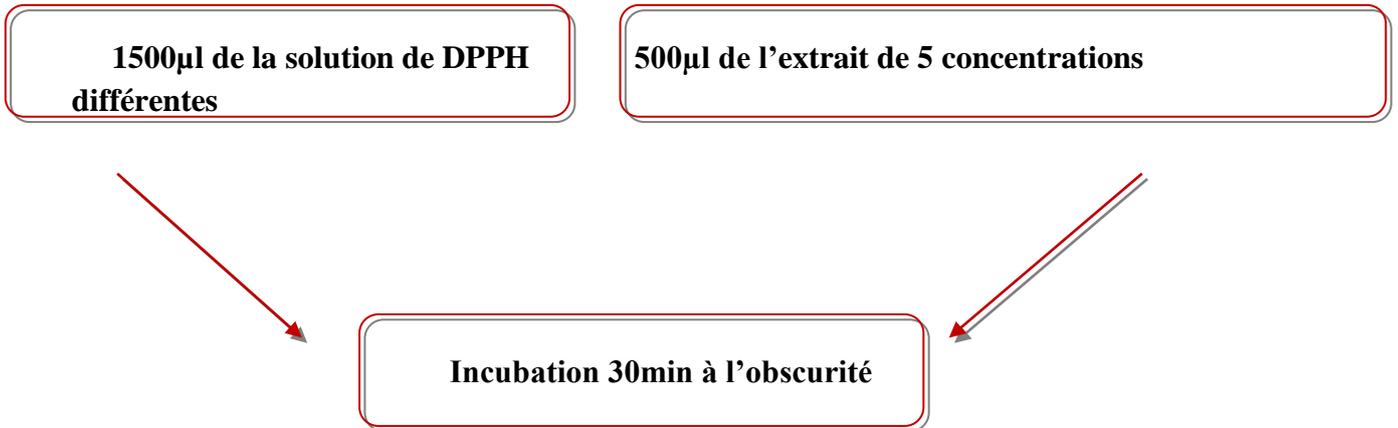


Figure 14 : Protocole de mesure de l'activité antioxydante par DPPH (Viveros-Valdez et al., 2008).

L'activité anti-radicalire est estimée selon l'équation suivante :

$$\% \text{ L'activité anti-radicalaire} = \frac{[\text{abs du contrôle} - \text{Abs de l'échantillon}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100.$$

RESULTAT ET
DISCUSSION

Dans ce présent travail, nous avons évalués le taux d'extraction des extraits bruts de deux espèces d'invertébrés marins, ainsi que l'activité antimicrobienne de ces derniers sur des souches bactériennes issus de patients hospitalisés et de patients à titre externe (*Bacillus*, *S. aureus*, deux *E. coli*, *Klitsilla sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*).

Un dosage des polyphénols, des flavonoïdes a été réalisé et l'activité antioxydant a été évaluée par la technique de piégeage du radical libre DPH.

I. Rendement en extraits des espèces d'invertébrés marins.

Les résultats des taux d'extraction pour les deux espèces d'invertébrés marins sont représentés dans la figure 16.

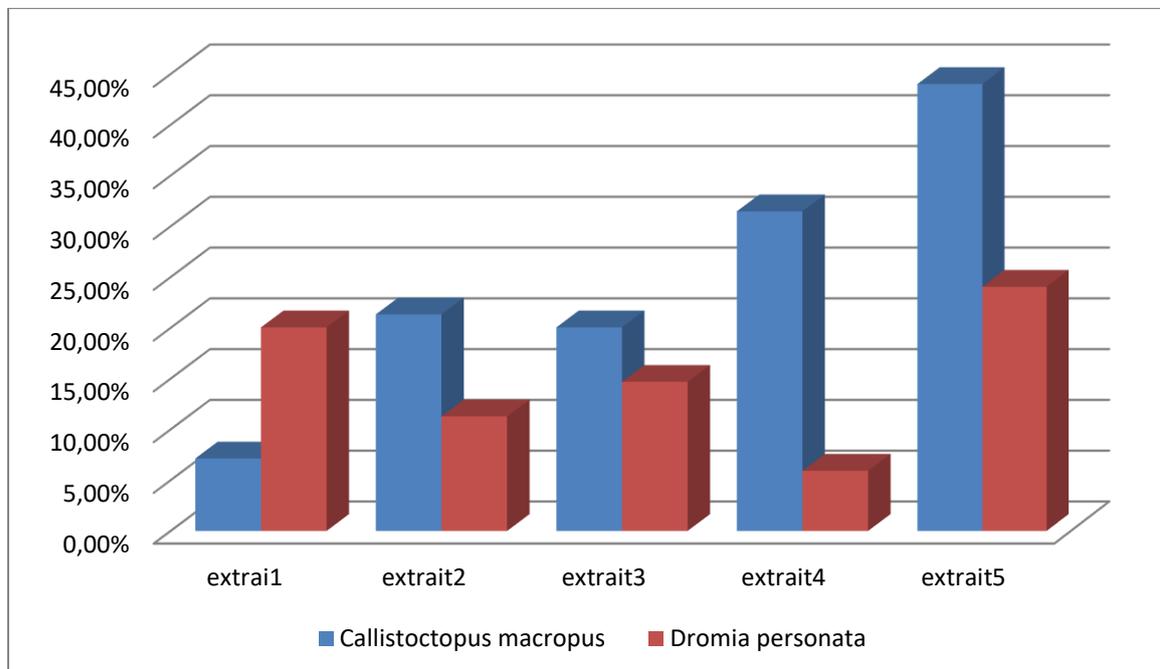


Figure 16:Taux de rendement des extraits rapportés des deux espèces d'invertébrés marins.

L'utilisation de solvant à polarité différente permet de séparer les composés de l'extrait brut selon leurs degrés de solubilité dans le solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction menée à température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probables dues aux températures élevées utilisées dans d'autres méthodes d'extraction.

De meilleurs rendements ont été enregistrés pour les extraits de l'espèce *C.macropus* avec une moyenne de $30,252 \pm 9$ par rapport aux extraits de *D.personata* avec une moyenne de $15,19 \pm 7$.

Cette divergence dans les quantités de rendement a été mise en évidence par le test d'ANOVA qui a donné une différence significative au seuil d'erreur 5%.

Nos résultats soit pour le mollusque ou le crustacé montrent que les rendements des extraits MeOH/DCM sont relativement élevés par rapport à d'autres travaux réalisés avec la même méthode d'extraction mais avec d'autres solvants dont le rendement est de 9% (**Ben Ammar et al., 2008**).

II. Dosage des phénols

Le test phytochimique permet de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les extraits préparés par des réactions de colorations, de précipitations et des observations sous lumière ultra-violette (**Harborne,1998**).

II.1.Dosage des polyphénols

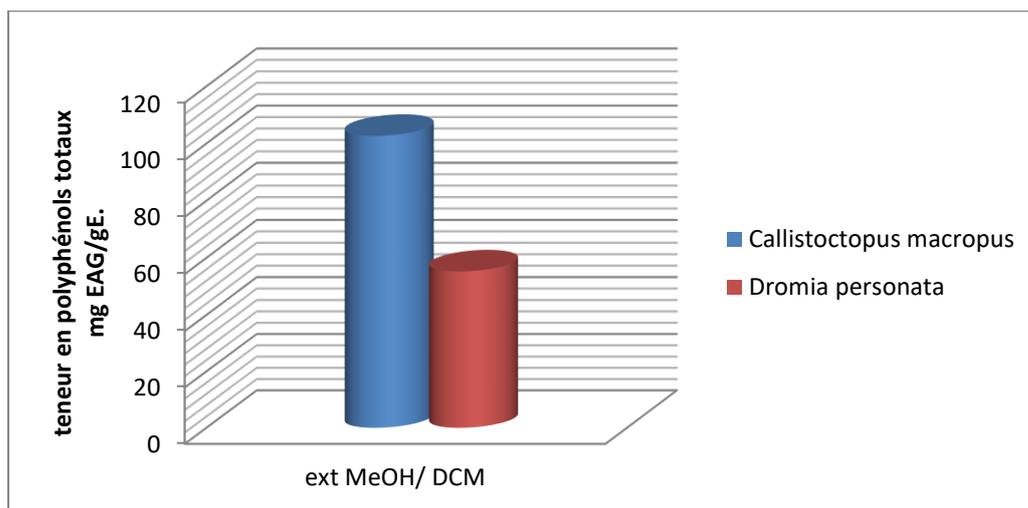


Figure 17: Teneur en polyphénols totaux de *C.macropus* et *D.personata*.

Les résultats des dosages quantitatifs des polyphénols totaux réalisés sur les deux espèces d'invertébrés marins sont présentés sous forme d'histogrammes.

D'après les résultats obtenus, on remarque que les concentrations en polyphénols totaux sont plus élevées chez les mollusques qui présentes une concentration de 102.66 ± 1.57 mg EAG/g par rapport aux concentrations enregistrées chez les crustacés qui ont fournis $55,26 \pm 2,12$ mg EAG/g d'extrait.

II.2 Dosage des flavonoïdes

Les teneurs en flavonoïdes sont présentées dans la figure 18.

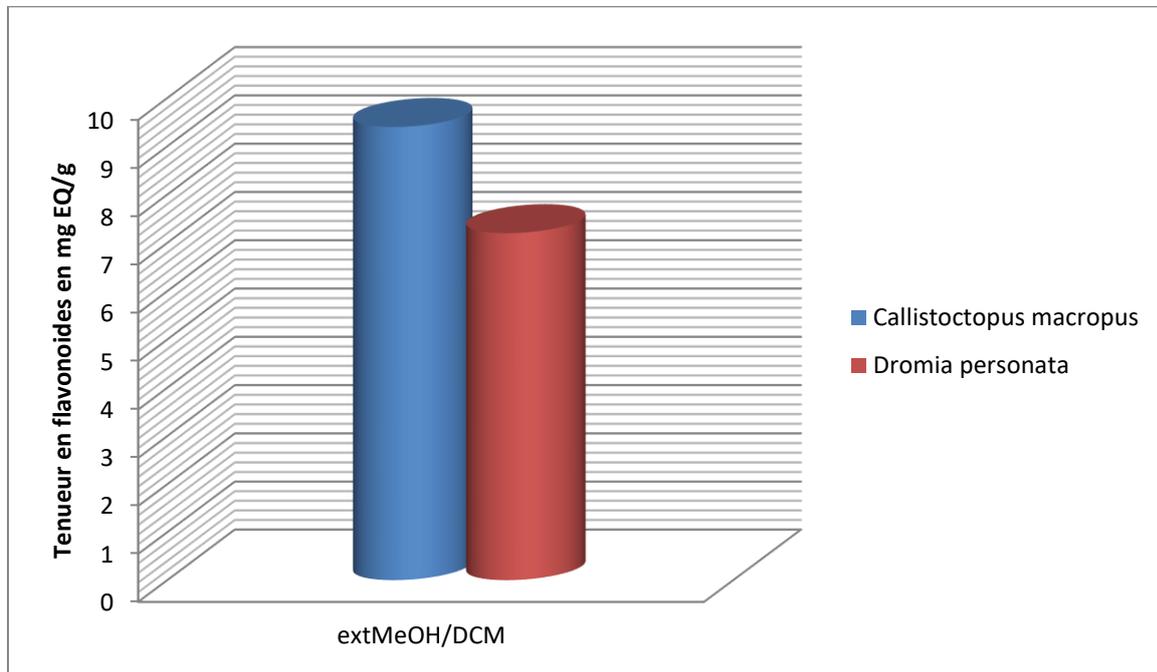


Figure18 : Teneur en flavonoïdes de *C.macropus* et *D.personata*.

Alors que, la teneur en flavonoïdes enregistrée dans cette étude est modérée chez les deux invertébrés marins, une concentration de $23,44 \pm 0,12 \text{ mgEQ/mg}_{\text{d'extract}}$ pour les mollusques et une concentration de $18,47 \pm 1,21 \text{ EQ/mg}_{\text{extract}}$ pour les crustacés.

D'après l'analyse statistiques, les teneurs en polyphénols et aux flavonoïdes pour les deux espèces d'invertébrés marins présente une déférence hautement significative ($p < 0,005$).

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux de la bibliographie car l'utilisation de différentes méthodes d'extraction, réduit les possibilités de comparaison entre les études (Trabelsi et al., 2010). Des études récentes ont montrées que les teneurs en composés phénoliques, changent de façon considérable d'une espèce à une autre et à l'intérieur de la même espèce, à cause des facteurs extrinsèques (température, climat...), génétiques (la variété et l'origine d'espèces), physiologiques (le degrés de mutation, organes utilisés) et la durée de stockage (Maisuthisakul et al., 2007).

Ainsi il existe peu de travaux sur le contenu phénolique chez les espèces d'invertébrés marins.

III. Activité antibactérienne

Dans cette méthode, la méthode de diffusion sur milieu gélosé est utilisée pour étudier l'activité antibactérienne des extraits bruts de deux espèces d'invertébrés marins.

Les deux extraits ont été testés vis-à-vis de 6 souches bactériennes (*Bacillus*, *S. aureus*, *E.coli*, *Klipsisilla sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*).

Les résultats de l'étude de sensibilités des souches bactériennes aux extraits bruts (*In vitro*) sont représentés dans la figure 23, le tableau 9 en annexe, selon trois niveaux d'activité : Résistant : $D < 8\text{mm}$, Intermédiaire : $15\text{mm} \geq D \geq 8\text{mm}$ et Sensible $D > 15\text{mm}$.

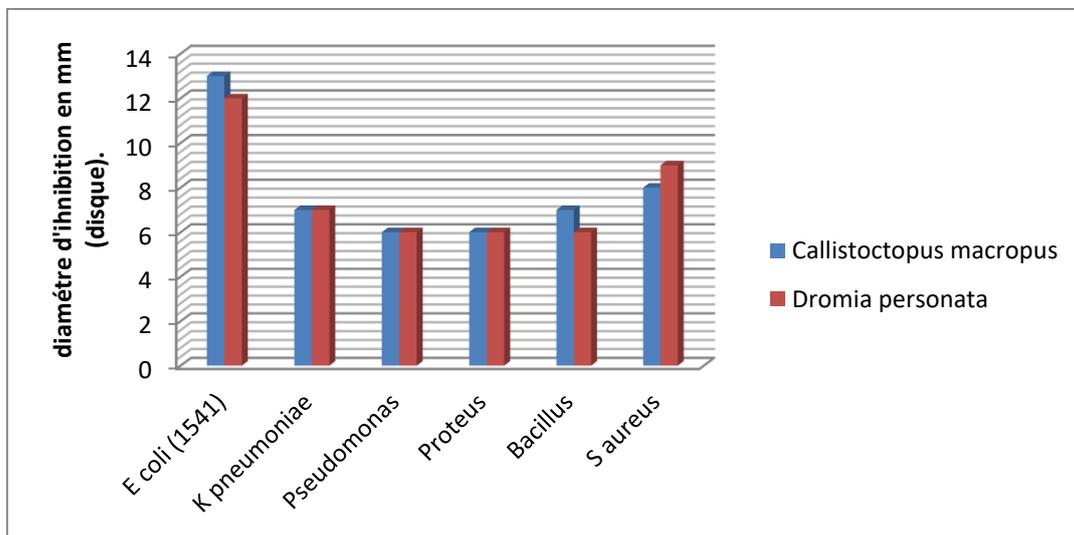


Figure 19: Activité antibactérienne des deux extraits bruts marins vis-à-vis des bactéries à gram négatif et les bactéries à gram positif.

L'extrait brut de *C.macropus* et *D.personata* affichent la zone d'inhibition la plus importante avec 13mm de diamètre sur tous les tests effectués vis-à-vis de la souche de *E.coli*.

(Zbakh et al., 2012) ont rapportés qu'*E.coli* est sensible vis-à-vis des extraits marins avec un intervalle des zones d'inhibition situant entre 10mm et 15mm, ces résultats s'accordent avec ceux que nous avons obtenus.

Pour les autres bactéries à gram négatif (*Klipsisilla sp*, *pseudomonas sp*, *proteus sp*), les résultats montrent une zone d'inhibition très faible voire nul.

Lors de la comparaison des diamètres d'inhibition des extraits des deux espèces d'invertébrés marins vis-à-vis les souches bactériennes, on déduit à partir du test d'ANOVA que les extraits ne présente aucune relation significative.

(**Gracia-Davis et al., 2018**) ont obtenus des résultats similaires aux nôtres, à savoir que l'extrait de l'invertébrés marins a montré une activité antibactérienne assez faible avec une zone d'inhibition de 6mm et 9mm.

Pour les activités antibactériennes des bactéries à Gram positif (*S. aureus* et *Bacillus*), nos résultats montrent une faible sensibilité allant de 7 à 9 mm de diamètre. Ces résultats sont comparables avec d'autres travaux rapportant un diamètre faible de 7mm à 10mm (**Gracia-Davis et al., 2018**).

Plusieurs facteurs peuvent être à l'origine de la faible activité antibactérienne de nos extraits méthanoliques et d'une différence entre nos résultats et ceux obtenus dans des études antérieures prometteuses. Parmi ces facteurs, la variabilité intra spécifique de la production de métabolites secondaires entre les différents espèces d'invertébrés marins (**Karabay-Yavasoglu et al., 2007**). Ainsi qu'à la différence des méthodes d'extractions utilisées (**Rajasculochane et al., 2009**).

Nos résultats nous permettent de constater que l'extrait méthanolique du crustacé et du mollusque montre une activité antibactérienne similaire et faible à l'exception d'*E.coli*, qui présente une activité intermédiaire modérée.

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

La mise en évidence du pouvoir antioxydant des extraits a été réalisée par la technique chimique le piégeage du radical libre DPPH.

IV.1.L'activité antiradicalaire DPPH

L'activité antioxydante des extraits méthanoliques de *C.macropus* et *D.personata* ainsi de l'antioxydant standard (acide ascorbique) vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de couleur violette (DPPH*) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517nm . Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances antiradicalaires(**Majhenic et al., 2007**).

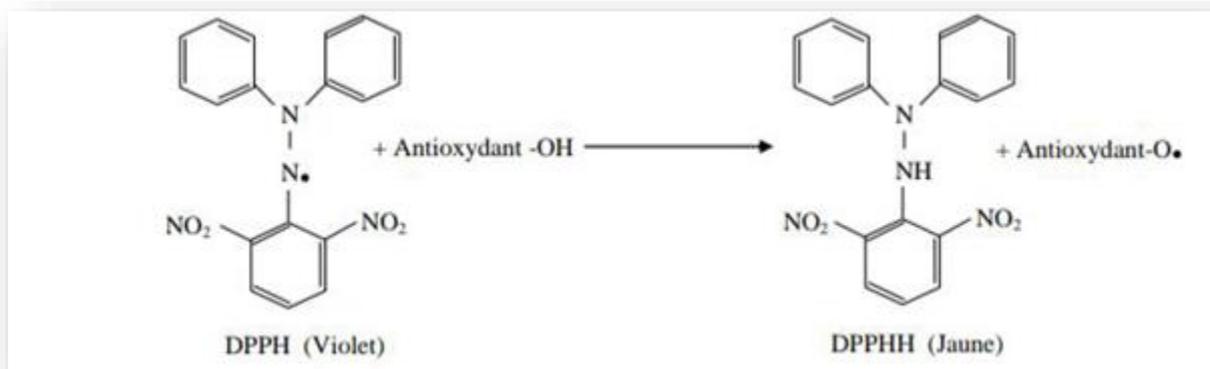


Figure20 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.

Les résultats obtenus représentés dans le tableau 11 montrent que l'extrait de mollusque exerce une bonne activité antioxydante au radical DPPH à un pourcentage de $62,32 \pm 9,42$ qui est moyennement élevé au pourcentage d'inhibition trouvé chez le crustacé $56,40 \pm 12,28$.

Les résultats présentés dans la figure 21 de l'activité antiradicalaire de l'extrait méthanolique des mollusques *C.macropus*, montrent une IC50% (Concentration inhibant 50% de la réaction) = $0,0457 \text{ mg/ml}$, qui est inférieur à celle enregistrée pour l'acide ascorbique qui est de : $\text{IC}_{50\%} = 0,13879 \pm 0,00112 \text{ mg/ml}$.

Alors que pour les crustacés *D. personata*, les résultats montrent un $\text{IC}_{50\%} = 0,59 \text{ mg/ml}$, qui est inférieur à celle enregistrée pour l'acide ascorbique.

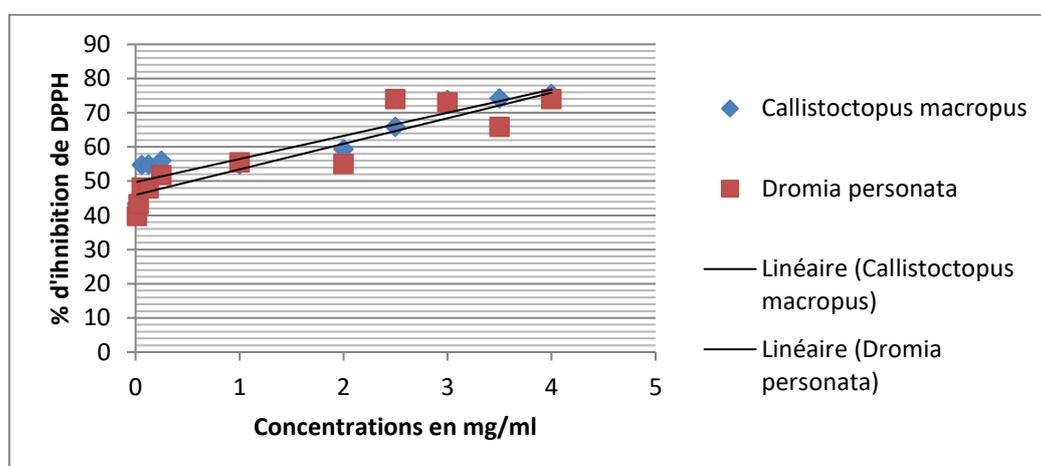


Figure21 : Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des deux invertébrés marins.

Selon les résultats trouvés, l'extrait méthanolique de mollusque est doté d'un pouvoir antioxydant important, tandis que pour le crustacé le pouvoir antioxydant est modéré.

L'étude statistique a révélé une corrélation significative ($p < 0.05$) de l'activité antiradicalaire contre le DPPH méthanolique entre l'extrait méthanolique de *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata*.

Il a été démontré que les molécules antioxydantes telles que l'acide *ascorbique*, la tocophérol, les flavonoïdes et les tanins réduisent et décolorent le DPPH en raison de leur capacité à céder l'hydrogène (**DePooter et Schamp., 1986**).

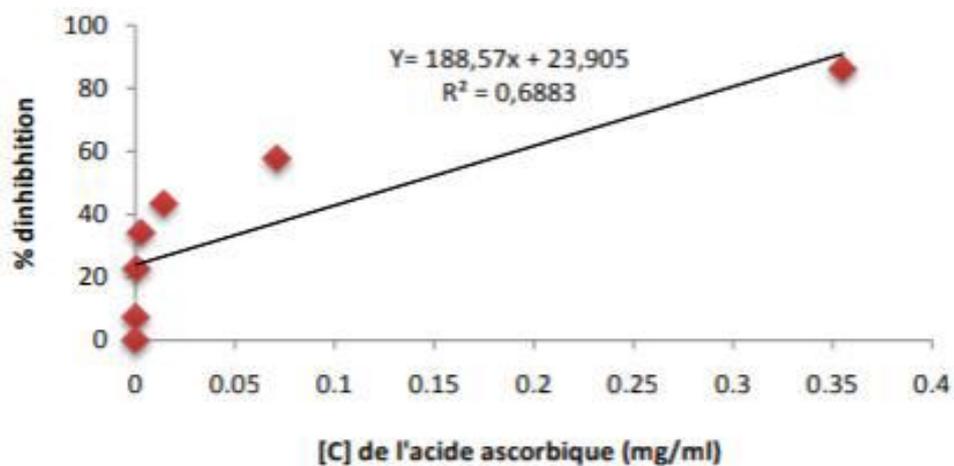


Figure 22 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique mg/ml.

Conclusion et perspectives

L'évaluation des métabolites secondaires provenant des espèces marines pour leurs activités biologiques a augmenté considérablement dans le monde ces dernières années. Ceci montre que les molécules isolées à partir de ces espèces marines sont certainement intéressantes pour être utilisées comme thérapie alternative ou comme modèle pour la synthèse de nouvelles substances.

L'objectif primordial de cette étude est d'évaluer les activités antibactériennes et antioxydantes de deux espèces d'invertébrés marins *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata*.

L'extraction par macération en utilisant deux solvants Méthanol et le Dichlorométhane à enregistré des rendements élevés pour les deux espèces en particulier pour le mollusque avec un taux de 30.252% \pm 9, suivi du crustacés avec un taux de 15.19% \pm 7.

Les tests d'activités antibactériennes effectués ont révélés que les extraits méthanoliques des deux espèces d'invertébrés marins possédaient la plus grande activité antimicrobienne (13mm de diamètre) vis-à-vis la souche d'*Escherichia coli* à une dose de 100 mg.

Tendis que les activités antibactériennes des autres souches bactériennes sont très modérées voir faibles (*Klebseilla sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*).

En revanche l'évaluation de contenu des phénols totaux en adoptant la méthode de Folin-Ciocalteu révèle la présence des quantités intéressantes en polyphénols pour le mollusque *Callistoctopus macropus* 102.66 \pm 1.57mg EAG/g et modéré pour le crustacé *Dromia personata* 55.26 \pm 2.12mg EAG/g.

De même nous avons dosé les flavonoïdes par la méthode d' $AlCl_3$ qui nous mène à conclure que ces deux invertébrés marins possèdent des quantités modérées en flavonoïdes 23.44 \pm 0.12mg EQ/ 18.47 \pm 1.21 mg EQ/g pour les mollusques et les crustacés respectivement.

Le test au DPPH a montré que les composés phénoliques des deux espèces marines étudiées étaient doués de l'activité antioxydante.

D'après les résultats, les mollusques ont présenté l'activité la plus élevée avec un CI50=0.0457mg/ml, cependant les crustacés ont donnés une activité modéré de CI50=0.59mg/ml.

Au terme de ce travail, et pour compléter la présente étude, il serait important :

- ✓ De faire des travaux supplémentaires pour identifier et isoler les métabolites bioactifs.
- ✓ D'approfondir les recherches sur les propriétés pharmacologiques de *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata*.
- ✓ De faire des études *in vitro* et *in vivo* pour évaluer d'autres propriétés antioxydantes, antibactériennes, anti-inflammatoires et anti-cancéreuses.

Tableau 3 : Caractères morphologiques et biochimiques des espèces bactériennes.

| | Caractères morphologiques | Caractères biochimiques |
|---------------------|--|---|
| <i>E.Coli</i> | Bacilles mobiles le plus souvent, à Gram - | Oxydase-, catalase+, glucose+, nitrate+, ONPG+, H ₂ S-, mannitol+, citrate-, vp-, Inositol-... |
| <i>Klibsilla sp</i> | Bacilles immobiles, à Gram - | Glucose+, indol-, ONPG+, ODC-, H ₂ S-, uréase+, TDA-, VP+... |
| <i>Pseudomonas</i> | Bacillus à Gram - | Oxydase+, glucose+, indol-, colonies souvent pigmentées... |
| <i>Proteus</i> | Bacilles très mobiles à Gram- | Glucose+, ONPG-, TDA+, oxydase-, nitrate+, |
| <i>Bacillus</i> | Bacilles à Gram+, sporulés | AAF, glucose+, vp+, gélatinase+, uréase- |
| <i>S. aureus</i> | Coques immobiles à Gram+ | Coagulase+, catalase+,halophile, oxydase-, glucose+... |

Tableau 4 : Pouvoir pathogène des souches bactériennes.

| Espèces bactériennes | Pouvoir pathogène |
|-----------------------------|--|
| <i>E.coli</i> | Infections intestinales, urinaires, septicémies, méningite néo-natale, pulmonaire, ostéo-articulaire. |
| <i>Klibsilla sp</i> | Germe opportuniste impliqué dans les infections nosocomiales, telque ; infections urinaires, pneumopathies, septicémies. |
| <i>Pseudomonas</i> | Infections nosocomiales avec souches résistantes à certains antibiotiques, septicémie. |
| <i>Proteus</i> | Infections urinaires, infections de plaie... |
| <i>Bacillus</i> | Maladie de charbon, intoxication alimentaires. |
| <i>S. aureus</i> | Abcès, angines, otites, sinusites, panaris... |

Tableau 5 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *E.coli*.

| | Sensible | Intermédiaire | Résistant |
|---------------|---------------------|---------------|----------------------|
| <i>E.coli</i> | Amox+ Ac | | Ampicilline |
| | Céfazoline | | Amoxicilline |
| | Imipénème | | Céfoxitine |
| | Amikacine | | Acide nalidixique |
| | Ciprofloxacine | | Sulfaméthoxazole+TMP |
| | Chloramphénicol | | |
| | Furanes fosfomycine | | |

Tableau 6 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *Klisisilla sp*

| Souche bactérienne | Sensible | Intermédiaire | Résistant |
|----------------------|----------------------|---------------|--------------|
| <i>Klisisilla sp</i> | Amox+Ac Clav | Céfoxime | Ampicilline |
| | Imipénème | céftazidime | Amoxicilline |
| | Amikacine | | Céfoxitine |
| | Gentamicine | | |
| | Acide nalidixique | | |
| | Ciprofloxacine | | |
| | Ciprofloxacine | | |
| | Chloramphénicol | | |
| | Furanes | | |
| | Sulfaméthoxazole+TMP | | |
| | Fosfomycine | | |

Tableau7 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *Pseudomonas sp.*

| Souche bactérienne | Sensible | Intermédiaire | Résistant |
|---------------------------|---|----------------------------------|------------------|
| <i>Pseudomonas sp</i> | Céftazidime Imipénème Amikacine Gentamicine Ciprofloxacine Lévofloxacine Nétilmicine Ticarcilline tobramycine | Ticarcilline+ Ac clavulanique | |

Tableau 8 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *proteus sp.*

| Souche bactérienne | Sensible | Intermédiaire | Résistant |
|---------------------------|--|----------------------|---|
| Proteus | Amox+ Ac Clav Céfoxitine Céfotaxime Céfdinir Céftriaxone Céfixime Céftazidime Amikacine Gentamicine Acide nalidixique Ciprofloxacine Chloramphénicol Sulfaméthoxazole+ TMP Fosfomycine | | Ampicilline Amoxiciline Céfazoline Furanes |

Tableau 9 : Etude de la sensibilité aux antibiotiques de *Staphylococcus aureus*.

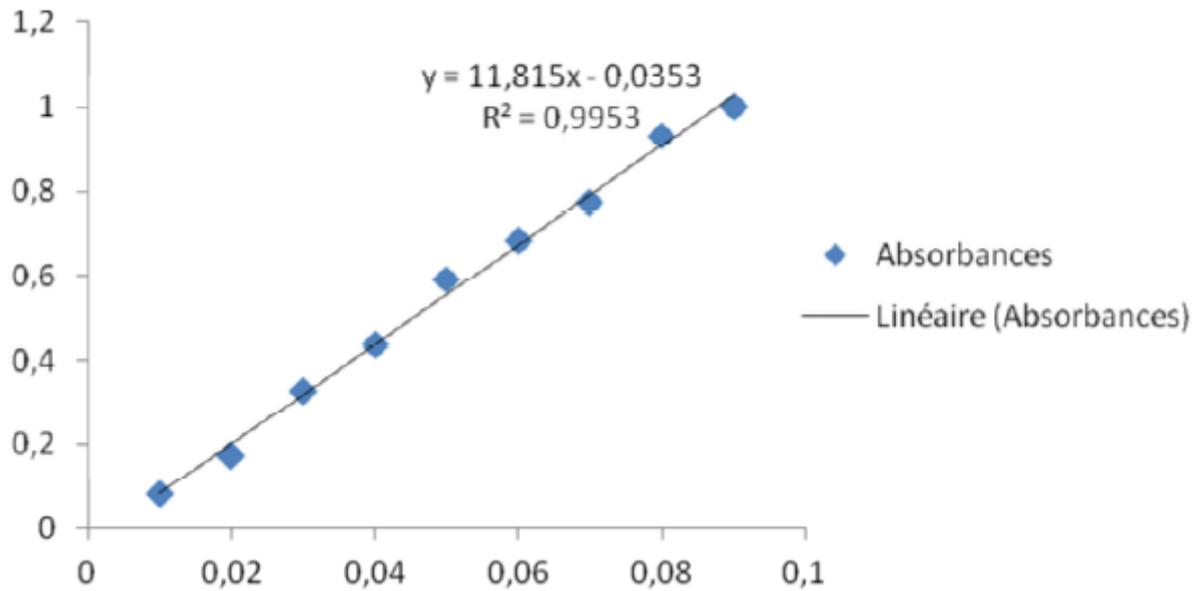
| Souche bactérienne | Sensible | Intermédiaire | Résistant |
|--------------------|----------------|---------------|-------------|
| <i>S. aureus</i> | Ofloxacin | | fostomycine |
| | Teicoplanine | | |
| | Kanamycine | | |
| | Clindamycine | | |
| | Ciprofloxacine | | |
| | Lévofloxacine | | |
| | Rifampicine | | |
| | vancomycine | | |

Composition des milieux de culture (pour 1l d'eau distillée).**❖ Milieux de cultures****Gélose Mueller Hinton**

| | |
|----------------------------|-----------|
| Infusion de viande de bœuf | 300g |
| Hydrolysate de caséine | 17.5g |
| Amidon | 1.5g |
| Agar | 7,3 ± 0,1 |

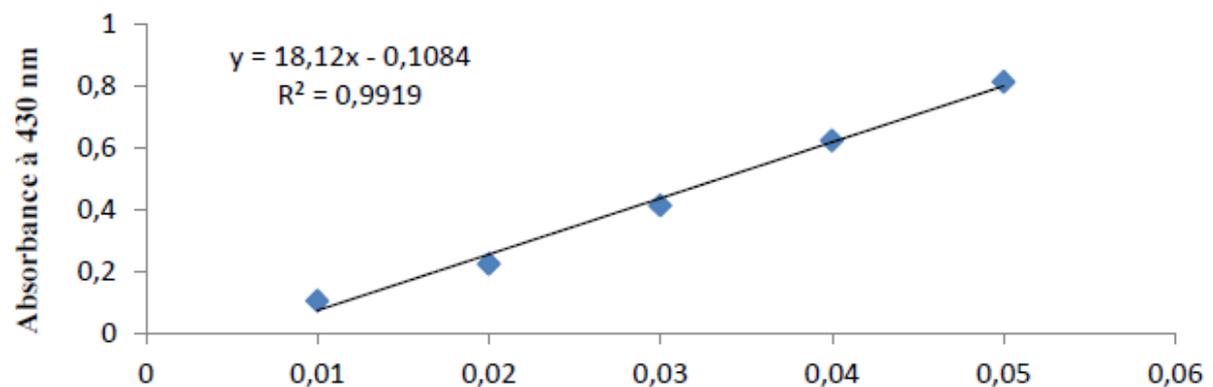
Gélose nutritive

| | |
|--------------------|----------|
| Extrait de viande | 1.0g |
| Extrait de levure | 2.5g |
| peptone | 5.0g |
| Chlorure de sodium | 5.0g |
| agar | 15.0g |
| pH | 7.0± 0.2 |



Concentration en Acide gallique en mg/ml.

Annexe : la courbe d'étalonnage en Acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux



Concentration en quercétine en mg/ml.

Annexe : la courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.

Tableau 8 : rendement des extraits bruts des deux invertébrés marins.

| | Mollusques |
|-------------------|-------------------|
| 20.04% | 34.42% |
| 11.28% | 21.32% |
| 14.68% | 20.04% |
| 5.92% | 31.47% |
| 24.04% | 44.01% |
| 15.19±7.12 | 30.252±9.9 |

Tableau 9 : zones d'inhibition des souches bactériennes vis-à-vis des extraits méthanoliques des deux espèces d'invertébrés marins

| Souches bactériennes | <i>E.coli</i> | <i>K.sp</i> | <i>Pseudomonas sp</i> | <i>Proteus sp</i> | <i>S.aureus</i> | <i>Bacillus</i> |
|--|---------------|-------------|-----------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| Extrait méthanolique du mollusque | 13mm | 7mm | 6mm | 6mm | 8mm | 7mm |
| Extrait méthanolique du crustacés | 13mm | 7mm | 6mm | 6mm | 9mm | 6mm |

Tableau 10 : dosage des phénols chez les deux espèces d'invertébrés marins.

| Invertébrés marins | Polyphénols | flavonoïdes | DPPH |
|---------------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Mollusques | 102.94±1.57 | 23.47±0.12 | ± |
| Crustacés | 55.54±2.12 | 18.51±1.21 | ± |

Tableau 11: Pouvoir réducteur des extraits méthanoliques des deux invertébrés marins.

| Concentrations mg/ml | <i>Callistoctopus macropus</i> | <i>Dromia personata</i> |
|-------------------------|------------------------------------|-----------------------------|
| 0,015625 | 43,41 | 39,83 |
| 0,03125 | 45,38 | 43,36 |
| 0,0625 | 54,84 | 48,17 |
| 0,125 | 54,87 | 47,94 |
| 0,25 | 56,05 | 51,82 |
| 1 | 54,87 | 55,58 |
| 2 | 59,34 | 55,11 |
| 2,5 | 65,92 | 74,03 |
| 3 | 73,76 | 73,09 |
| 3,5 | 74,26 | 65,92 |
| 4 | 75,55 | 74,03 |

Références

A

- ✓ Armand, Colin, M. D. Grmek, D. Guinot .Les crustacés dans la matière médicale européenne au XVIe siècle. Revue d'histoire des sciences et de leurs applications, janvier-Mars 1965, Vol.18, N°1, pp. 55-71.
- ✓ Ashour, M., Edrada, R., Ebel, R., Wray, V., Watjen, W., Padmakumar, K., Muller, W.E.G., Lin, W.H., Proksch, P., 2006. Kahalalide Derivatives from the Indian Sacoglossan Mollusk *Elysiagrandidifolia*. *Journal of Natural Products* 69, 1547-1553.

B

- ✓ Benidiri Sabrina, Benmammar Sonia. Dosage des Composés Phénoliques et Détermination de L'activité Antioxydante de *Rhamnus alaternus* L et *Malvasylvestris* L. Sciences Biologiques, Bejaia, Université ABDERRAHMANE MIRA, 2016, 54p.
- ✓ Benkendorff, K., Davis, A.R., Bremner, J.B., 2001. Chemical Defense in the Egg Masses of Benthic Invertebrates: An Assessment of Antibacterial Activity in 39 Mollusks and 4 Polychaetes. *Journal of Invertebrate Pathology* 78, 109-118.
- ✓ Benkendorff, K. *Biol. Rev.* 2010, 85, 757–775.
- ✓ Blunt J.W., Copp B.R., Munro M.H.G., Northcote P.T. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2011. 28(2): p. 196-268.
- ✓ Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Reports*, 2014. 31(2): p. 160-258.
- ✓ Blunt J.W., Copp B.R., Keyzers R.A., Munro M.H.G. et Prinsep M.R., Marine natural products. *Natural Product Report*, 2015. 32(2): p. 116-211.
- ✓ Bourguet-Kondracki ML, Kornprobst JM. 2005. Marine pharmacology: potentialities in the treatment of infectious diseases, osteoporosis and Alzheimer disease. In: Le Gal Y, Ulber R (eds). *Marine Biotechnology*.

Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology, Springer Verlag, Heidelberg, 97: 105- 132.

- ✓ Braekman C, Daloze D. Les médicaments de la mer. La Recherche 1983;143: 465-72.

C

- ✓ Charlet, M., Chernysh, S., Philippe, H., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Bulet, P., 1996. Innate Immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc *Mytilus edulis*. Journal of Biological Chemistry 271, 21808-21813.

D

- ✓ De Pooter H.L et Champ N. (1986). Comparaison of the volatils composition of some *Calamintha satureja* species. In: Progress in essential oil research. Ed. E-J. Brunk, Walter De Gruyter, Berlin. 139-150.
- ✓ De Vries, D.J. and Hall, M.R., 1994. Marine biodiversity as a source of chemical diversity. Drug Development Research 33, 161-173.
- ✓ Dewick P.M., Medicinal Natural Products. 2002.

E

- ✓ Edenharder, R., Grünhage, D. (2003). Free radical scavenging abilities of flavonoids as mechanism of protection against mutagenicity induced by tert-butyl hydroperoxide or cumenehydroperoxide in *Salmonella typhimurium* TA102. Mutat. Res, 540: 1–18.

F

- ✓ Faircloth, G.; Cuevas, C. Progress in molecular and subcellular biology. 2006, 43, 363–379.
- ✓ FAO (2003). Etat de l'aquaculture dans le monde. La Circulaire 886, Rév.2. Rome, Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. 114 p.
- ✓ FAO (2016). Jereb, P., Roper, C.F.E., Norman, M.D. & Finn, J.K. (eds). Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of

cephalopod species known to date. Volume 3. Octopods and Vampire Squids. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes. No 4. Vol. 3. Rome, FAO. 2016. 370p. 11 colour plates.

- ✓ Favier, A.(2003).le stress oxydant : intérêtconceptual et experimental dans la comprehension des mécanismes des maladies et potentiel thérapeutique. l'Actualitéchimique .11:108-115.
- ✓ Feng, Y.; Zhu, Z.; Chen, W.; Prabakaran, P.; Lin, K.; Dimitrov, D. S Biomedicines 2014, 2, 1–13.

G

- ✓ Garber, K. Nat. Biotechnol. 2005, 23, 399.
- ✓ Garcia-Davis Sara, Mauricio Munoz-Ochoa, Catalina Rivas-Moral and Ezequiel Viveros-Valdez, 2018. Biological Activities from the Marine Sponge *Suberites aurantiacus*. Journal of Biological Sciences, 18: 152-157.
- ✓ Goetz, G.; Yoshida, W. Y.; Scheuer, P. J. Tetrahedron. 1999, 55, 7739–7746.
- ✓ Gomez-vidal, J.A – Bouziane, H. KADIRI, M. 2009. Screening of antibacterialactivity in marine green and macroalgae from the coast of Morocco. In African Journal of Biotechnologie, vol.8, 2009, p. 1258-1562.

H

- ✓ Hamann, M.; Scheuer, P. J. Am. Chem. 1993, 10, 5825–5826.
- ✓ Hamann, M.T., Otto, C.S., Scheuer, P.J., Dunbar, D.C., 1996. Kahalalides: Bioactive Peptides from a Marine Mollusk *Elysia rufescens* and Its Algal Diet *Bryopsis* sp. Journal of Organic Chemistry 61, 6594-6600.
- ✓ Harris JR, Markl J. 1999. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. Micron 30: 597-623.
- ✓ Harris JR, Markl J. 2000. Keyhole limpet hemocyanin: molecular structure of apotent marine immunoactivator. EurUrol 37: 24-33.
- ✓ Haton C., (2005). Effets des rayonnements ionisants sur la structure de la fonction de la cellule épithéliale intestinale. Thèse de doctorat de l'université de Paris VI, France. 43.
- ✓ Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, O.M., Stensvag, K., 2002b. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis*

- (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology* 81, 94- 102.
- ✓ Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Therapeut.*, 96: 67– 202.
 - ✓ Hubert, F., Noel, T., Roch, P., 1996. A member of the arthropod defensin family from the edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry* 240, 302-306.
 - ✓ Hussain S.P., Hofseth, L.J., Harris, C.C., 2003. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3,276–285. Doi: 10.1038/nrc1046.

I

- ✓ Iijima, N., Tanimoto, N., Emoto, Y., Morita, Y., Uematsu, K., Murakami, T., Nakai, T., 2003. Purification and characterization of three isoforms of chrysopsin, a novel antimicrobial peptide in the gills of the red sea bream, *Chrysophrys major*. *FEBS Journal* 270, 675-686.
- ✓ ITIS, 2015. *Dromiaperonata* (Linnaeus, 1758). Integrated Taxonomic Information System (ITIS) http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=98307 Consulté le 2 août 2015.

J

- ✓ Jaspars, M., De Pascale D., Adersen J.H., Reyes F., Crawford A.D. et Ianora A., The marine biodiscovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2016. 96(1): p. 151-158.

K

- ✓ Karabay-Yavasoglu N U, Sukatar A, Ozdemir G & Horzum Z. (2002). Antimicrobial Activity of Volatile Components and Various Extracts of the Red Alga *Jania rubens*. *Phytotherapy research*, 21: 153-156.
- ✓ Kornprobst, J.-M., 2005. Substances naturelles d'origine marine: chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies. Tec & Doc Lavoisier, paris, 1834 pp.

L

- ✓ Land, M. F. (1996). Les yeux: structure et fonctionnement des mécanismes optiques. In *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie. Crustacés. Tome VII, Fascicule II. Généralités (suite) et Systématique.* J. Forest (Eds). Paris, Masson, 1002 p: 1-42.
- ✓ Martin, J. W. et G. E. Davis (2001). An updated classification of the recent Crustacea. *Science Series 39. Natural History Museum of Los Angeles County.* Los Angeles, CA: 124 p.
- ✓ Laport M., Santos O. et Muricy G., Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2009. 10(1): p. 86-105.
- ✓ Lecointre, G.; Le Guyader, H. *Belin.* 2001, 1, 543.
- ✓ López-Maciá, Á.; Jiménez, J. C.; Royo, M.; Giralt, E.; Albericio, F. J. *Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 11398–11201.

M

- ✓ Majhenic L, Kerget M.S., et Knez Z. (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. *Food Chemistry.* 104, 1258-1268.
- ✓ Maisuthisakul, P., M. Suttajit and R. Pongsawatmanit, 2007. Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food Chem.*, 100: 1409-1418.
- ✓ Marfak A., (2003). Radiolyse Gamma des flavonoïdes ; Etude de leur réactivité avec des radicaux issus des alcools: formation de depsides. Thèse de doctorat, Université de Limoges, France. 6-7-10.
- ✓ Markl J, Lieb B, Gebauer W, Altenhein B, Meissner U, Harris JR. 2001. Marine tumor vaccine carriers: structure of the molluscan hemocyanins KLH and HtH. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: R3-R9.
- ✓ Mayer A.M.S., Glaser K.B., Cuevas C., Jacobs R.S., Kem W., Little R.D., McIntosh J.M., Newman D.J., Potts B.C., Shuster D.E. [2010] The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmaceutical Sciences*, 31, 6, 255-265.

- ✓ Mehbub M.F., Lei J., Franco C. et Zhang W., Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine drugs*, 2014. 12(8): p. 4539-4577.
- ✓ Miljanich, G. P. *Curr. Med. Chem.* 2004, 11, 3029–3040.
- ✓ Mitta, G., Hubert, F., Noël, T., Roch, P., 1999a. Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilusgalloprovincialis*. *European Journal of Biochemistry* 265, 71-78.
- ✓ Mitta, G., Vandenbulcke, F., Roch, P., 2000c. Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters* 486, 185-190.
- ✓ Molinski T.F., Dalisay D.S., Lievens S.L. et Saludes J.P., Drug development from marine natural products. *Nature reviews Drug discovery*, 2009. 8(1): p. 69-85.
- ✓ Monod, T. et L. Laubier (1996). Les Crustacés dans la Biosphère. In *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie Crustacés. Tome VI I, Fascicule II. Généralités (suite) et Systématique*. J. Forest (Eds). Paris, Masson, 1002 p: 91-166.
- ✓ Mukohata, Y., Nakabayashi, S., & Higashida, M. (1978). Quercetin, an energy transfer inhibitor in photophosphorylation. *FEBS Lett*, 85: 215– 218.

N

- ✓ Nakamura, T., Furunaka, H., Miyata, T., Tokunaga, F., Muta, T., Iwanaga, S., Niwa, M., Takao, T., Shimonishi, Y., 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleuris tridentatus*). Isolation and chemical structure. *Journal of Biological Chemistry* 263, 16709-13713.

O

- ✓ Olivera, B. M.; Gray, W. R.; Zeikus, R.; McIntosh, J. M.; Varga, J.; Rivier, J.; De Santos, V.; Cruz, L. J. *Science*. 1985, 4732, 1338–1343.

P

- ✓ Paul V.J. et Puglisi M.P., Chemical mediation of interactions among marine organisms. *Natural Product Reports*, 2004. 21(1): p. 189-209. Pettit, G. R.;

- Singh, S. B.; Hogan, F.; Lloyd-Williams, P.; Herald, D. L.; Burkett, D. D.; Clewlow, P. J. J. *Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 5463–5465.
- ✓ Pawlik J.R., The chemical ecology of sponges on Caribbean reefs: natural products shape natural systems. *Bioscience*, 2011. 61(11): p.888-898.
 - ✓ Pettit, G. R.; Kamano, Y.; Herald, C. L.; Tuinman, A. A.; Boettner, F. E.; Kizu, H.; Schmidt, J. M.; Baczynskyj, L.; Tomer, K. B.; Bontems, R. J. *Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 6883–6885. Vicente, N. (2008). 100 & une limaces de mer: guide d'identification des Mollusques Opisthobranches d'Atlantique et de Méditerranée. Ed. GAP.
 - ✓ Puglisi M.P., Paul V.J. et Slattery M., Marine chemical ecology in benthic environments. *Natural product reports*, 2014. 31(11): p. 1510-1553.

R

- ✓ Rajasulochana P, Dhamotharan R, Krishnamoorthy P & Murugesan S. (2009). Antibacterial activity of the extracts of marine red and brown algae. *Journal of American*.
- ✓ Reguieg A., Sittler A.-P., Noël P., 2008-2013. *Dromia personata* (Linnaeus, 1758). in DORIS, Données d'Observations pour la reconnaissance et l'Identification de la faune et de la flore Subaquatique. CNEBS-FFESSM. Création le : 21/12/2008 ; Dernière modification le 22/09/2013 ; http://doris.ffessm.fr/fiche2.asp?fiche_numero=333 (Fiche publiée). Consulté le 27 février 2014.
- ✓ Reuter S., Gupta, S.C., Chaturvedi, M.M., Aggarwal, B.B., 2010. Oxidative stress, Inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1603–1616. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.
- ✓ Roch, P., Yang, Y., Toubiana, M., Aumelas, A., 2008. NMR structure of mussel mytilin, and antiviralantibacterial activities of derived synthetic peptides. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 227-238.

S

- ✓ Seo, J.-K., Crawford, J.M., Stone, K.L., Noga, E.J., 2005. Purification of a novel arthropod defensin from the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338, 1998-2004.
- ✓ Sharma, P. P.; González, V. L.; Kawauchi, G. Y.; Andrade, S. C. S.; Guzmán, A.; Collins, T. M.; Glover, E. A.; Harper, E. M.; Healy, J. M.; Mikkelsen, P. M. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2012, 65, 64–74.
- ✓ Shimizu H., (2004). Relationship between plasma glutathione levels and cardiovascular disease in a defined population: the Hisayama study. *Stroke*, 35 (9). 2072-2077.

T

- ✓ Ternon, E., Zarate L., Chenesseau S., Croué J., Dumollard R. Suzuki M.T., et Thomas O.P., Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Scientific Reports*, 2016. 6: p. 29474.
- ✓ Trabelsi D., Mengoni A., Aouani M.E., Bazzicalupo M. and Mhamdi R. 2010. Genetic diversity and salt tolerance of *Sinorhizobium* populations from two Tunisian soil. *Ann Microbiol.* 60: 541-547.
- ✓ Tsimogiannins, D.I., Oreopoulou, V. (2006). The contribution of flavonoid C-ring on DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3', 4'-hydroxy substituted members. *Innovat Food Sci Emerg Tech*, 7: 140-146.

V

- ✓ Vadon C., 1981. Les Brachyours des herbiers de Posidonies dans la région de Villefranche-sur-Mer: biologie, écologie et variations quantitatives des populations. Thèse de Doctorat de 3e cycle, Université P. et M. Curie-Paris 6, :1-227.

W

- ✓ Wassermann, A. M.; Lounkine, E.; Hoepfner, D.; Le Goff, G.; King, F. J.; Studer, C.; Peltier, J. M.; Grippo, M. L.; Prindle, V.; Tao, J. *Nat. Chem. Biol.* 2015, 11, 958–966.

Z

- ✓ Zariquiey Àlvarez R., 1946. Crustáceos Decápodos Mediterráneos. Instituto Español de Estudios Mediterráneos, Barcelona : 1-181.
- ✓ Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415, 389-395.

Résumé

Notre étude a été concernée d'évaluer deux espèces d'invertébrés marins *Callistoctopus smacropus* et *Dromia personata*, non encore exploitées pour des fins pharmacologiques. Dans un premier temps, une extraction par macération dans le Méthanol/Dichlorométhane a été réalisée. Les rendements de *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata* étaient de : 30.252%±9, 15.19%±7 respectivement. Dans un second temps l'objectif de notre étude est d'évaluer l'activité antibactérienne des extraits méthanolique des deux espèces d'invertébrés marins vis-à-vis des souches bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebseilla sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*), en utilisant la méthode de diffusion sur Mueller-Hinton. La meilleure activité antibactérienne a été enregistrée chez *Escherichia coli* avec une zone d'inhibition de 13mm de diamètre dans les extraits méthanoliques des deux espèces d'invertébrés marins *Callistoctopus macropus* et *Dromia personata*. Au final, le contenu en polyphénols et flavonoïdes dans les extrais des deux espèces d'invertébrés marins a été déterminé. Les résultats obtenus indiquent que *Callistoctopus macropus* a présenté une plus grande teneur en ces composés phénoliques (102.66±1.57mg EAG/g et 23.44±0.12mg EQ/g), suivi de *Dromia personata* avec des teneurs modérés (55.26±1.57mgEAG/g et 18.47±1.21EQ/g).Le test antioxydant a surtout été positif avec l'extrait méthanolique de *Callistoctopus macropus*, Avec une CI50= 0.0457mg/ml, suivi de celui de *Dromia personata*avec un CI50= 0.59 mg/ml.

Mots clés : *Callistoctopus macropus*, *Dromia personata*, activité antibactérienne, activité antioxydante, polyphénols.

summary

Our study was concerned to evaluate two species of marine invertebrates *Callistoctopus Macropus* and *Dromia personata*, not yet exploited for pharmacological or biochemical purposes. Initially, the maceration extraction in methanol/Dichloromethane was performed, yields of *Callistoctopus Macropus* and *Dromia personata* were: 30.252%±9, 15.19% ±7 respectively. Secondly, the objective of our study is to evaluate the antibacterial activity of the methanolic extracts of the two marine invertebrate species in relation to the Gram-positive and Gram-negative bacterial strains (*Escherichia coli*, *Klebseilla sp*, *Pseudomonas sp*, *Proteus sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*) using the dissemination method on Mueller-Hinton. The best antibacterial activity was recorded in *Escherichia coli* with an inhibition zone of 13mm diameter in the methanolic extracts of both marine invertebrate species *Callistoctopus Macropus* and *Dromia personata*. At the end, the polyphenol and flavonoid content in the extracts of the two marine invertebrate species was determine. The results indicated that *CallistoctopusMacropus* had a higher content of these phenolic compounds (102.66±1.57mg EAG/g and 23.44±0.12mg EQ/g), followed by *Dromia personata* with moderate levels (55.26mg±2.12EAG/g and 18.47±1.21EQ/g).The antioxidant test was mostly positive with the methanolic extract of *Callistoctopus Macropus*, with an IC50= 0.0457mg/ml, followed by *Dromia personata* with an IC50= 0.59 mg/ml.

Keywords: *Callistoctopus Macropus*, *Dromia personata*, antibacterial activity, antioxidant activity, polyphenols.

ملخص

، لم تستغل بعد *Callistoctopus macropus* و *Dromia personata* كانت دراستنا المعنية لتقييم نوعين من اللاقاريات البحرية ، في الميثانول / ثنائي كلورو الميثان maceration لأغراض الصيدلانية. في البداية ، تم الاستخلاص بواسطة على التوالي. ثانياً ، الهدف من دراستنا هو 30.252% ± 9 ، 15.19% ± 7 *Callistoctopus macropus* و *Dromia personata* كانت غلة تقييم النشاط المضاد للبكتيريا في المستخلصات الميثانولية لنوعين من اللاقاريات البحرية فيما يتعلق بالسلالات البكتيرية إيجابية الجرام وسالبة الجرام باستخدام (*Escherichia coli* ، *Klebseilla sp*، *Pseudomonas sp* ، *Proteus sp* ، *Bacillus sp* ، *Staphylococcus aureus*) الجرام تم تسجيل أفضل نشاط مضاد للجراثيم في الإشريكية القولونية ذات منطقة تثبيط قطرها 13 مم في المستخلصات Mueller-Hinton طريقة نشر في النهاية ، تم تحديد محتوى البوليفينول *Callistoctopus macropus* و *Dromia personata* الميثانولية لنوعين من اللاقاريات البحرية تحتوي *Callistoctopus macropus* والفلافونويد في مستخلصات النوعين من اللاقاريات البحرية. تشير النتائج التي تم الحصول عليها إلى أن مع *Dromia personata* ، تليها 102.66 ± 1.57 mg EAG / g و 23.44 ± 0.12 mg EQ / g من هذه المركبات الفينولية (1.57 ± 55.26 mgEAG / 1.21 ± 18.47 EQ / g) مع المستخلص (g) EQ / g) كان اختبار مضادات الأكسدة إيجابياً في الغالب مع المستخلص (g) EQ / g) مع Dromia personata ملغ / مل ، يليه اختبار IC 50 = 0.0457 للميثانولي لكالستوكتوب ماكروبوس ، مع ملغ / مل IC 50 = 0.59

الكلمات المفتاحية: *Callistoctopus macropus*, *Dromia personata*، نشاط مضاد للجراثيم ، نشاط مضاد للأكسدة، polyphenols.