

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences Biologiques
Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire
Département : Biologie

Intitulé

Recherche des molécules bioactives à partir d'un organisme marin (l'oursin *Paracentrotus lividus*)

Présenté par

Melle Zayneb Aouane
Melle Ikram Boucenna
Melle Nada Messiad

Devant le membre du jury

Dr. Ryadh Aissaoui	Président	Université de Guelma
Dr. Sandra Amri	Encadreur	Université de Guelma
Dr. Lamia Benhalima	Examinatrice	Université de Guelma

2019

*Nous remercions tout en premier lieu aux membres
du jury*

Monsieur Aissaoui Ryadh

Docteur à l'université de Guelma 8 Mai 1945, pour avoir accepté de présider le jury.

Madame Benhalima Lamia

Docteur à l'université de Guelma 8 Mai 1945, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Madame Sandra Amri

Docteur à l'université de Guelma 8 Mai 1945, Nous remercions d'une façon toute particulière de nous avoir accordé l'honneur de diriger ce travail. Qu'elle trouve ici, le témoignage de nous profonde reconnaissance.

*Enfin, merci à toute personne ayant contribué de près
ou de loin à la réalisation de ce travail.*

Dédicaces

Avec l'aide de Dieu le tout puissant, qui m'a donné la volonté de poursuivre le long chemin de mes études j'ai pu réaliser.

Je dédie ce modeste mémoire

Aux deux personnes les plus chères à mon cœur, mes parents, je ne saurais jamais vous exprimer ma profonde gratitude.

A ma sœur **Aya** et mon frère **Aymen**.

A ma chère camarade de travail **Nada** pour tous les beaux moments.

A tous les membres de **ma famille**.

A tous mes très **chers amis**.

A tous ceux qui **me connaissent**.

A tous ceux qui **me sont chers**.

« **B.Ikram** »

*Si tu veux tu peux
Louange à Dieu, le miséricordieux, sans Lui rien de tout Cela n'aurait pu être.*

Je dédie ce modeste travail

A mes **chers parents**

La source de tendresse et l'exemple du dévouement, qui n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que vous méritez pour tous l'amour et les sacrifices que vous n'avez cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte. Que Dieu vous protège et vous garde pour moi.

A ma sœur unique **Samer**

A mes frères **Salah-Eddine** et **Nacer-Eddine**

A la mémoire de **Mes Grands-Mères** et **Mes Grands-Pères**.

A ma chère partenaire **Ikram**.

A toute ma famille « **Messiad** » petits et grands.

Mes amis et camarades de promotion.

A toute personne qui m'aide durant tout le long de ce travail.

« **M. Nada** »

Liste des abréviations

Abréviation	signification
%	: Pour cent
(µg/ml)	: Microgramme/Gramme
°C	: Degré Celsius
µg / g	: Microgramme/gramme
ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide ribonucléique
ATCC	: American Type Culture Collection
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
DMSO	: Diméthyle Sulfoxyde.
DPPH	: 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
FeCl₃	: Chlorure ferrique
g	: gramme
H₂SO₄	: Acide sulfurique
HCl	: Acide chlorohydrique
I (%)	: Inhibition des radicaux libres en pourcentages
IC₅₀	: Concentration inhibitrice de 50
Mg	: Milligramme.
mg/ml	: Milligramme/millilitre
ml	: millilitre.
Mm	: Millimètre
mV	: millivolt
NH₄OH	: L'ammoniaque
NTU	: Nephelometrique turbidity unity
pH	: Potentiel d'hydrogène
µl	: Microlitre

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Position systématique de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	03
02	Noms vernaculaires de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i>	04
03	Principaux caractères de l'espèce <i>Escherichia coli</i>	12
04	Principaux caractères de l'espèce <i>Staphylococcus aureus</i>	13
05	Principaux caractères de l'espèce <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
06	Principaux caractères de l'espèce <i>Entérocooccus faecalis</i>	15
07	Principaux caractères de l'espèce <i>Klebsiella pneumoniae</i>	17
08	Principaux caractères de l'espèce <i>Salmonella typhimurium</i>	18
09	Classification biochimique des antibiotiques.....	19
10	Composition des milieux de culture.....	23
11	Caractérisation physicochimique du site de prélèvement.....	32
12	Aspects, couleurs et rendements des extraits des gonades de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	32
13	Caractérisation phytochimique des gonades de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	33
14	Tests phytochimiques des gonades de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i>	35
15	Activité antiradicalaire des gonades de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	37
16	Effet du DMSO à 2 % sur les souches de référence.....	38
17	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelques antibiotiques (moyenne ± écart type).....	39
18	Détermination de la résistance et de la sensibilité des souches de références vis à vis des antibiotiques.....	39
19	Effet des antibiotiques vis à vis des souches de référence.....	40
20	Diamètres des zones d'inhibition des souches de références vis-à-vis de l'extrait méthanoïque (moyenne ± écart type).....	43
21	Effet de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches de références.....	44
22	Diamètres des zones d'inhibition des souches de référence testées par l'extrait acétonique	45
23	Effet de l'extrait acétonique vis-à-vis des souches de références	47

Liste des figures

N°	Titre	Page
01	Distribution géographique de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	05
02	Morphologie de l'oursin.....	06
03	Morphologie interne de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	07
04	Gonade mâle et femelle de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	09
05	Mode d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne.....	21

Table des matières

	Page
Remerciements	
Dédicace	
Sommaire	
Résumé en français	
Résumé en anglais	
Résumé en arabe	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction	01
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1 Présentation de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	03
I.1.1. Position systématique	03
I.1.2. Synonymie et noms vernaculaires	04
I.1.3. Répartition géographique	04
I.1.4. Caractères morphologiques	05
I.1.4.1. Morphologie externe	05
I.1.4.2. Morphologie interne	06
I.1.5. Respiration	08
I.1.6. Régime alimentaire	08
I.1.7. Déplacement	08
I.1.8. Reproduction	09
I.1.9. Croissance et prédation	10
I.1.10. Intérêt économique	10
I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques	11
I.2.1. <i>Escherichia coli</i>	11
I.2.1.1. Classification	11
I.2.1.2. Habitat	11
I.2.1.3. Caractéristiques	11
I.2.1.4. Pouvoir pathogène	12
I.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
I.2.2.1. Classification	12
I.2.2.2. Habitat	12
I.2.2.3. Caractéristiques	13
I.2.2.4. Pouvoir pathogène	13
I.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13
I.2.3.1. Classification	13
I.2.3.2. Habitat	14
I.2.3.3. Caractéristiques	14
I.2.3.4. Pouvoir pathogène	14
I.2.4. <i>Entérocooccus faecalis</i>	14
I.2.4.1. Classification	14
I.2.4.2. Habitat	15

I.2.4.3. Caractéristiques.....	15
I.2.4.4. Pouvoir pathogène.....	15
I.2.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
I.2.5.1. Classification.....	16
I.2.5.2. Habitat.....	16
I.2.5.3. Caractéristiques.....	16
I.2.5.4. Pouvoir pathogène.....	17
I.2.6. <i>Salmonella typhimurium</i>	17
I.2.6.1. Classification.....	17
I.2.6.2. Caractéristiques.....	17
I.2.6.3. Habitat.....	18
I.2.6.4. Pouvoir pathogène.....	18
I.2.7. Antibiotiques.....	18
I.2.7.1. Définition d'un antibiotique.....	18
I.2.7.2. Classification des antibiotiques.....	18
I.2.7.3. Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques.....	19
I.2.7.4. Problèmes causés par les bactéries résistantes.....	20
I.2.7.5. Mode d'action des antibiotiques.....	20
Chapitre II : Matériels et Méthode	22
II.1. Récolte du matériel biologique.....	22
II.2. Préparation des extraits.....	22
II.3. Mesure des paramètres physicochimiques de l'eau de mer.....	22
II.4. Souches bactériennes.....	22
II.5. Milieux de culture utilisée.....	23
II.6. Tests phytochimiques.....	24
II.6.1. Tests préliminaires.....	24
II.6.1.1. Préparation de l'infusé à 10 %.....	24
II.6.1.2. Tanins.....	24
II.6.1.3. Anthocyanes.....	25
II.6.1.4. Leucoanthocyanes.....	25
II.6.2. Tests sur les métabolites secondaires.....	25
II.6.2.1. Préparation d'un décocté.....	25
II.6.2.2. Saponosides.....	25
II.6.2.3. Mucilages.....	26
II.6.2.4. Composés réducteurs.....	26
II.6.2.5. Alcaloïdes.....	26
II.6.2.6. Flavonoïdes.....	27
II.6.2.7. Dérivés anthracéniques.....	27
II.6.2.7.1. Extrait chloroformique.....	27
II.6.2.7.2. Anthraquinones libres.....	27
II.6.2.7.3. Anthraquinones combinées.....	28
II.6.3. Dosage des caroténoïdes.....	28
II.6.4. Activité anti-oxydante.....	29
II.7. Activité antibactérienne.....	29
II.7.1. Préparation des extraits.....	29
II.7.2. Antibiogramme.....	30
II.7.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	30

Chapitre III : Résultats et Discussion	32
III.1. Caractérisation physicochimiques du site de prélèvement	32
III.2. Caractérisation phytochimiques des gonades.....	32
III.2.1. Rendement.....	32
III.2.2. Test photochimique préliminaire.....	33
III.2.3. Dosage des caroténoïdes.....	34
III.2.4. Activité antioxydante	36
III.3. Activité antibactérienne.....	37
III.3.1. Etude de l'effet du DMSO sur les souches de référence.....	37
III.3.2. Etude de l'effet des antibiotiques vis à vis des souches de références.....	39
III.3.3. Etude de l'activité antibactérienne des extraits.....	42
III.3.3.1. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque.....	43
III.3.3.2. Etude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétonique.....	45
III.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	48
Conclusion et perspectives.....	49
Références bibliographiques.....	50

Notre travail porte sur l'étude de la phytochimie et l'évaluation de l'activité antibactérienne des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* vis à vis de 7 souches de référence : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.

Le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence des saponosides, mucilages, alcaloïdes, C-hétérosides et flavonoïdes, avec une absence des tanins, anthocyanes, leucoanthocyanes, composés réducteurs, anthraquinones libres et O-hétérosides.

L'extrait méthanoïque n'avait aucun pouvoir antibactérien vis-à-vis des souches de références, l'extrait acetonique a indiqué des zones d'inhibitions sur *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300. Toute fois pour *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 aucune zone d'inhibition n'a été retrouvée.

Mots clés : *Paracentrotus lividus*, souche de référence, activité antibactérienne, molécules bioactives.

عملنا يركز على دراسة المادة الكيميائية النباتية ومضادات البكتيريا للغدد التناسلية لقنفذ البحر *Paracentrotus lividus* على 7 سلالات مرجعية (الإشريكية القولونية، ATCC 25922 الزائفة الزنجارية ATCC 27853، المكورات العنقودية الذهبية ATCC 25923 المكورات المعوية البرازية، ATCC 29212 المكورات العنقودية الذهبية ATCC 4330 (MRSA)، الكليبيديلة الرئوية ATCC 2785، والسالمونيلا التيفية الفارية ATCC 14028)

كشف الفحص الكيميائي النباتي وجود flavonoïdes، C-hétéroside، mucilage، saponosides و alcaloïdes مع غياب anthocyanes، tanins، leucoanthocyanes، anthocyanes، composés réducteurs، O-hétérosides و anthraquinones libres.

النتائج المتحصل عليها أثبتت ان المستخلص الميثانولي لا يملك أي تأثير ضد بكتيري على هذه السلالات المرجعية، المستخلص الاسيتوني كان له تأثير على، الكليبيديلة الرئوية ATCC 2785 المكورات العنقودية الذهبية ATCC 25923 المكورات العنقودية الذهبية (MRSA) ATCC 4330 اما من اجل الإشريكية القولونية، ATCC 25922 الزائفة الزنجارية ATCC 27853 المكورات المعوية البرازية، ATCC 29212 والسالمونيلا التيفية الفارية ATCC 14028 لم يكن لديه أي تأثير.

كلمات البحث: *Paracentrotus lividus*، النشاط المضاد للبكتيريا، السلالات المرجعية، جزيئات حيوية.

Our work is around the study of the phytochemistry, and antibacterial activities of urchin *Paracentrotus lividus* gonads on 7 reference strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028).

The phytochemical screening permitted us to bring out the presence of the Saponosides, the Mucilages, the alcaloïdes, C-hétéroside and the flavonoïdes with lack of the tanins, anthocyanes, the leucoanthocyanes, anthraquinones libres, compound reducers and O-hétérosides.

The results obtained indicated that the methanolic extract had no antibacterial power vis-à-vis of these reference strains. The acetone extract indicated zones of inhibition on *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, for *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 no inhibition zone was found.

Key words: *Paracentrotus lividus*, references strain, antibacterial activity, bioactive molecules.

Introduction

L'oursin *Paracentrotus lividus* est un échinoïde comestible retrouvé en grande abondance sur les côtes méditerranéennes (Tejada *et al.*, 2013), ses gonades en font de lui un fruit de mer très appréciée dans divers pays (Powell *et al.*, 2014). En plus de sa valeur en tant que nourriture de luxe (Cook et Kelly, 2007), il s'est également révélé être un excellent bioindicateur de la pollution dans le milieu marin en raison de ses habitudes sédentaires et sa sensibilité connue aux polluants (Soualili *et al.*, 2008). Il a été utilisé dans plusieurs études en tant que bioindicateur de la pollution locale (Demnati *et al.*, 2002 ; Coteur *et al.*, 2003 ; Bayed *et al.*, 2005 ; Angioni *et al.*, 2014). Au cours des dernières années, il a acquis de l'importance en tant qu'organisme modèle dans les programmes de biosurveillance des écosystèmes marins (Fabbrocini *et al.*, 2010).

Récemment, les oursins ont attiré une attention particulière en raison de leur potentiel pharmacologique. Plusieurs études scientifiques ont démontré que les gonades, le liquide coelomique, les coquilles et les épines d'oursins offrent de nombreuses classes de composés présentant une haute valeur médicinale. Les gonades en particulier, sont une source riche en acides gras polyinsaturés et en polysaccharides actifs, de plus ils peuvent servir d'aliment fonctionnel pour lutter contre les maladies inflammatoires, le diabète (Pozharitskaya *et al.*, 2015), la fatigue (Shang *et al.*, 2014) et le cancer (Liu *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2011). De même, ils possèdent un effet antibactérien (Li *et al.*, 2015), antiviral (Giga *et al.*, 1985 ; Salas-Rojas *et al.*, 2014) et antioxydant (Urakova *et al.*, 2012 ; Pozharitskaya *et al.*, 2015).

Au cours des cinquante dernières années, les antibiotiques ont joué un rôle crucial dans la lutte contre de nombreuses maladies et leur développement a révolutionné le traitement des maladies infectieuses. Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois injustifiée de ces molécules, les bactéries sont devenues résistantes aux antibiotiques (Soussy, 2007). De ce fait, il est apparu important de disposer d'une approche multidimensionnelle en ayant recours à une approche biologique intégrée qui a été sélectionnée à l'aide d'une combinaison de paramètres afin de mettre en place une étude assez complète. Nous avons donc choisi de focaliser nos efforts sur deux principaux objectifs, d'une part faire la phytochimie des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* et d'autre part tester l'effet antibactérien vis-à-vis de 7 souches de références (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 par la méthode de diffusion.

Pour cela notre travail sera organisé en 3 chapitres :

- Le premier est purement théorique rassemble d'une part la présentation de l'oursin *Paracentrotus lividus* et d'autre part les souches bactériennes.
- Le second, est un chapitre expérimental consacré aux méthodes utilisées pour l'étude de l'activité antibactérienne et le screening phytochimique des gonades l'oursin *Paracentrotus lividus*.
- Le troisième chapitre mentionne les différents résultats obtenus au cours de notre étude sous forme des tableaux puis une discussion qui regroupera l'ensemble des résultats obtenus.

Enfin ce manuscrit sera clôturé par une conclusion et des perspectives pour l'ensemble du travail.

Synthèse
Bibliographique

I.1. Présentation de l'oursin *Paracentrotus lividus*

I.1.1. Position systématique

La classification systématique de l'oursin *Paracentrotus lividus* selon **Fischer et al. (1987)** est représentée dans le **tableau 01**.

Tableau 01 : Position systématique de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Classification		Descriptif
Embranchement	<i>Echinodermata</i>	Symétrie radiale d'ordre cinq. Squelette de plaques calcaires bien développé sous le derme. Présence d'un système aquifère auquel appartiennent les podia souvent visibles extérieurement.
Sous-embranchement	<i>Echinozoa</i>	<i>Echinodermes</i> non étoilés de forme globuleuse ou allongée. Ce groupe renferme les oursins et les concombres de mer.
Classe	<i>Echinoidea</i>	Ce sont les oursins. Forme globuleuse ou hémisphérique, squelette qui porte des piquants mobiles, des pédicellaires et des pieds ambulacraires. Pouvoir de régénération limité.
Sous-classe	<i>Euechinoidea</i>	Oursins plus ou moins sphériques, dits "oursins réguliers". Plaques ambulacraires composées. Bouche ventrale et anus dorsal.
Super ordre	<i>Echinacea</i>	10 plaques péristomiales.
Ordre	<i>Camarodonta</i>	Les épiphyses qui surmontent les demi-pyramides de la lanterne d'Aristote sont hautes et jointives.
Famille	<i>Parechinidae</i>	
Genre	<i>Paracentrotus</i>	
Espèce	<i>Paracentrotus lividus</i>	

I.1.2. Synonymies et noms vernaculaires

L'oursin *Paracentrotus lividus* a eu des noms scientifiques différents au cours des temps, mais qui ne sont pas valides à savoir (**Tortonese, 1965**) :

Echinus saxatilis (**Tiedemann, 1815**).

Echinus lividus (**Lamarck, 1816**).

Echinus vulgaris (**Blainville, 1825**).

Echinus purpureus (**Risso, 1826**).

Toxopneuste lividus (**Agassiz et Desor, 1846**).

Toxopneuste concavus (**Agassiz et Desor, 1846**).

Toxopneuste complanatus (**Agassiz et Desor, 1846**).

Toxopneuste lividus (**Heller, 1868**).

Strongylocentrus lividus (**Agassiz, 1872**).

Les noms vernaculaires de l'espèce les plus couramment utilisés dans les pays riverains de la méditerranée sont indiqués dans le **tableau 02** (**Davidson, 1981 ; Fischer et al., 1987**).

Tableau 02 : Noms vernaculaires de l'oursin *Pracentrotus lividus*.

Pays	Noms
Algérie	Quanfoud El- bahar
Tunisie	Quanfoud bahri
Liban	Toutia
France	Oursin commun, oursin de pierre et châtaigne de mer
Italie	Riccio di mare
Espagne	Erizo de mar
Malte	Rizza

I.1.3. Répartition géographique

L'oursin *Paracentrotus lividus*, est une espèce des mers épicontinentales à large répartition géographique, est connu dans l'Atlantique depuis l'Irlande jusqu'aux îles, Canaries, au Maroc et dans toute la méditerranée (**Fig.01**), où il occupe surtout l'étage infralittoral (**Grass et al., 1970**). On peut le trouver à des profondeurs allant jusqu'à – 80 mètres (**Guettaf, 1997**), mais il devient moins abondant dans la partie la plus orientale. Les plus fortes densités sont

observées entre 0 et 10 mètres (**Lawrence, 2013**). De nombreux auteurs s'accordent, sur le fait que, les plus gros individus se localisent en zone subtidale, alors que les plus petits sont en zone intertidale. Ils colonisent principalement les régions tempérées où les conditions thermiques océaniques fluctuent entre 10 et 15°C en hiver et 18 et 25°C en été (**Jacinto et al., 2013**).

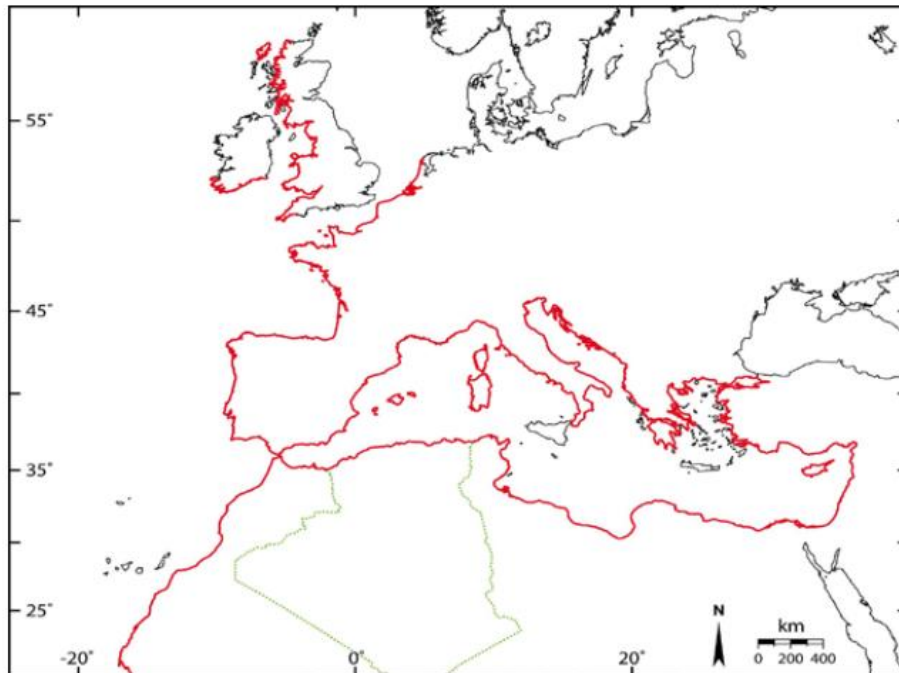


Figure 01 : Distribution géographique de l'oursin *Paracentrotus lividus* (**Soualili, 2008**).

I.1.4. Caractères morphologiques

I.1.4.1. Morphologie externe

Les oursins sont caractérisés par une symétrie pentaradiaire (**Fig.02**), 5 régions ambulacraires portant les pieds ambulacraires et 5 régions interambulacraires, au niveau desquelles les piquants sont mis en place. Chacune de ces régions est formée d'une double rangée squelettique de nature calcaire.

L'oursin possède un squelette calcaire continu formé de plaques soudées, c'est le test d'oursin. Il est arrondi, peu élevé, aplati en face ventrale et hérissé portant différents appendices soient les piquants, les podias et les pédicellaires. L'axe de symétrie du corps passe par la bouche et l'anus déterminant les pôles oraux où se trouve l'appareil masticateur appelée Lanterne d'Aristote (**Grosjean, 2001**).

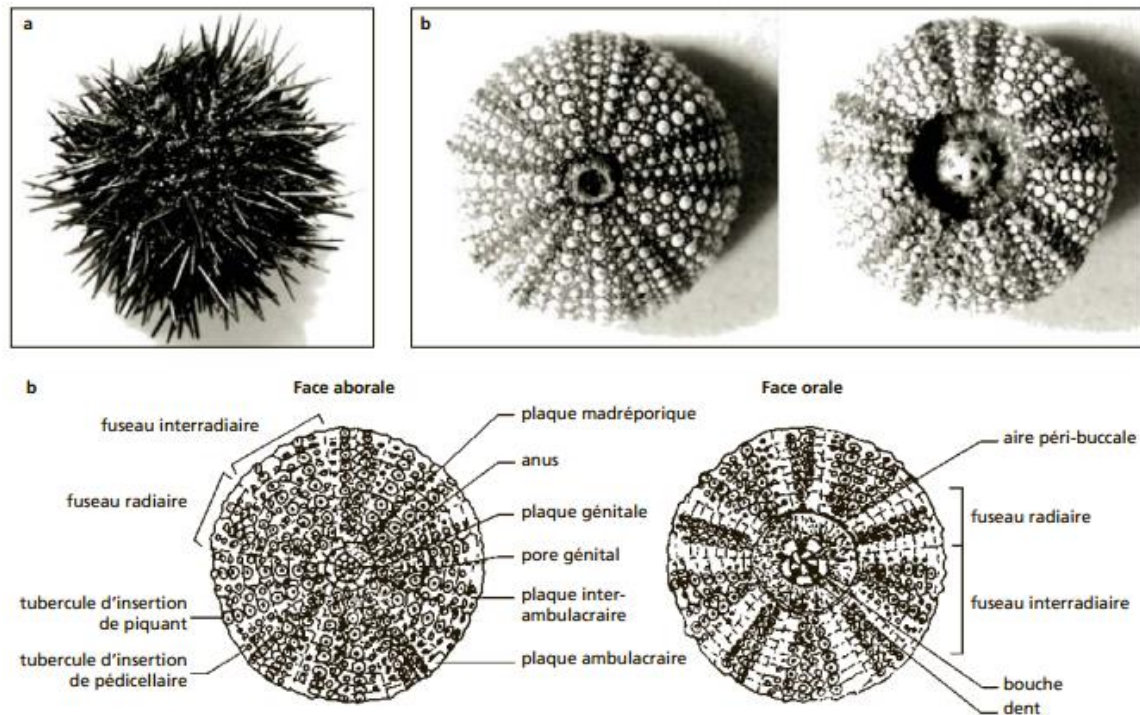


Figure 02 : Morphologie de l'oursin, a: morphologie externe, b: test dépourvu de piquants [1].

I.1.4.2. Morphologie interne

Comme tous les oursins réguliers, l'espèce *Paracentrotus lividus* présente un test protégeant une grande cavité cœlomique, qui loge en grande partie les organes digestifs et reproducteurs (**Fig.03**). Tous les autres systèmes internes : le système aquifère, le système sinusaire, le système nerveux et le système lacunaire ou sanguin sont repartis entre des cloisonnements au centre de cette cavité, celle-ci est remplie d'eau de mer où flottent des globules sanguins en suspension (**Tortonese, 1965**).

Le tube digestif fait suite de la bouche, il est entouré sur lui-même et débouchant à l'anus, il est attaché à la paroi du corps par des lames mésentériques. Dans tout son parcours, il n'offre pas la même consistance en vue du rôle physiologique que jouent ses différentes parties (**Harmelin et al., 1981**). Dans une des moitiés en effet s'accomplissent les phénomènes physiologiques de la digestion et le tube digestif y possède une épaisseur beaucoup plus grande que dans la seconde moitié où a lieu la respiration. Il existe un canal de communication se rendant directement de la première partie du tube digestif à la seconde ; ce canal qui relie ainsi la partie antérieure du tube digestif à la partie postérieure a reçu le nom de siphon (**Roule et al., 1889**).

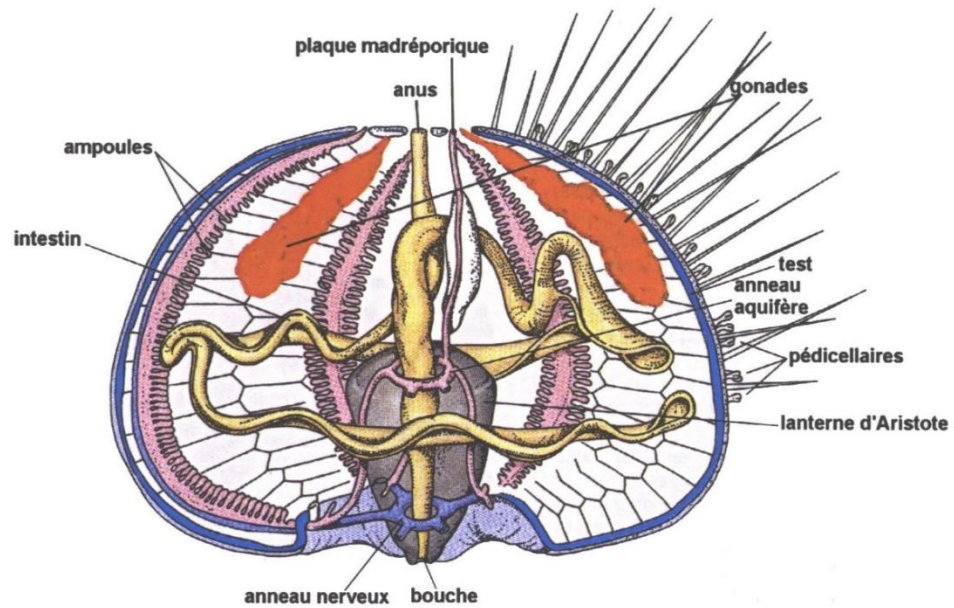


Figure 03 : Morphologie interne de l'oursin *Paracentrotus lividus* [2].

L'appareil ambulacraire est muni de vésicule de poli, envoie cinq canaux ambulacraires qui se divisent pour fournir une branche aux tentacules péribuccaux et se continue ensuite dans les zones ambulacraires sous la forme de canaux doubles. Sur le trajet de ces derniers sont insérés les ambulacres. Le canal de sable va déboucher au-dehors sous la plaque madréporique ; à ce canal est accolé un deuxième canal qui part de l'anneau sanguin et présente sur son trajet une dilatation nommée glande ovoïde dont le rôle est peu connu. Le système sanguin est constitué par deux vaisseaux logeant la paroi intestinale : l'un des deux se place au côté externe de la paroi intestinale, c'est le vaisseau marginal externe, le second qui est le vaisseau marginal interne suit ainsi que son nom l'indique, le côté interne. Le rôle physiologique de ces vaisseaux est d'absorber les produits digérés et les transmettre à l'anneau sanguin périoesophagien, pour cela l'un de ces vaisseaux remonte jusqu'à l'œsophage et y débouche dans l'anneau sanguin. Cet anneau envoie de petites ramifications dans les vésicules de poli ; de même l'anneau ambulacraire envoie des ramifications dans ces vésicules de sorte que le sang passe par là dans le système ambulacraire (**Roule et al., 1889**).

La morphologie des organes reproducteurs reflète une symétrie radiale, cinq gonades s'ouvrent dans les pores génitaux près de l'anus sont disposés radialement dans la cavité

coelomique le long des zones ambulacrales, ils commencent à se développer lorsque l'échinoïde est encore très petit, d'environ 4 à 6 mm (**Spirlet et al., 1994**).

I.1.5. Respiration

Les oursins réguliers vivent généralement dans les milieux agités très oxygénés, les échanges respiratoires se font très facilement à travers toutes les surfaces, certaines oranges semblent cependant avoir une fonction respiratoire plus importante. Il s'agit de certains pieds ambulacraires qui ne différencient pas des ventouses terminales, et qui de ce fait n'ont plus aucun rôle dans la fixation. De plus il existe dix branchies sur un cercle péribuccal qui correspondent à des extensions plus ou moins ramifiées d'une cavité localisée autour de la partie antérieure du tube digestif (**Barnabé, 1989**).

I.1.6. Régime alimentaire

Le régime alimentaire de l'oursin *Paracentrotus lividus* se révèle être très variable et suivant la région occupée, il est considéré comme relativement électrique dans le choix de sa nourriture (**Verlaque, 1987**). D'après **Zupi et Fresi (1984)** il peut avoir un comportement alimentaire assez variable, détritivore ou herbivore suivant les circonstances. Aussi **Régis (1986) et Verlaque (1987)**, ont démontré que l'oursin peut absorber à travers le test et les piquants de la matière organique dissoute et particulaire.

I.1.7. Déplacement

Les oursins réguliers apparaissent comme des animaux fixes et immobiles, en réalité ils sont parfaitement mobiles et sont aptes à effectuer des déplacements relativement importants, leurs mouvements sont relativement lents, les piquants de la face intérieure servent aussi au cours des déplacements. Chaque piquant est articulé sur le test par l'intermédiaire d'un tubercule rond et de muscles rayonnants tout autour de la base du piquant. Par contraction de ces muscles, l'extrémité du piquant peut décrire des trajectoires complexes dans l'espace. Dans certains cas, les oursins peuvent se déplacer passivement, ils s'adhèrent au substrat et se laissent entraîner par les courants en roulant sur l'extrémité de leurs piquants (**Barnabé, 1989**).

I.1.8. Reproduction

Tous les oursins réguliers sont gonochoriques, c'est-à-dire que chaque individu est mâle ou femelle dès la naissance et le restera durant toute la durée de sa vie (**Barnabé, 1989**). Les organes génitaux sont placés en dedans de la paroi du corps dans les espaces correspondant aux zones interambulacraires, il se compose de 5 glandes émettant chacune un conduit aboutissant aux pores des plaques génitales (**Roule et al., 1889**). Les 5 glandes génitales granuleuses sont d'un jaune orangé chez les femelles (**Fig.04**) et plus fin et d'un jaune pâle chez les mâles (**Fenaux, 1968**). La maturité est atteinte vers 3 ans, soit pour un diamètre moyen hors piquant de 30 mm (**Lawrence, 2013**).

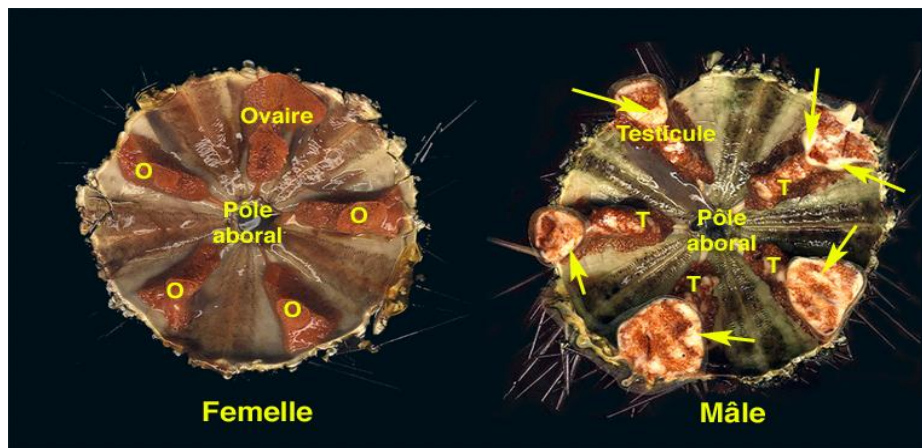


Figure 04 : Gonades mâles et femelles de l'oursin *Paracentrotus lividus* [3].

Le cycle de reproduction l'oursin *Paracentrotus lividus* est annuel, lorsque les gonades sont mûrs au début du printemps et dans certaines localités à l'automne (**Crapp et Willis, 1975**), la ponte est synchronisée et déclenchée par un signal externe tel que le changement de température (**Spirlet et al., 1998**). La variabilité du cycle de reproduction est due à de nombreux facteurs environnementaux tels que la qualité et l'abondance de la nourriture, la profondeur, la température, la photopériode et la périodicité lunaire (**Lawrence et Lane, 1982**). La fécondation est externe et produit un gamète dont le développement aboutit à une larve pélagique à symétrie bilatérale, à partir de laquelle se formera l'oursin. La larve appartient au méroplancton où elle vit pendant un à deux mois, jusqu'à ce que sa morphologie adulte lui permette de rejoindre son habitat benthique (**Fenaux, 1994**). Durant la phase larvaire le taux de mortalité est élevé et peut atteindre jusqu'à 20 % par jour (**Rumrill, 1990**). Ce fort taux de mortalité est compensé par une importante fécondité, une femelle peut pondre jusqu'à 5 million ovocytes par acte de ponte (**Luis et al., 2005**).

I.1.9. Croissance et prédation

Pendant les 4 premières années de sa vie, l'oursin *Paracentrotus lividus* croît d'environ 1 cm de diamètre par an ensuite, sa croissance ralentie, son diamètre peut atteindre environ 8 cm pour une longévité qui peut dépasser les 10 ans. La taille maximale et la longévité sont cependant très variables suivant les secteurs, même très proche géographiquement mais soumis à des conditions environnementales différentes. Les individus seraient plus grands et vivraient plus longtemps en Atlantique qu'en Méditerranée. Ses prédateurs sont nombreux et variés. Les poissons possédant une mâchoire puissante comme les balistes ou certains sparidés sont capables de broyer le test. Les invertébrés comme des mollusques gastéropodes et céphalopodes ou encore des échinodermes avec les étoiles de mer comptent parmi les principaux consommateurs d'oursins (**Allain, 1978**).

I.1.10. Intérêt économique

D'après les annuaires statistiques des pêches de la FAO il n'y aurait qu'en France que la pêche serait pratiquée. En effet, ces oursins sont pêchés dans quasiment tous les pays de la méditerranée (**Le Direac'H et al., 1987**), les quantités pêchées sont trop faibles et de manière générale la pêche ne s'opère pas de manière réellement professionnelle, ce qui explique que ces pays ne figurent pas dans les annuaires de la FAO ; de plus il n'aurait pas de rubrique « oursin » dans les bulletins statistiques du conseil général des pêches pour la méditerranée (**Ledireach, 1987**). Cette espèce est exploitée par excellence sur tout le pourtour de la Méditerranée, en Yougoslavie, en Algérie et au Maroc, ces oursins sont principalement consommés par les touristes. C'est aussi le cas en Tunisie où ils sont aussi appréciés dans les classes plus aisées de la population. Par contre en Turquie et en Espagne, ce sont plutôt les populations locales du bord de mer qui apprécie les oursins. C'est aussi le cas de la Grèce où la consommation des oursins est une ancienne tradition. En Italie la consommation est aussi bien régionale que touristique. Dans tous ces pays, la pêche est faite par des amateurs ou des non professionnels, il n'a pas de statut de pêcheur d'oursin à proprement parler à part pour quelques pêcheurs Espagnols (**Ballesteros et Garcia-Rubies, 1987**). En règle générale il n'a pas vraiment de réglementation concernant la pêche des oursins en particulier dans les pays méditerranéens (**Le Direac'H et al., 1987**).

I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques

I.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire (**Avril *et al.*, 2000**).

I.2.1.1. Classification

La classification de l'espèce *Escherichia coli* a été réalisée selon **Delarras *et al.* (2010)**.

- Domaine : *Eubacteria*.
- Phylum XII : *Proteobacteria*.
- Classe : *Gammproteobacteria*.
- Ordre : *Enterobacteriales*.
- Famille : *Enterobacteriaceae*.
- Genre : *Escherichia*.
- Espèce : *Escherichia coli*.

I.2.1.2. Habitat

Escherichia coli est un hôte normal de l'intestin, elle représente près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte, on peut la retrouver également au niveau des diverses muqueuses chez l'Homme et l'animal, sa présence dans l'environnement ou dans un produit alimentaire est un signe de contamination fécale (**Ferron, 1984**).

I.2.1.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Escherichia coli* sont représentés dans **le tableau 03**.

Tableau 03 : Principaux caractères de l'espèce *Escherichia coli* (Clave, 2012).

Morphologie	Bacille fin allongé aux extrémités arrondies de 2 - 4 µm de longueur et 0,4 - 0,6 µm de largeur.
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -.
Mobilité	Mobile à une ciliature péritriche.
Type respiratoire	Aérobie anaérobie facultatif.
Indole	+ (à 44°C).
Oxydase	-
Catalase	+
Température de croissance	Comprise entre 37-44°C.

I.2.1.4. Pouvoir pathogène

Certaines souches d'*Escherichia coli* sont responsables d'infections urinaires, intestinales, génitales, hépatobiliaires, de septicémies et de méningites néonatales [4].

I.2.2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est connue sous le nom de Staphylocoque doré, c'est la souche la plus fréquemment rencontrée en pathologie humaine et vétérinaire (Ferron, 1984).

I.2.2.1. Classification

La classification de l'espèce *Staphylococcus aureus* a été réalisée selon Delarras *et al.*, (2010).

- Domaine : *Eubacteria*
- Phylum XIII : Firmicutes
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Bacillales*
- Famille : *Staphylococcaceae*
- Genre : *Staphylococcus*
- Espèces : *Staphylococcus aureus*

I.2.2.2. Habitat

L'espèce *Staphylococcus aureus* est présente dans l'environnement, c'est une espèce qui peut vivre à l'état commensal sur la peau, les muqueuses de l'Homme et de l'animal dès la naissance (Wertheim *et al.*, 2005).

I.2.2.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Staphylococcus aureus* sont représentés dans le **tableau 04**.

Tableau 04 : Principaux caractères de l'espèce *Staphylococcus aureus* (Delarras *et al*, 2010).

Morphologie	Cocci sphérique de 0,5 - 1 µm de diamètre regroupé en amas
Coloration de Gram	Bactérie à Gram +
Mobilité	Immobile
Type respiratoire	Aérobie facultatif
Oxydase	+
Catalase	+
Coagulase	+
Température de croissance	Comprise entre 10-45°C

I.2.2.4. Pouvoir pathogène

L'espèce *Staphylococcus aureus* peut être responsable d'infections cutanées, de la sphère ORL, de septicémiques redoutables et d'infections nosocomiales (Delarras *et al.*, 2010).

I.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est connue depuis longtemps sous le nom de bacille pyocyanique ou agent du pus bleu des plaies surinfectées (Avril *et al.*, 2000).

I.2.3.1. Classification

La classification de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* a été réalisée selon Delarras *et al.*, (2010).

- Domaine : *Eubacteria*
- Phylum XII : *Protobacteria*
- Classe : *Gammaprotobacteria*
- Ordre : *Pseudomonadales*
- Famille : *Pseudomonadaceae*
- Genre : *Pseudomonas*
- Espèce : *Pseudomonas aeruginosa*.

I.2.3.2. Habitat

Pseudomonas aeruginosa est une espèce bactérienne ubiquitaire, cette bactérie a des exigences nutritives peu importantes, elle est capable de survivre dans l'environnement (eaux, surface, air et aliment) et particulièrement en milieux humides (CSHPF, 2000).

I.2.3.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* sont représentés dans le **tableau 05**.

Tableau 05 : Principaux caractères de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (Delarras *et al.*, 2010).

Morphologie	Bacille fin droit de 0,5 - 0,8µm de largeur et 1,5 - 3µm de longueur
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -
Mobilité	Mobiles, à ciliature polaire monotriche
Type respiratoire	Aérobies stricts
Oxydase	+
Catalase	+
Température de croissance	entre 30-43°C

I.2.3.4. Pouvoir pathogène

Pseudomonas aeruginosa possède toutes les caractéristiques d'un germe opportuniste, il est peu virulent pour les sujets en bonne santé mais très pathogène pour les sujets immunodéprimés. Il provoque de nombreuses infections tels que : les infections cutanées, oculaires, pulmonaires, urinaires, digestives ainsi que des septicémies (Lammaouer, 2002).

I.2.4. *Entérocooccus faecalis*

Entérocooccus faecalis fait partie de la flore intestinale normale de l'Homme et des animaux, il a été longtemps reconnu comme agent pathogène important (De Perio *et al.*, 2006).

I.2.4.1. Classification

La classification de l'espèce *Entérocooccus faecalis* a été réalisée selon Delarras *et al.*, (2010).

- Domaine : *Eubacteria*
- Phylum XII : *Firmicutes*
- Classe : *Bacilli*
- Ordre : *Lactobacillales*
- Famille : *Enterococcaceae*
- Genre : *Enterococcus*
- Espèce : *Entérocooccus faecalis*

I.2.4.2. Habitat

Entérocooccus faecalis fait partie de la flore digestive de l'homme et des animaux. Il peut coloniser la peau, notamment la région périnéale et le vagin. Cette espèce peut se rencontrer dans l'environnement (eaux usées, eau douce, sol) et contaminer les aliments [5].

I.2.4.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Entérocooccus faecalis* sont représentés dans le **tableau 06**.

Tableau 06 : Principaux caractères de l'espèce *Entérocooccus faecalis* (Paulsen *et al.*, 2003).

Morphologie	Cocci de 0,6 µm en moyenne, ovalaires, isolés, diplocoques, chainettes.
Coloration de Gram	Bactérie à Gram +.
Mobilité	Immobilés.
Type respiratoire	anaérobies facultatifs.
Oxydase	-
Catalase	-
Température de croissance	Entre 10 – 43 °C.

I.2.4.4. Pouvoir pathogène

Entérocooccus faecalis est un des causes majeures des infections nosocomiales, il fait partie des pathogènes nosocomiaux les plus communs, et il est responsable des infections urinaires ou intra-abdominales, d'abcès viscéraux, de pneumonies, de septicémies et de méningites (Jett *et al.*, 1994 ;Megran , 1992).

I.2.5. *Klebsiella pneumoniae*

Les espèces *Klebsiella pneumoniae* sont des bactéries en forme de bâtonnet et font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elles sont souvent encapsulées et forment des colonies mucoïdes (**Janda et Abbott, 2006 ; Abbott, 2007**).

I.2.5.1. Classification

La classification de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* a été réalisée selon **Delarras et al., (2010)**.

- Domaine : *Bactéria*.
- Phylum : *Proteobacteria*.
- Classe : *Gammaproteobacteria*.
- Ordre : *Entérobactériale*.
- Famille : *Enterobacteriaceae*.
- Genre : *Klebsiella*.
- Espèce : *Klebsiella pneumoniae*.

I.2.5.2. Habitat

Klebsiella pneumoniae est une espèce pathogène opportuniste (**Brisse, 2004**). Elle est fréquemment rencontrée dans la nature : eaux de surface, du sol, du bois et des végétaux (**El Fertas-Aissani et al, 2012**). Elle est présente dans le tube digestif de l'homme et des animaux (**Joly et Reynaud, 2002**).

I.2.5.3. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* sont représentés dans le **tableau 07**.

Tableau 07 : Principaux caractères de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* (Paulsen *et al.*, 2003).

Morphologie	Bacille de dimensions comparables à celles d' <i>Escherichia coli</i> (0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6,0 µm de longueur).
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -.
Mobilité	Immobilés.
Type respiratoire	anaérobies facultatifs.
Oxydase	+
Catalase	-
Température de croissance	37°C.

I.2.5.4. Pouvoir pathogène

Klebsiella pneumoniae est un agent classique et majeur d'infections nosocomiales en général et néonatales particulièrement (Boukadida *et al.*, 2002). Elle est l'une des principales espèces bactériennes impliquées dans les infections urinaires et de l'arbre respiratoire (Struve *et al.*, 2012).

I.2.6. *Salmonella typhimurium*

La *Salmonella* est une bactérie naturellement présente dans l'intestin des animaux en particulier chez les volailles et les porcs, elle vit également dans l'environnement (ICMSF, 1996).

I.2.6.1. Classification

La classification de l'espèce *Salmonella typhimurium* a été réalisée selon Scaria *et al.* (2008).

- *Domaine* : Bactéria.
- *Phylum* : Protéobactéries.
- *Classe* : Gammaprotéobactéria.
- *Ordre* : Enterobacterales.
- *Famille* : Enterobacteriaceae.
- *Genre* : *Salmonella*.
- *Espèce* : *Salmonella typhimurium*.

I.2.6.2. Caractéristiques

Les principaux caractères d'identification de l'espèce *Salmonella typhimurium* sont représentés dans le **tableau 08**.

Tableau 08 : Principaux caractères de l'espèce *Salmonella typhimurium* (Korsak et al., 2004).

Morphologie	Batonnets de 1- 6 µm de long sur 0,3 à 1 µm.
Coloration de Gram	Bactérie à Gram -
Mobilité	Mobiles.
Type respiratoire	anaérobies facultatifs.
Oxydase	-
Catalase	+
Température de croissance	Entre 35-37 °C.

I.2.6.3. Habitat

Le réservoir des salmonelles est très large, elles se retrouvent aussi bien chez les animaux à sang chaud, malades ou porteurs sains (oiseaux, mammifères dont l'homme et les rongeurs), que chez les animaux à sang froid (reptiles, poissons et insectes) (Humbert 1998).

I.2.6.4. Pouvoir pathogène

Salmonella typhimurium est un agent classique et majeur d'infections cutanées, urinaires, rénales, pulmonaires, digestives et de toxi-infections alimentaires [6].

I.2.7. antibiotiques

I.2.7.1. Définition d'un antibiotique

On appelle « Antibiotique » toute substance naturelle d'origine biologique (élaborée par un organisme vivant), substance chimique (produite par synthèse) ou substance semi synthétique (obtenue par modification chimique d'une molécule naturelle) qui peuvent inhiber ou détruire spécifiquement les bactéries sans être toxiques pour l'hôte (Pilly, 1975).

I.2.7.2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques n'est pas aisée, ils peuvent être regroupés selon leur nature, origine, mode d'action, spectre d'activité. À l'heure actuelle les antibiotiques sont regroupés selon leur nature biochimique **Tableau 09**.

Tableau 09 : Classification biochimique des antibiotiques (**Joffin et Leyral, 2006**).

Classe d'antibiotiques	Exemples
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine, Gentamicine
β -lactamines–Penicillines	Penicilline G, Ampicilline
β -lactamines-Cephems et Oxacephems	Cefalotine, Céfotaxime
β -lactamines- Monobactams	Aztréonam
Fosfomycine	Fosfomycine
Lincosamides	Clindamycine, Lincomycine
Macrolides	Erythromycine, Spiramycine
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne
Nitro-5- Imidazolés	Métronidazole
Phénicoles	Chloramphénicol, Ethiamphénicol
Polypeptides	Bacitracine, Colistine polymyxine
Quinolones	Acide naldixique
Sulfamides et sulfones	Sulfaméthoxazole triméthoprime
Streptogramines	Pristinamycine, Virginiamycine
Tetracyclines	Tetracycline minocycline
Vancomycines	Vancomycine

I.2.7.3. Principaux mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance bactérienne aux antibiotiques est apparue rapidement après leurs introductions dans le traitement des maladies infectieuses, les principaux mécanismes élucidés à ce jour sont (**Joffin et Leyral, 2006 ; Senez, 1968**) :

- ✓ **Perméabilité limitée à l'antibiotique** : les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants, le plus souvent aux antibiotiques hydrophobes et/ou de masses moléculaires élevées, car ces antibiotiques ne peuvent traverser la membrane externe de la paroi.
- ✓ **Production d'enzymes inactivant l'antibiotique** : certaines bactéries produisent des β -lactamases, enzymes présentes dans l'espace péri-plasmique de la bactérie. Elles permettent la destruction de l'antibiotique avant qu'ils puissent atteindre leurs cibles.

- ✓ **Résistance par transfert de gènes** : Elle est due à l'acquisition d'un plasmide ou d'un transposon codant pour des protéines conférant une résistance accrue à des familles d'antibiotiques, elle peut être transmissible entre bactéries d'espèces différentes.
- ✓ **Résistance par mutation chromosomique** : Elle est due à des mutations qui se produisent au hasard sur le chromosome bactérien, la mutation chromosomique ne s'exerce que vis-à-vis d'un seul antibiotique et n'est en principe pas transférable d'une espèce bactérienne à l'autre.
- ✓ **Modification de la cible ou absence de récepteur** : modification des PLP (protéines liant les pénicillines) sont des enzymes qui catalysent l'étape finale de la biosynthèse du peptidoglycane et qui est la cible des β -lactamines. La fixation des β -lactamines aux PLP empêcherait la synthèse du peptidoglycane.

I.2.7.4. Problèmes causés par les bactéries résistantes

L'utilisation massive des antibiotiques à provoquer la généralisation de la résistance bactérienne, ce qui peut se répercuter sur l'être humain comme suite [7].

- ✓ Propagation des infections nosocomiales.
- ✓ Augmentation des interventions chirurgicales.
- ✓ Utilisation d'antibiotiques plus coûteux.
- ✓ Échec du traitement et risque de complications.
- ✓ Prolongation de la durée de séjour en établissement hospitalier.
- ✓ Augmentation du taux de mortalité.

I.2.7.5. Mode d'action des antibiotiques

Les antibiotiques mettent en jeu des mécanismes d'action (**Fig.05**) d'une grande diversité en relation avec la variété de leur structure chimique et la pluralité des germes contre lesquels ils peuvent être appliqués (**Joffin et Leyral, 2006 ; Ferron, 1984**).

- ✓ **Action sur la paroi bactérienne** : L'antibiotique peut bloquer la synthèse de la paroi et la cellule bactérienne peut exploser sous l'effet de la pression osmotique interne.
- ✓ **Action sur la membrane cellulaire** : L'antibiotique peut agir sur les lipides membranaires, il désorganise la biocouche phospholipidique membranaire, ce qui entraîne les éléments hydrosolubles à l'extérieur de la cellule.
- ✓ **Action sur l'ADN** : L'antibiotique peut se fixer sur les brins de l'hélice de l'ADN et empêcher la réplication en bloquant la progression de l'ADN polymérase.

- ✓ **Action sur les ribosomes bactériens** : De nombreux antibiotiques utilisés en thérapeutique ont pour cible les ribosomes bactériens. L'antibiotique se fixe soit sur la petite ou la grosse sous-unité, ce qui inhiberait la synthèse des protéines.
- ✓ **Transcription** : L'ARN polymérase assure la transcription de l'ARNm nécessaire à la synthèse des protéines. Certains antibiotiques peuvent bloquer la transcription de l'ADN en se fixant sur l'ARN polymérase bactérienne.
- ✓ **Anti métabolite** : Certains antibiotiques peuvent agir comme des agents anti-métabolites, ils bloquent le fonctionnement des voies métaboliques en inhibant par compétition l'utilisation de métabolites par des enzymes clés.

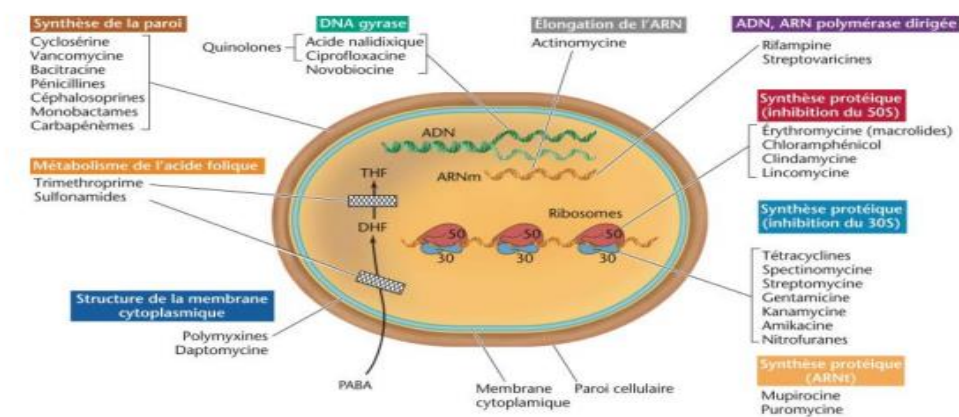


Figure 05 : Mode d'action des antibiotiques sur la cellule bactérienne (Singh et Barrett, 2006).

Matériel

Et

Méthode

II.1. Récolte du matériel biologique

Le matériel animal utilisé pour cette étude est l'oursin *Paracentrotus lividus*, ce dernier a été récolté au niveau du golfe d'Annaba (Gap de Garde), le 27 Février 2019. Les oursins sont transportés au laboratoire dans des bidons remplis d'eau de mer. Arrivée au laboratoire, les oursins récoltés ont été disséqués le jour même afin d'extraire les gonades.

II.2. Préparation des extraits

Afin de réaliser notre travail 2 extraits (méthanolique (S1), acétonique (S2)) ont été préparés à partir des gonades, l'extraction a été réalisée au laboratoire EMMAL (Eco-biologie des milieux marins et littoraux (Université de Badji Mokhtar - Annaba). Une macération été réalisée sous agitation durant 24 heures, les filtrats étaient évaporés au Rotavapeur afin d'éliminer les solvants d'extractions, puis lyophilisés et conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés (**Bragadeeswaran et al., 2013**).

II.3. Mesure des paramètres physicochimiques de l'eau de mer

Afin de caractériser notre site d'étude nous avons mesuré les paramètres physicochimiques de l'eau de mer de la station d'échantillonnage à l'aide d'un multiparamètre de terrain et d'un turbidimètre.

II.4. Souches bactériennes

Les germes utilisés sont des souches de référence ATCC (American Type Culture Collection), ils constituent d'excellents modèles pour la recherche de l'effet antibactérien des substances naturelles ou de synthèses. Les souches utilisés été fournis à partir du laboratoire EMMAL (Université de Badji Mokhtar - Annaba).

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- *Salmonella typhimurium* ATCC 14028.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300.

II.5. Milieux de culture utilisée

Suivant les méthodes employées et les souches étudiées, nous avons utilisé plusieurs milieux dont la composition est indiquée dans le **Tableau 10**.

Tableau 10 : Composition des milieux de culture (Joffin et Leyral, 2006).

Milieux	Composition des milieux de culture
Gélose nutritive	Extrait de viande.....1 g
	Extrait de levure.....2,5 g
	Peptone.....5 g
	Chlorure de sodium.....5 g
	Agar Agar.....15 g
	Eau distillée.....1000 ml
	pH = 7
Gélose Cétrimide	Peptone pancréatique de gélatine.....16,0 g
	Hydrolysate acide de caséine.....10,0 g
	Glycérol.....10,0 g
	Sulfate de potassium10,0 g
	Chlorure de magnésium.....1,4 g
	Cétrimide.....0,2 g
	Acide nalidixique.....15,0 mg
	Agar Agar bactériologique.....11,0 g
pH = 7,1.	
Gélose Hektoen	Peptone pepsique de viande.....12,0 g
	Extrait autolytique de levure..... 3,0 g
	Lactose..... 12,0 g
	Saccharose.....120 g
	Salicine.....2,0 g
	Sels biliaires..... 9,0 g
	Chlorure de sodium.....5,0 g
	Thiosulfate de sodium.....5,0 g
	Citrate ferrique ammoniacal.....1,5 g
	Bleu de bromothymol65 mg
	Fuchsine acide..... 40 mg
	Agar agar bactériologique..... 13,5 g
pH = 7,6.	

Gélose Chapman	Peptone.....	10 g
	Extrait de viande de bœuf	1g
	Chlorure de sodium	75 g
	Mannitol :.....	10 g
	Rouge de phénol	0,025 g
	Agar Agar	15 g
	Eau distillée	1000 ml
pH = 7,4		
Gélose Muller Hinton	Infusion de viande de bœuf (déshydratée)	300 g
	Hydrolysate de caséine	017,5 g
	Amidon	01,50 g
	Eau distillée	1000 ml
	Agar Agar	17,00 g
	pH = 7,5	
Bouillon nutritif	Extrait de viande	1 g
	Extrait de levure.....	2.5 g
	Peptone	5 g
	Chlorure de sodium.....	5 g
	Eau distillée.....	1000 ml
	pH = 7	
Bouillon Muller Hinton	Infusion de viande de bœuf (déshydratée)	300 g
	Hydrolysate de caséine	17,5 g
	Amidon	01,50 g
	Eau distillée	1000 ml
	pH = 7,5	

II.6. Tests phytochimiques

II.6.1. Tests préliminaires

II.6.1.1. Préparation de l'infusé à 10 %

Nous avons préparé un infusé à 10 %, pour cela nous avons placé 5 g de la gonade dans 50 ml d'eau bouillante, après 15 min filtrer et compléter à 50 ml.

II.6.1.2. Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques ayant la propriété de tanner la peau, c'est à dire de le rendre dur et imputrescible en se fixant sur les protéines (**Bos et al., 1996**). L'identification des tanins a été réalisée selon la méthode d'**Edeogal et al. (2005)**, dont les étapes sont comme suit :

Nous avons pris 5 ml de l'infusé auquel nous avons ajouté goutte à goutte 1 ml d'une solution de chlorure ferrique (FeCl_3) à 1 %. L'apparition d'une coloration verdâtre indique la présence des tanins catéchiques et celle bleue noirâtre indique la présence de tanins galliques.

II.6.1.3. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments hydrosolubles, responsables de la coloration rouge, violette ou bleue [8]. L'identification des anthocyanes a été réalisée selon la méthode d'**Edeogal et al. (2005)**, dont les étapes sont comme suit :

Leur recherche repose sur le changement de la couleur de l'infusé à 10 % avec le changement du pH. Diviser l'infusé sur 3 tubes (témoin, pH acide et pH basique) puis nous avons ajouté à l'infusé quelque gouttes d'HCl à 37 % et nous avons observé le changement de la couleur. Ensuite, nous avons rajouté quelques gouttes de NH_4OH et le changement de la couleur indique la présence des anthocyanes.

II.6.1.4. Leucoanthocyanes

Les leucoanthocyanes sont des pigments qui contiennent des principes actifs permettant de maintenir les vaisseaux sanguins en bon états [9]. L'identification des leucoanthocyanes a été réalisée selon la méthode d'**Edeogal et al. (2005)**, dont les étapes sont comme suit :

Nous avons mélangé 5 ml de l'infusé à 10 % avec 4 ml d'alcool chlorhydrique (éthanol / HCl à 37 % - 3V/V). Après un chauffage au bain marie à 50 °C pendant quelques minutes, l'apparition d'une couleur rouge cerise indique la présence des leuco-anthocyanes.

II.6.2. Tests sur les métabolites secondaires

II.6.2.1. Préparation d'un décocté

Nous avons préparé un décocté, pour cela nous avons placé 5 g des gonades dans 50 ml d'eau, porté à l'ébullition pendant 30 min. Après refroidissement, filtrer et réajuster le volume à 50 ml.

II.6.2.2. Saponosides

Les saponines ou saponosides sont une classe spécifique de métabolites secondaires, produits naturels (**Sparg et al., 2004**). Ce sont des substances tensio-actives, produits par les plantes supérieures, les animaux marins inférieurs et quelques bactéries (**Francis et al., 2002** ;

Das et al., 2012). L'identification des saponosides a été réalisée selon la méthode d'**Karumi et al. (2004)**, dont les étapes sont comme suit :

Leur détection est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml du décocté, puis la solution est fortement agitée et laissé pendant 20 min et la teneur en saponosides est évaluée selon la hauteur de la mousse : Pas de mousse = test négatif ; Mousse moins de 1cm = test faiblement positif ; Mousse de 1-2 cm = test positif ; Mousse plus de 2 cm = test très positif.

II.6.2.3. Mucilages

Les mucilages sont considérés comme un groupe d'hydrocolloïdes composés principalement de polysaccharides et de protéines qui interagissent fortement avec l'eau (**Malviya et al., 2011**). L'identification des mucilages a été réalisée selon la méthode d'**Karumi et al. (2004)**, dont les étapes sont comme suit :

Nous avons introduire 1ml du décocté dans un tube à essai et ajouté 5 ml d'éthanol absolu. Après une dizaine de minutes, l'obtention d'un précipité floconneux par mélange indique la présence de mucilage.

II.6.2.4. Composés réducteurs

Les composés réducteurs ou sucre réducteurs (glucides) sont des molécules organique caractérisées par la présence de chaînons carbonés porteuses de groupement hydroxyles et de fonction aldéhydes ou cétonique [10]. L'identification des composés réducteurs a été réalisée selon la méthode d'**Karumi et al. (2004)**, dont les étapes sont comme suit :

Leur détection consiste à traiter 1 ml du décocté avec 2 ml d'eau distillée et 20 gouttes de la liqueur de Fehling puis chauffer. Un test positif est révélé par la formation d'un précipité rouge-brique.

II.6.2.5. Alcaloïdes

Les alcaloïdes sont substances organiques d'origine naturelle contenant un ou plusieurs atomes d'azote avec un caractère basique de degré plus ou moins fort (**Cecon, 2006**) L'identification des alcaloïdes a été réalisée selon la méthode **Edeogal et al. (2005)**, dont les étapes sont comme suit :

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 heures de 5 g de gonades dans 25 ml de H₂SO₄ dilué à 10 % à température ambiante. Après filtration sur un papier lavé à l'eau distillée et de manière à obtenir environ 50 ml de filtrat. Introduire 1 ml du macéré dans un tube à essai, puis 5 gouttes de réactif de Mayer ont été ajoutés. La présence d'une turbidité ou d'un précipité blanc jaunâtre, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

II.6.2.6. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des pigments naturels le plus souvent de couleur jaune, ce sont des composés très répandus et plus de 3000 entre eux sont reconnus. Ces composés sont pour la plupart dotés d'activité thérapeutique [09]. L'identification des flavonoïdes a été réalisée selon la méthode **Edeogal et al. (2005)**, dont les étapes sont comme suit :

Macérer 1 g des gonades dans 10 ml d'acétate d'éthyle pendant 3 min, filtrer et procéder au teste suivant : prendre 1 ml du filtrat, le rendre basique par l'ajout du NH₄OH. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

II.6.2.7. Dérivés anthracéniques

Les hétérosides anthracéniques ou anthracénosides sont des hétérosides dont la génine est un polyphénol à noyau anthracénique, celui-ci pouvant exister à deux degrés différents d'oxydation doués de propriétés laxatives et purgatives [11].

II.6.2.7.1. Extrait chloroformique

Dans 1 g des gonades nous avons ajouté 10 ml de chloroforme puis chauffé pendant 3 minutes au bain-marie, ensuite filtrer à chaud et complété à 10 ml.

II.6.2.7.2. Anthraquinones libres

A 1 ml de l'extrait chloroformique nous avons ajouté 1 ml de NH₄OH (dilué à 1/2) puis agité. Une coloration plus et moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

II.6.2.7.3. Anthraquinones combinées

➤ **O- hétérosides** : A partir de l'extrait chloroformique, nous avons préparé un hydrolysate auquel il a été ajouté 10 ml d'eau, 1 ml d'HCl concentré puis maintenir le tube à essai au bain-marie bouillant pendant 15 minutes (laisser agir puis filtrer). 5 ml de l'hydrolysate sont agités avec 5 ml de chloroforme (veiller à bien mettre en contact les 2 phases en effectuant des allers-retours à la pipette sans provoquer d'émulsion) récupérer la phase organique puis ajouter 1 ml de NH₄OH (dilué à 1/2) et agiter. La présence d'anthraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins foncée. La réaction peut être plus poussée par addition à 5 ml de l'hydrolysate 3 à 4 gouttes de FeCl₃ à 10 % puis agitation avec 5 ml de chloroforme. En présence de produit d'oxydation des anthranols ou des anthrones, la coloration rouge est plus intense que précédemment.

➤ **C- hétérosides** : Nous avons repris la phase chloroformique par 10 ml d'eau et 1 ml de FeCl₃ à 10 %. Après ébullition au bain-marie pendant 30 min, nous avons ajouté à la phase chloroformique 5 ml de chloroforme et 1 ml de NH₄OH (dilué à 1/2). Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines C-hétérosides.

II.6.3. Dosage des caroténoïdes

L'extraction des caroténoïdes totaux contenus dans les gonades est estimée par la méthode de **Susan et Damodarane (1997)**. Les caroténoïdes totaux sont extraits par homogénéisation des gonades dans de l'acétone. Le surnageant coloré est récupéré et l'acétone est rajouté plusieurs fois au culot jusqu'à ce que l'extrait de l'acétone devient incolore. L'extrait d'acétone est ensuite filtré, le volume total de l'extrait est mesuré et sa densité optique est déterminée à une longueur d'onde de 455 nm. La concentration des caroténoïdes totaux est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$\text{Caroténoïdes } (\mu\text{g/g}) = (0,4 * D * V) / P$$

D : Densité optique.

V : Volume totale de l'extrait des caroténoïdes (ml).

P : Poids des gonades (g).

II.6.4. Activité anti-oxydante

L'Activité du balayage du radical DPPH a été mesurée selon le protocole utilisé par **Yik-Ling Chew *et al.* (2009)**. Cette méthode spectrophotométrique utilise le radical DPPH (2,2' diphenyl-1-picrylhydrazyl) de couleur violette comme réactif, qui vire au jaune, en présence de capteur de radicaux libres, et se réduit en 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazine. Les étapes sont comme suit :

Le DPPH est solubilisé dans le méthanol pour avoir une solution de 0,15 mM. Dans des tubes on introduit 100 µl de l'extrait (0,1mg/ml dans le méthanol) et on ajoute 2ml de la solution méthanolique au DPPH. Après agitation, les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture est effectuée par la mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 517 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition (I %) des radicaux libres en utilisant la formule suivante :

$$I \% = ((\text{Abs Echantillon} - \text{Abs Control négatif}) / \text{Abs Control négatif}) \times 100.$$

I % : Pourcentage d'inhibition (I %) des radicaux libres.

Abs Echantillon : correspond à l'absorbance de l'échantillon.

Abs Control négatif : correspond à l'absorbance du contrôle.

Pour mieux caractériser le pouvoir antiradicalaire, deux autres paramètres sont calculés (**Prakash *et al.*, 2007**). D'une part, **IC₅₀** ou concentration inhibitrice de 50 %, c'est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50 % de radical DPPH. Les **IC₅₀** sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des fractions testées. D'autre part, **EC₅₀** qui prend en considération la concentration de DPPH dans le milieu réactionnel **EC₅₀ = (IC₅₀/mg de DPPH/ml)**.

II.7. Activité antibactérienne

II.7.1. Préparation des extraits

Les 2 extraits secs préparés au paravent (méthanolique (S1), acétonique (S2)) sont repris dans du DMSO à raison de 200 mg/ ml.

II.7.2. Antibiogramme

L'activité antibactérienne des 2 extraits a été évaluée par la méthode de diffusion en milieu gélosé telle que décrite par **Bauer *et al.* (1966)** et reprise par **Barry *et al.* (1985)**. A partir de colonies jeunes de 18 à 24 heures, une suspension bactérienne est réalisée dans de l'eau physiologique stérile à 0,9 % de NaCl est préparée pour chaque souche bactérienne. La turbidité de cette suspension est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée (1/100) afin d'obtenir un inoculum de 10^6 bactéries/ml (pour l'espèce *Staphylococcus aureus* l'inoculum est dilué à 1/10). Cet inoculum est étalé à l'aide d'un écouvillon sur boîtes Pétri contenant de la gélose Mueller-Hinton. L'extrait est déposé à 40, 80 et 120 mg sur des puits réalisés avec des billes stériles avant solidification de la gélose. Les boîtes Pétri sont d'abord laissées pendant 2 heures à 4 °C pour une pré-diffusion de l'extrait avant d'être incubées dans une étuve à 37 °C pendant 24 heures. L'évaluation de l'inhibition est réalisée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour de chaque puits. Nous avons utilisé un témoin négatif (DMSO à 2 %) et un témoin positif (disques d'antibiotiques). Le choix des antibiotiques a été réalisé selon la disponibilité du laboratoire.

II.7.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

La détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB) a été réalisée selon la méthode décrite par **Bolou *et al.* (2010)**. La CMI est préparée selon la méthode de double dilution, une gamme de concentrations stérile allant de 0 à 200 mg/ml a été préparée pour chaque extrait, on prépare également pour chaque souche bactérienne un inoculum dont la turbidité est ajustée à 0,5 Mc Farland puis diluée (1/100) afin d'obtenir un inoculum de 10^6 bactéries /ml dans du bouillon Mueller-Hinton (pour l'espèce *Staphylococcus aureus* l'inoculum est dilué à 1/10). Ensuite on ajoute dans des multipuits, 1 ml de chaque concentration et 1 ml d'inoculum bactérien, les tubes sont mélangés puis incubés à 37 °C pendant 24 heures. Après incubation, on examine la croissance bactérienne dans chaque puits qui se traduit par une turbidité. La CMI d'un extrait vis-à-vis d'une souche donnée sera la plus petite concentration ne montrant aucune croissance visible. Pour déterminer la CMB, on réalise 24 heures plus tôt, un témoin bactéricide en ensemençant par stries une gélose nutritive en boîte Pétri, la solution mère et les dilutions 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} de l'inoculum de départ correspondant respectivement à 100 %, 10 %, 1 %, 0,1 % et 0,01 % de survivants. Après la lecture de la CMI on effectue des repiquages en stries en gélose nutritive des puits sans croissance visible. Ces repiquages sont ensuite incubés à 37

°C pendant 24 heures, après on compare les stries au témoin bactéricide. La CMB sera la plus petite concentration dont le repiquage montre une croissance de germe inférieure ou égale à 0,01 % de survivants.

Résultats

Et

Discussion

III.1. Caractérisation physicochimique du site de prélèvement

La caractérisation physicochimique de l'eau du site de prélèvement est représentée dans le **tableau 11**. Les paramètres physicochimiques enregistrés dans les eaux côtières du golfe d'Annaba semblent être favorables au développement de l'oursin *Paracentrotus lividus*, ce dernier colonise principalement les régions tempérées ou les conditions thermiques fluctuent entre 10 et 25 °C (De Casamajor, 2004), un pH compris entre 7,9 - 8,3. Une salinité comprise entre 34 - 39 ‰ (Aminot et Kérouvel, 2004), une quantité d'oxygène dissoute comprise entre 7- 9 mg/L (Davis, 1975) et une turbidité comprise entre 0,3 - 3 NTU (Vangriesheim *et al.*, 1992).

Tableau 11 : Caractérisation physicochimique du site de prélèvement.

Température (C°)	16
pH	8,02
Salinité (‰)	34,22
Oxygène dissous (mg/L)	07,2
Turbidité (NTU)	0,82

III.2. Caractérisation phytochimique des gonades

III.2.1. Rendement

Chaque extrait a été caractérisé par sa couleur et son rendement par rapport à la chaire des gonades, les résultats obtenus après une macération réalisée sous agitation pendant 24 heures et une lyophilisation sont mentionnés dans le **tableau 12**. En matière de rendement en extraits secs, nous avons constaté que les gonades ont présenté un rendement assez élevé de l'ordre de 12 % pour l'extrait méthanoïque et 6,2 % pour l'extrait acétonique.

Tableau 12 : Aspects, couleurs et rendements des extraits des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Extrait	Couleur	Rendement (%)
Méthanoïque	Orangé foncé	12
Acétonique	Orangé clair	6,2

Les rendements varient en fonction de l'organe utilisé et la période de prélèvement de l'oursin, les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* ont présenté un rendement en extraits assez élevé de l'ordre de 12 % pour l'extrait méthanoïque et de l'ordre de 6,2 % pour l'extrait acétonique par rapport au 100 g de gonades. Il est difficile de comparer les résultats avec ceux de la bibliographie, le rendement n'est pas relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée.

III.2.2. Test photochimique préliminaire

Le résultat de l'étude phytochimique effectué sur les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* a permis de constater la présence de cinq groupes chimiques (**Tableau 13** et **14**).

Tableau 13 : Caractérisation phytochimique des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Tests phytochimiques	Résultats
Tanins catéchiques	-
Tanins galliques	-
Anthocyanes	-
Leucoanthocyanes	-
Saponosides	Test faiblement positif
Mucilages	+
Composés réducteurs	-
Alcaloïdes	+
Anthraquinones libres	-
O-hétérosides	-
C-hétérosides	+
Flavonoïdes	+
(+) : Présence / (-) : Absence	


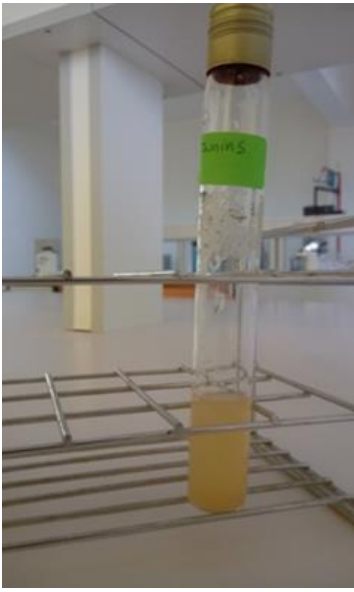

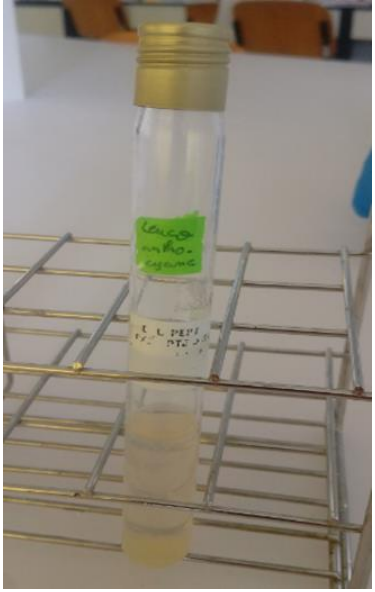
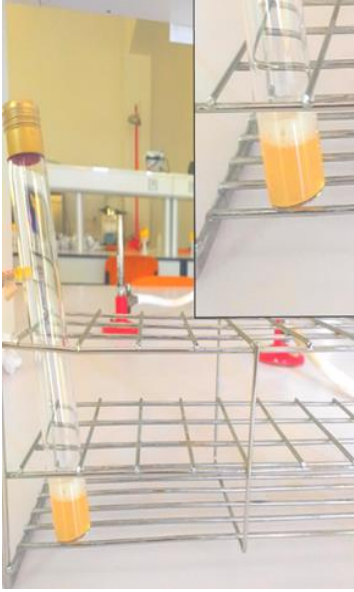

Le screening phytochimique nous a permis de mettre en évidence la présence de métabolites secondaires au niveau des gonades d'oursin *Paracentrotus lividus*. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation et de turbidité ou un changement de couleur spécifique. Les résultats révèlent la présence des saponosides, mucilages, alcaloïdes, C-hétérosides et de flavonoïdes, alors que les tanins, anthocyanes, O-hétérosides, Anthraquinones libres, leucoanthocyanes et les composés réducteurs n'étaient pas présents.

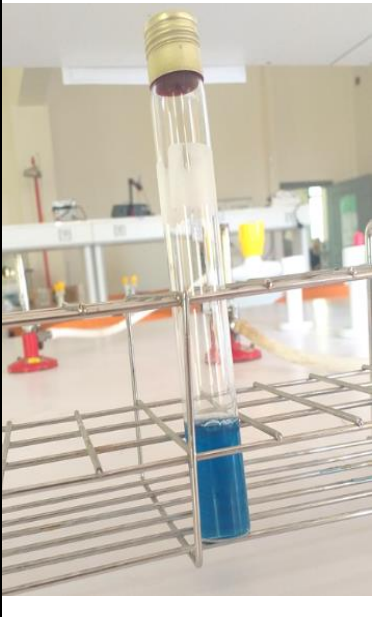


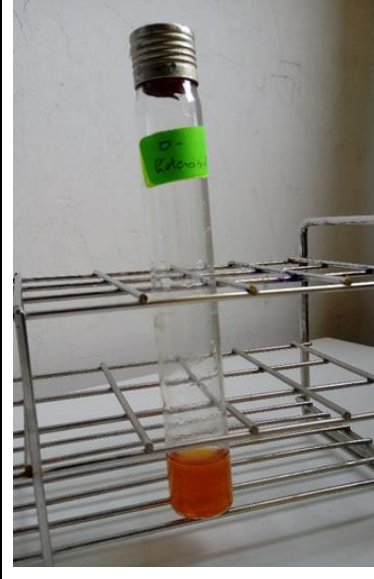


Les gonades de l'oursin sont riches en composés bioactifs précieux, tels que les acides gras polyinsaturés (**Robinson et Blair, 2008**), caroténoïdes (**Matsuno et Tsushima, 2001**), les phospholipides (**Makarov et Hiltunen, 2012**) et les fucanes sulfatés (**Biermann et Mourão, 2002**). De même, plusieurs études scientifiques ont démontré que les gonades, le liquide coelomique, les tests et les épines des oursins offrent de nombreuses classes de composés à haute valeur médicinale. Les gonades en particulier, sont riches en acides gras polyinsaturés et les polysaccharides actifs (**Shikov et al., 2018**).

III.2.3. Dosage des caroténoïdes

Le résultat du dosage des caroténoïdes a indiqué que les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* présente une valeur de l'ordre de $6,91 \pm 0,41 \mu\text{g} / \text{g}$ de tissu de caroténoïdes. Des études menées par **Marimuthu et al. (2015)**, ont démontré que les caroténoïdes des ovaires de l'oursin noir *Diadema setosum* présente une excellente propriété antimicrobienne contre une grande variété de bactéries pathogènes.

Tableau 14 : Tests phytochimiques des gonades de l'oursin *Pracentrotus lividus*.

		
<p>Témoin</p>	<p>Tanins (négatif)</p>	<p>Anthocyanes (négatif)</p>
		
<p>Leuco anthocyanes (négatif)</p>	<p>Saponosides (positif)</p>	<p>Mucilages (positif)</p>

		
<p>Composés réducteurs (négatif)</p>	<p>Alcaloïdes (positif)</p>	<p>Anthraquinones libres (négatif)</p>
		
<p>O-hétérosides (négatif)</p>	<p>C-hétérosides (positif)</p>	<p>Flavonoïdes (positif)</p>

III.2.4. Activité antioxydante

Le profil de l'activité antiradicalaire obtenue révèle que les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* possèdent une activité antiradicalaire appréciable, le résultat obtenu est représenté dans le **tableau 15**.

Tableau 15 : Activité antiradicalaire des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Gonades	I (%)	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/µg DPPH)
	33,33	29,52	1,23

Des études menées par **Qin et al. (2011)** ont démontré que les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* possèdent une activité antioxydante significative, aussi les travaux d'**Amri et al. (2017)** ont indiqué une activité antioxydante importante à la saison printanière. De même, l'oursin *Paracentrotus miliaris* avait indiqué une capacité antioxydante appréciable (**Powell et al., 2014**). Cela est dû à la présence de caroténoïdes (**Lebedev et al., 2001**), de β -carotène et de certaines xanthophylles, qui ont une forte activité de provitamine A et peuvent être utilisés pour prévenir le développement des tumeurs (**Matsuno et Tsushima, 2001**). Les pigments d'oursins ont suscité un intérêt comme source prometteur pour le développement des médicaments qui pourraient être utiles en pratique clinique pour traitement de diverses maladies humaines (**Shikov et al., 2018**).

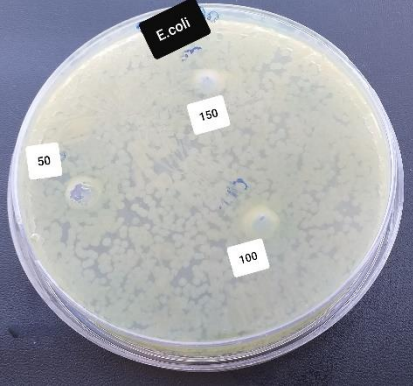

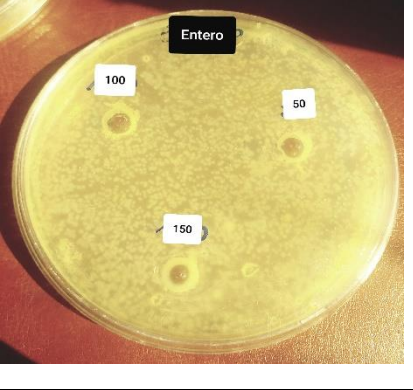
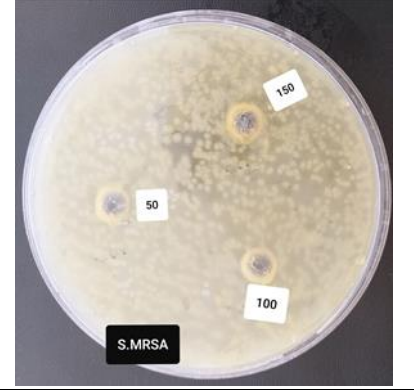
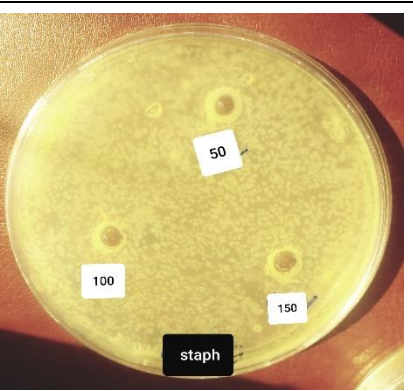
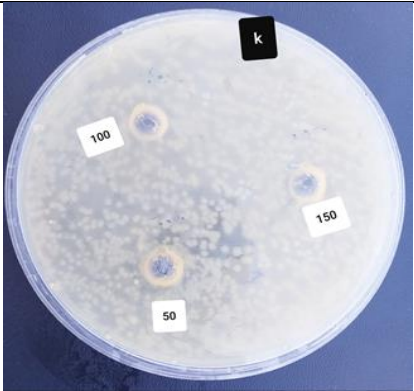
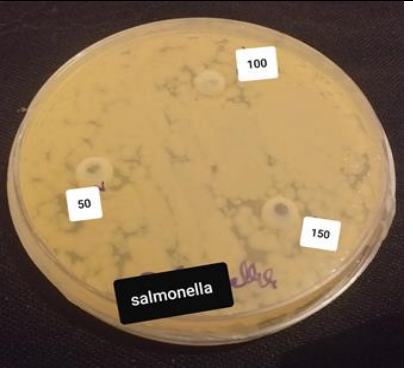
De plus, il a été démontré que les PHNQ (Polyhydroxylated Naphthoquinone) issus des tests des oursins avaient une capacité antioxydante efficace dans la peroxydation lipidiques (**Kuwahara et al., 2009**). Les tests et les épines sont effectivement des déchets une fois que les gonades ont été retirées, ces tests pourraient être utilisés pour remplacer les antioxydants artificiels actuellement utilisés dans les produits alimentaires tels que l'hydroxytoluène butylé (BHT) et l'hydroxyanisole butylé (BHA) (**Powell et al., 2014**).

III.3. Activité antibactérienne

III.3.1. Étude de l'effet du DMSO sur les souches de référence

Afin de soumettre les extraits aux essais biologiques, la toxicité du solvant peut également être critique, car même en traces, le solvant ne devrait pas empêcher le procédé biologique (**Yrjöen, 2004**), pour cela le DMSO à 2 % a été testé comme solvant, le résultat obtenu indique que le DMSO à 2 % est approprié et ne présente aucun effet sur la croissance normale des souches microbiennes (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Effet du DMSO à 2 % sur les souches de référence.

	
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</p>
	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300</p>
	
<p><i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212</p>	<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27853</p>
	
<p><i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028</p>	

III.3.2. Étude de l'effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références

Or mis le DMSO, la sensibilité des souches aux antibiotiques a été testé avant de soumettre les souches bactériennes aux essais biologiques, la résistance bactérienne peut également être critique. Pour cela 6 antibiotiques ont été testés comme témoin positif, les résultats obtenus (**Tableau 17 et 18**) indiquent que les 7 souches de références peuvent être sensibles ou résistantes aux antibiotiques. Les photos prises sont représentées dans le **tableau 19**.

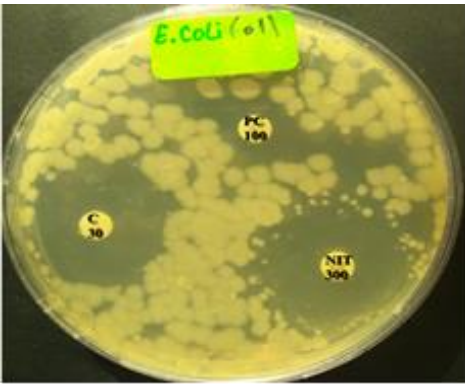
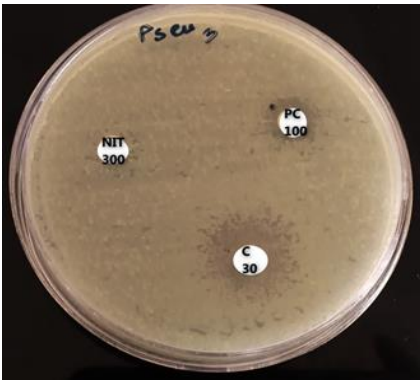
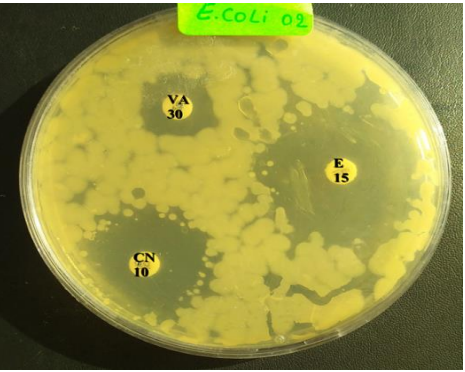
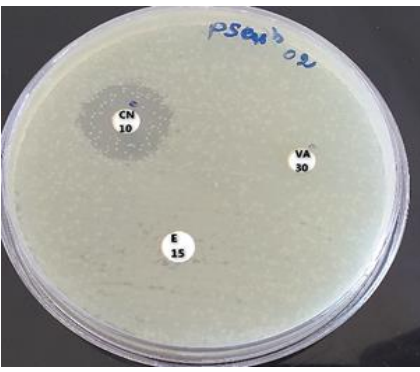
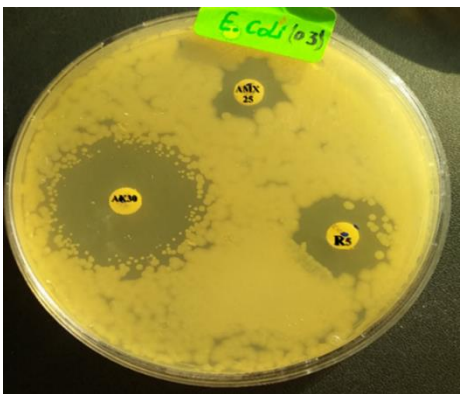

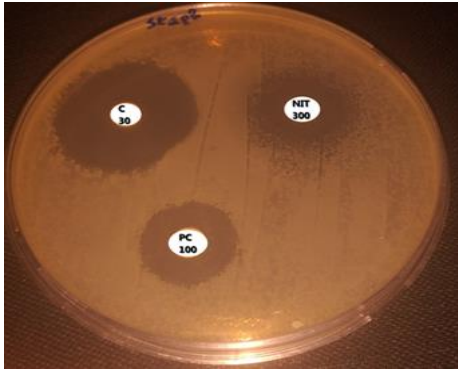
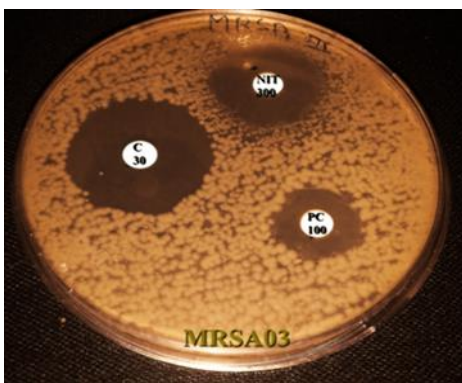
Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelques antibiotiques (moyenne ± écart type).

	<i>E. coli</i>	<i>Ps.aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus (MRSA)</i>
Chlorophénicol (30 µg)	28 ± 1,41	17,17±2,14	29,67±0,52	35,83 ±0,98	26,33 ± 2,07	30 ± 1,26	29,83±0,41
Amoxicilline (50 µg)	14 ± 0,63	20,16 ± 1,16	21,16±0,75	13,5 ± 1,37	19,66± 0,51	19,5 ± ,054	18,16±1,72
Amikacine (30 µg)	29,5 ±0,54	26,5 ± 1,37	25,66±0,51	29 ± 0,89	30,5 ± 1,04	22,33±2,87	19,33±0,51
Erythromycine (15 µg)	32 ± 1,41	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18 ± 1,41	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	30,16±0,75
Gentamycine (10 µg)	25,66±1,21	19,66 ± 0,51	17,66±1,03	25,33 ±0,51	25,33 ± 1,03	17,5 ± 1,37	17 ± 0,00
Vancomycine (30 µg)	15,16±0,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	13,83 ±0,75	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	18,16±0,40

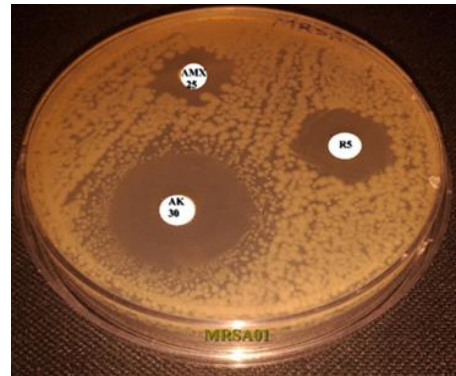
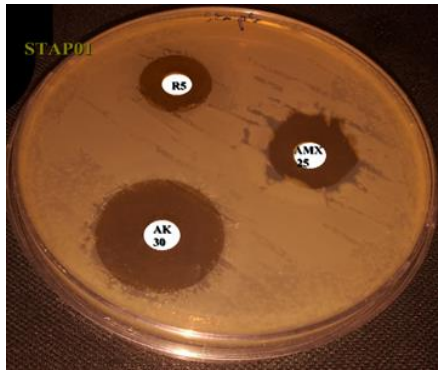
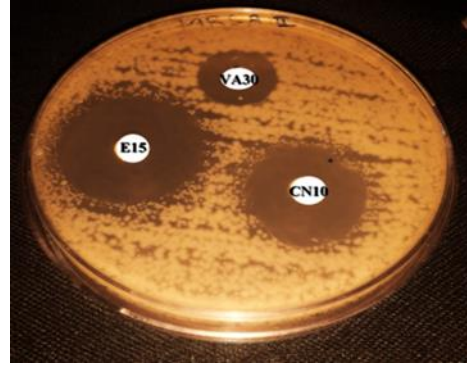
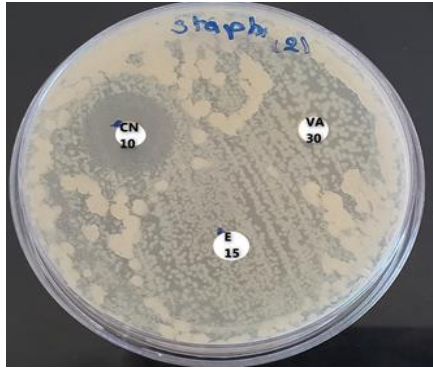
Tableau 18 : Détermination de la résistance et de la sensibilité des souches de références vis-à-vis des antibiotiques.

	<i>E. coli</i>	<i>Ps. Aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumonia</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus (MRSA)</i>
S : Sensible							
I : Intermédiaire							
R : Résistante							
Chlorophénicol (30 µg)	S	R	S	S	S	S	S
Amoxicilline (50 µg)	I	I	S	R	I	I	I
Amikacine (30 µg)	S	S	S	S	S	S	S
Erythromycine (15 µg)	S	R	R	I	R	R	S
Gentamycine (10 µg)	S	S	S	S	S	S	S
Vancomycine (30 µg)	R	R	R	R	R	R	S

Tableau 19 : Effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.

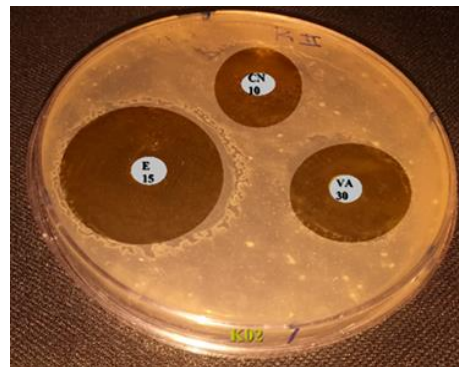
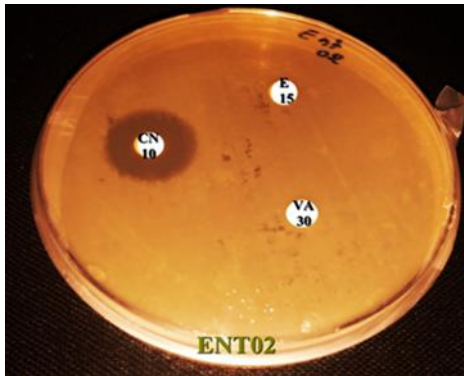
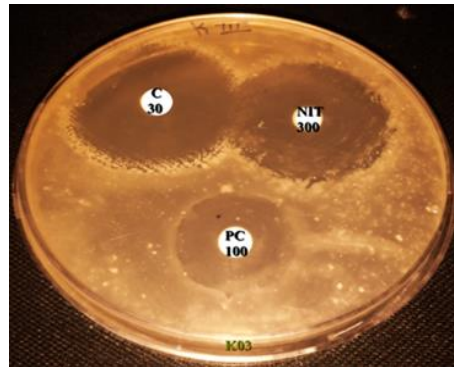
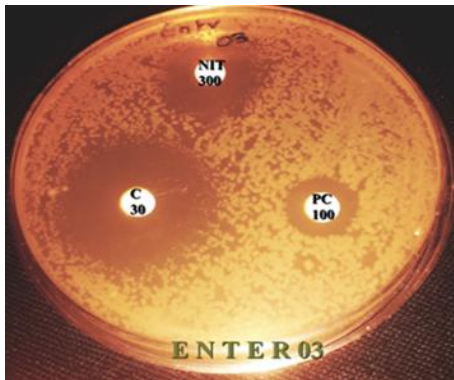
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">C₃₀ = Chlorophénicol - AMX₂₅ = Amoxyceillin – PC₁₀₀ = piperacilline</p>		
		
		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
		

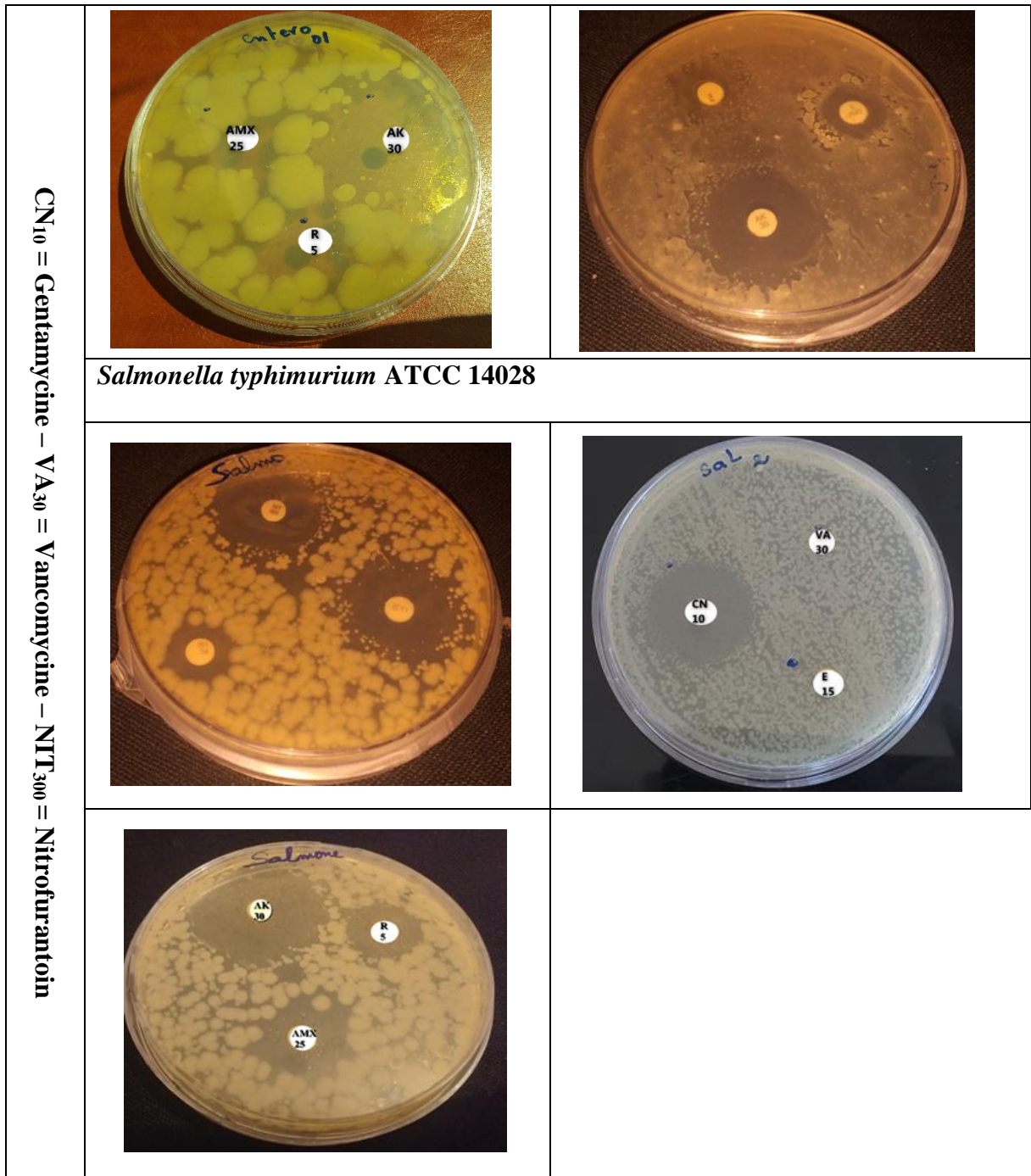
R₅ = Rifampicilline - AK₃₀ = Amikacine - E₁₅ = Erythromycine



Entérocooccus faecalis ATCC 29212

Klebsiella pneumoniae ATCC 27853





III.3.3. Étude de l'activité antibactérienne des extraits

Nous avons étudié *in vitro* l'activité antibactérienne de 2 extraits (méthanoïque (S1), acétonique (S2)) des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* par la méthode de diffusion en milieu gélosé par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition au tour des puits.

III.3.3.1. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanoïque sont représentés dans le **tableau 20** et les photos prises dans le **tableau 21**. Selon les résultats obtenus, nous pouvons conclure que l'extrait méthanoïque à différentes concentrations 40, 80 et 120 mg, réalisé sur des souches de références : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Entérocooccus faecalis*, *Salmonella typhimurium* et *Staphylococcus aureus* et *Staphylococcus aureus* (MRSA) n'a aucun pouvoir antibactérien vis-à-vis de ces souches de références.

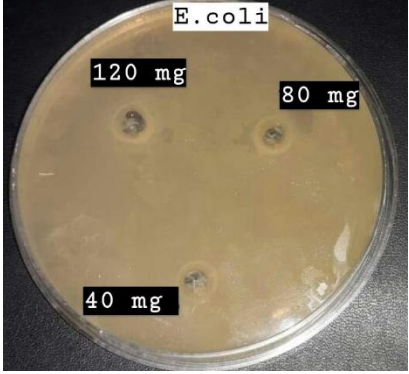
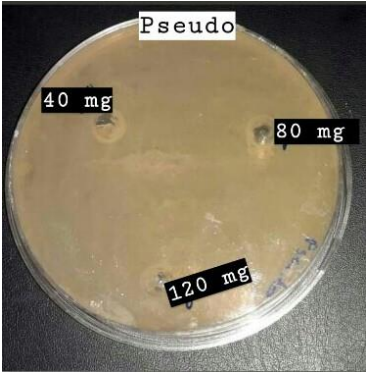
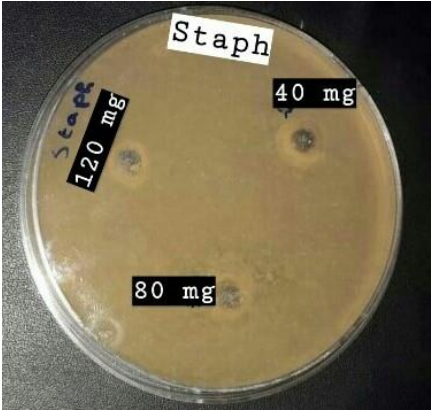
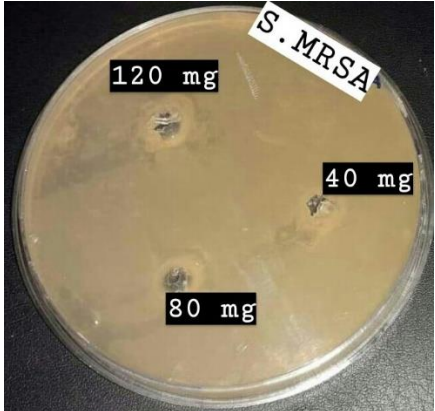
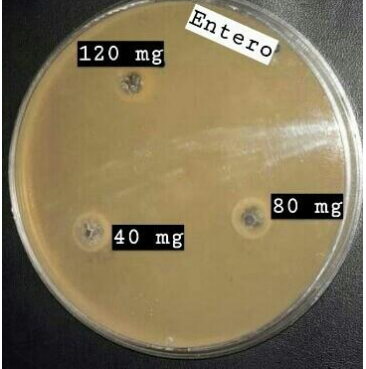
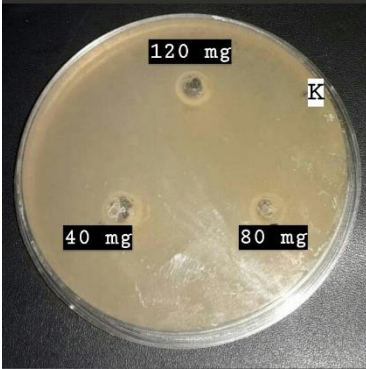
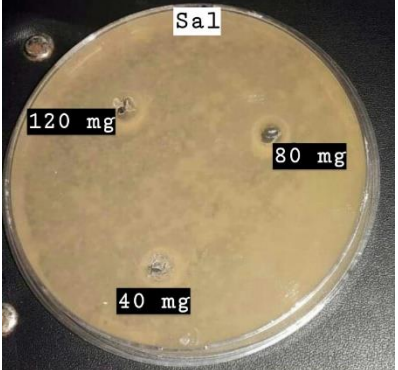
Tableau 20 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de références vis-à-vis de l'extrait méthanoïque (moyenne \pm écart type).

Souches de références	Zones d'inhibitions (mm)		
	40 mg	80 mg	120 mg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27853	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	00 \pm 00	00 \pm 00	00 \pm 00

L'extrait méthanoïque de l'oursin *Paracentrotus lividus* n'a indiqué aucun effet vis-à-vis des souches de références, cela a aussi été observé par les travaux de **Sidiqi et al. (2019)**. De même ces résultats ont démontré que l'extrait méthanoïque des gonades de l'oursin *Diadema setosum* n'avait aucune activité antibactérienne.

Les résultats obtenus diffèrent de ceux des autres recherches qui ont rapporté que l'extrait méthanoïque des gonades d'oursins avait une activité antibactérienne contre diverses bactéries pathogènes (**Abubakar et al., 2012 ; Akerina et al., 2015 ; Marimuthu et al., 2015**). Plusieurs raisons peuvent expliquer cette différence, notamment le processus de séchage de l'extrait (**Tee et al., 2017**), la taille des gonades, le sexe de gonades extraites (**Darsono, 1986**), la résistance bactérienne (**Pfaller, 2012**) et la concentration des molécules bioactives trop faibles (**Ariyanti et al., 2012**).

Tableau 21 : Effet de l'extrait méthanoïque vis-à-vis des souches de références.

Extrait méthanoïque	 <p>E. coli 120 mg 80 mg 40 mg</p>	 <p>Pseudo 40 mg 80 mg 120 mg</p>
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
	 <p>Staph 120 mg 40 mg 80 mg</p>	 <p>S. MRSA 120 mg 40 mg 80 mg</p>
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
	 <p>Entero 120 mg 80 mg 40 mg</p>	 <p>K 120 mg 80 mg 40 mg</p>
	<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27853
	 <p>Sal 120 mg 80 mg 40 mg</p>	
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		

III.3.3.2. Étude de l'activité antibactérienne de l'extrait acétonique

Les résultats obtenus de l'activité antibactérienne de l'extrait acétonique sont représentées dans le **tableau 22** et les photos prises dans le **tableau 23**.

Les zones d'inhibitions ont démontré que la souche *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853 est sensible à l'action de cet extrait, ce dernier est actif même à faible quantité avec des diamètres de l'ordre de $18,66 \pm 1,50$; $17,16 \pm 1,83$ et $27 \pm 2,09$ mm.

Pour les espèces *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, l'extrait a indiqué des zones d'inhibition à partir de 80 mg.

Pour les espèces *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Entérocooccus faecalis* ATCC 29212 et *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 aucune zone d'inhibitions n'a été retrouvée à une concentration de 40, 80 et 120 mg.

Tableau 22 : Diamètres des zones d'inhibition des souches de référence vis-à-vis de l'extrait acétonique

Souches de références	Zones d'inhibitions (mm)		
	40 mg	80 mg	120 mg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27853	$18,66 \pm 1,50$	$17,16 \pm 1,83$	$27 \pm 2,09$
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	00 ± 00	00 ± 00	00 ± 00
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	00 ± 00	$15,33 \pm 1,21$	$21,33 \pm 3,32$
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300	00 ± 00	$16,83 \pm 1,47$	$21,16 \pm 1,47$

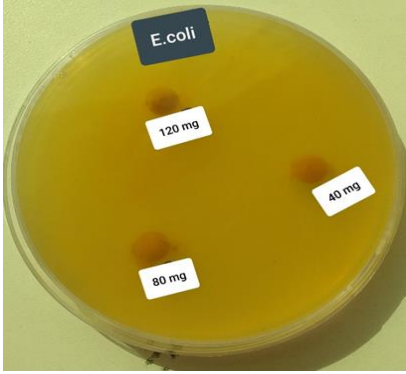
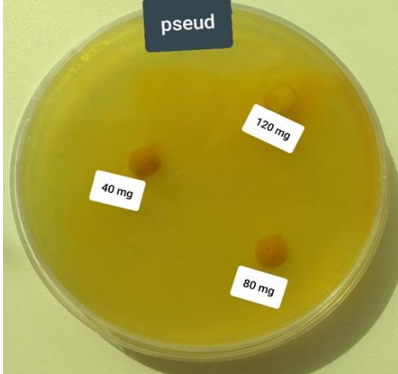


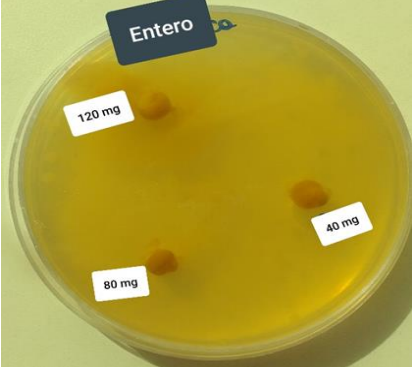
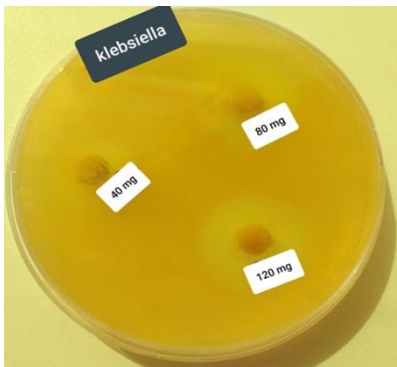
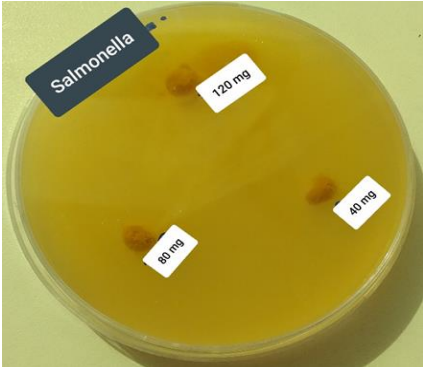
Les zones d'inhibition observée *in vitro* est utilisée comme indicatives de l'activité antibactérienne, et peuvent varier en fonction de la teneur des métabolites actifs et de la variabilité intrinsèque des souches testées. La différence de sensibilité des souches bactériennes peut être attribuée à la nature chimique des extraits testés ainsi que la nature des souches bactériennes (Aouissi, 2018). L'activité antibactérienne de l'oursin est généralement dosée à partir d'extraits divers par exemple l'acétone, le méthanol-toluène, l'éther et le chloroforme-méthanol (Bragadeeswaran *et al.*, 2013). En outre, les extraits au méthanol et au chloroforme des intestins, des gonades et des épines de l'oursin *Tripneustes gratilla* ont démontré une activité antibactérienne (Abubakar *et al.*, 2012).

L'extrait acétonique (S2) est très riche en caroténoïdes, des études menées par **Marimuthu et al. (2015)**, ont démontré que les caroténoïdes des ovaires de l'oursin noir *Diadema setosum* avaient une excellente propriété antimicrobienne contre une grande variété de bactéries pathogènes. Les mécanismes antimicrobiens associés aux caroténoïdes peuvent expliquer la puissance antimicrobienne de ces composés dont l'activité pourrait être due à leur capacité à se combiner avec la paroi bactérienne (**Cowan, 1999**).

Une activité antibactérienne a été détectée dans des extraits de plusieurs tissus d'oursins, (**Haug et al., 2002**). Il est intéressant de constater que l'oursin possède une capacité d'éliminer les bactéries lors d'une infection (**Bragadeeswaran et al., 2013**). Il existe de nombreuses informations précieuses sur les nouvelles découvertes des composés bioactifs présents dans l'oursin. Les coquilles d'oursin contiennent divers pigments de naphthoquinone polyhydroxylés, des spinochromes (**Casas et al., 2011 ; Anderson et al., 1969**), ainsi que leur composé analogue, l'échinochrome A, dont il a été démontré qu'un effet bactéricide a été rapporté (**Service et Wardlaw, 1984**).

Les résultats obtenus indiquent que l'inhibition de la croissance bactérienne dépend de 3 facteurs, la bactérie utilisée, la nature de l'extrait testé ainsi que sa concentration. Cependant, les extraits sont des mélanges complexes de nombreux composés et leur part active peut être très faible. Des investigations complémentaires devraient se concentrer sur les tentatives de purification des composés actifs afin d'élucider leur structure chimique (**Aouissi, 2018**). .

Tableau 23 : Effet de l'extrait acétonique vis-à-vis des souches de références.

Extrait acétonique		
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300
		
	<i>Entérocooccus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 27853
		
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028		

III.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB) des deux extraits étudiés vis-à-vis des souches de références n'ont pu être obtenus d'une part à cause de la turbidité des extraits et d'autre part à la gamme de concentrations choisie qui est inférieure à la concentration minimale inhibitrice.

Conclusion

Et

Perspectives

Ce travail indique la richesse potentielle des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* en molécules bioactives, les résultats obtenus indiquent que le screening phytochimique a permis de mettre en évidence la présence de saponosides, mucilages, alcaloïdes, C-hétérosides et flavonoides, avec une absence des tanins, anthocyanes, leucoanthocyanes, composés réducteurs, anthraquinones libres et O-hétérosides.

De même, les gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* ont indiqué une activité antioxydante appréciable *in vitro*, ils ont montré une inhibition vis-à-vis du radical DPPH.

En outre, l'extrait méthanoïque des gonades de l'oursin *Paracentrotus lividus* ne possède pas un effet antibactérien à 40, 80 et 120 mg. Par contre l'extrait acétonique possède un effet antibactérien vis-à-vis de l'espèce *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300.

En perspective, il serait très intéressant de mener une étude plus approfondie en étudiant :

- Activité antifongique.
- Faire des synergies.
- Utiliser des souches pathogènes.
- Dosage des constituants bioactifs.
- Tester des concentrations plus importantes.
- Purification des constituants bioactifs.

Références

Bibliographique

- Abbott, S. L., 2007.** *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae.* In : Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Tenover, M.A., (Eds.), Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. Washington, USA. ASM Press. 698-711.
- Akerina, T.N., Ruddy, S., 2015.** Isolation and characterization of antibacterial compounds from sea urchin. J.PH.P.I. 18 : 61-73.
- Allain, J.Y., 1978.** Âge et croissance de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) et de *Psammechinus miliaris* (Gmelin) des côtes nord de Bretagne (*Echinoidea*). Cah. Biol. Mar., XIX : 11 - 21.
- Aminot, A., Kérouel, R., 2004.** Caractéristiques physicochimiques majeures. In : Aminot, A., Kérouel, R. (Eds.). Hydrobiologie des écosystèmes marins : paramètres et analyses. Edition Ifremer. Brest. pp. 41 – 137.
- Amri, S., Samar, M.F., Sellem, F., Ouali, K., 2017.** Seasonal antioxidant responses in the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck 1816) used as a bioindicator of the environmental contamination in the South-East Mediterranean. Marine Pollution Bulletin. 122 : 392–402.
- Anderson, A.H., Mathieson, J.W., Thomson, R.H., 1969.** Distribution of spinochrome pigments in echinoids. Comp Biochem Physiol, 28:333-345.
- Angioni, A., Cau, A., Secci, M., Addis, P., 2014.** GC–ITMS analysis of PAH contamination levels in the marine sea urchin *Paracentrotus lividus* in Sardinia. Mar. Pollut. Bull., 82 : 201 - 207.
- Aouissi, M., 2018.** Écologie et valorisation chimique des macrophytes du golfe d’Annaba, Algérie. Thèse de doctorat. Option : Biologie marine. Université de Badji Mokhtar. Annaba. Algérie. p.188. Disponible sur : <http://biblio.univ-annaba.dz>
- Ariyanti, N.K., Darmayasa, I.B.G., Sudirga, S.K., 2012.** Daya hambat kulit daun lidah buaya (aloe babadensis miller terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *echerichia coli* ATTC 25922. Journal Biologie. 16 : 1-4.

- Avril, J.L., François, D., Henry, M., Henry, D., 2000.** Bactériologie clinique. 3^{ème} édition. Edition Ellipses-Marketing. p.602.
- Ballesteros, E., Garcia-Rubies, T., 1987.** La pêche aux oursins en Espagne et plus particulièrement en Catalogne. *In* : Boudouresque, C.F., (Ed.), colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie. Publ. France. 335 - 362.
- Barnabé, G., 1989.** Aquaculture. 2^{ème} édition. Vol. 1. Technique et documentation. Edition Lavoisier. France. p.1308.
- Barry, R.A. M. P., Mckinley, P.E., Bendheim, G.K., Lewis, S.J., Prusiner, S.B., 1985.** Antibodies to the scrapie protein decorate prion rods. *J. Immunol.* 135 : 603 - 613.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* Apr. 45 : 493 - 496.
- Bayed, A., Quiniou, F., Benrha, A., Guillou, M., 2005.** The *Paracentrotus lividus* populations from the Northern Moroccan Atlantic coast : growth, reproduction and health condition. *J. Mar. Biol. Assoc. UK.*, 85 : 999 - 1007.
- Beaumont, A., Cassier, P., 1973.** Biologie animale des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens. Tome I. 2^{ème} Edition Dunod. Paris. p.447.
- Bergeron N., 2009.** Caractérisation phénotypique d'isolats de *Salmonella typhimurium* provenant de porcs sains ou septicémiques. Thèse de doctorat. Option : Médecine vétérinaire. Université de Montréal Canada. p.263. Disponible sur : <https://core.ac.uk/download/pdf/55646049.pdf>
- Biermann, C. H., Mourão, P. A., 2002.** Sulfated fucans from the egg jellies of the closely related sea urchins *Strongylocentrotus droebachiensis* and *Strongylocentrotus pallidus* ensure species-specific fertilization. *Journal of Biological Chemistry*, 277(1), 379–387.
- Bolou, G.E.K., Attioua, B., N'Guessan, A.C., Coulibaly, A., N'Guessan, J.D., Djaman, A.J., 2010.** Évaluation in vitro de l'activité antibactérienne des extraits de *Terminalia glaucescens* planch sur *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium*. *Bulletin de la Société Royale des Science Liège.* 80 : 772 – 790

- Bos, M.A., Vennat, B., Meunier, M.T., Pouget, M.P., Pourrat, A., Fialip, J., 1996.** Procyanidins from Tormentil : Antioxydant proprieties towards lipoperoxidation and anti-elatase activity. *Biol. Pharm. Bull.*, 19 : 146-148.
- Boukadida, J., Salem, N., Hannachi, N., Monastiri, K., Snoussi, N., 2002.** Exploration génotypique d'une bouffée épidémique nosocomiale néonatale à *Klebsiella pneumoniae* productrice de bêtalactamase à spectre étendu. *Arch Pédiatr.* 9 :463-8.
- Bragadeeswaran, S., Sri Kumaran, N., Prasath Sankar, P., Prabahar, R., 2013.** Bioactive potential of sea urchin *Temnopleurus toreumaticus* from Devanampattinam, Southeast coast of India. *Journal of Pharmacy and Alternative Medicine.* ISSN 2222-4807.
- Brise, S., Duijkeren, E.V., 2004.** Identification and antimicrobial susceptibility of 100 *Klebsiella* animal clinical isolates. *Veterinary Microbiology* 105: 307-312.
- Casas, S.M., Comesana, P., Cao, A., Villalba, A., 2011.** Comparison of antibacterial activity in the hemolymph of marine bivalves from Galicia (NW Spain). *J Invertebr Pathol.* 106:343–345.
- Ceccon, J., 2006.** Synthèse Totale d'Alcaloïdes Polyhydroxylés : la (–) Swainsonine, la (+)-6-Épicastanospermine, la (+)-Castanospermine et la (–)-Détoxinine. Thèse de doctorat. Université Joseph Fourier (Grenoble 1). France. p. 155
- Clave, D., 2012.** Fiche technique : *Escherichia coli*. Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique. 123 : 8-543.
- Cook, E.J., Kelly, M.S., 2007.** Effect of variation in the protein value of the red macroalga *Palmaria palmata* on the feeding, growth and gonad composition of the sea urchins *Psammechinus miliaris* and *Paracentrotus lividus* (Echinodermata). *Aquac.* 270 : 207 - 217.
- Coteur, G., Gosselin, P., Wantier, P., Chambost-Manciet, Y., Danis, B., Pernet, P., Warnau, M., 2003.** Echinoderms as bioindicators, bioassays and impact assessment tools of sediment associated metals and PCBs in the North sea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 45 : 190 – 202.

- Cowan, M., 1999.** Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 : 564-582.
- Crapp, G.B., Willis, M.E., 1975.** Age determination of the sea urchin *Paracentrotus lividus* with notes on the reproductive cycle. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 20 : 385 - 407.
- CSHPF, 2000.** Recommandations relatives à la gestion du risque microbien lié à l'eau minérale dans les établissements thermaux. *Bulletin officiel*. p.27.
- Darsono, P., 1986.** The gonads of sea urchins (1986). *Food and Agriculture Organization in the US*. 11:151-162.
- Das, T.K., Banerjee, D., Chakraborty, D., Pakhira, M.C., Shrivastava, B., Kuhad, R.C., 2012.** Saponin : Role in Animal system. *Vet. World.*, 5 : 248-254.
- Davidson, A., 1981.** Poisson de la Méditerranée. Edition Edisud. France. p.318.
- Davis, J.C., 1975.** Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. *J. Fish. Res. Board Can.*, 32: 2295 - 2332.
- De Casamajor, M.N., 2004.** Baie de Biscaye. Richesse méconnue et diversité. Edition Alexandre Dewez. Ascain. France. p.263.
- De Perio, M.A., Yarnold, P.R., Warren, J., 2006.** Risk factors and outcomes associated with *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* enterococcal bacteremia. *Infect. Control Hosp. Epidemiol. J.* 27 : 28-33.
- Delarras, C., Trébaol, B., Durand, J., 2010.** Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation-Micro-organismes-Prélèvements-Analyse. 2^{ème} édition. Tec et Doc. Lavoisier. p.542.
- Demnati, S., Chafi, A., Attarassi, B., Maamri, A., Haloui, B., Kharboua, M., Ramdani, M., 2002.** Bioaccumulation des métaux lourds chez l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) sur la côte Est de la Méditerranée marocaine. *Actes Inst. Agron. Vét. Maroc*. 22 : 79 - 84.
- Edeogal, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal Biotechnology*. 4 : 685-688.

- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., Bakour, R., 2012.** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. PATBIO. 20 : 3048- 3058.
- Fabbrocini, A., Di Stasio, M., D'Adamo, R., 2010.** Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays : a new approach to pore water quality assessment. Ecotoxicol. Environ. Saf., 73 : 1588 - 1595.
- Fenaux, L., 1968.** Maturation des gonades et cycle saisonnier des larves chez *Arabacia lixula*, *Paracentrotus lividus* et *Psammechinus microtuberculatus* (Echinides) a Villeranches sur Mer. Vie et Milieu Série A : Biol. Mar., 19 : 1 - 52.
- Fenaux, L., 1994.** Five tests of food limited growth of larvae in coastal waters by comparisons of rates of development and form of echinoplutei. Limnol. Oceanogr., 39 : 84 - 98.
- Ferron, A., 1984.** Bactériologie médicale à l'usage des étudiants en médecine. 12^{ème} édition. Edition Crouan et Roques. Paris. p.401.
- Fischer, W., Schneider, M., Bauchot, M.L., 1987.** Fiche FAO d'identification des espèces pour des besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Révision 1. Vol. I. Végétaux et Invertébrée. Publication préparée par la FAO, résultat d'un accord entre la FAO et la commission des communautés européennes (projet GCP/INT/422/EEC) financée conjointement par ces deux organisations. Rome. FAO. p.760.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2002.** The biological action of saponins in animal systems: a review. Br. J. Nutr. 88: 587–605.
- Giga, Y., Sutoh, K., Ikai, A., 1985.** A new multimeric hemagglutinin from the coelomic fluid of the sea urchin *Anthocidaris crassispina*. Biochem 24 :4461–4467
- Grasse, P.P., Poisson, R. A., Tuzet, O., 1970.** Zoologie I. Invertébrés. Edit. Masson. Paris, p.935.
- Grosjean, F., 2001.** Growth models of the reared sea urchin *Paracentrorus lividus* (Lamarck, 1816). Thèse de doctorat. Université de Belgique. In : Utilisation de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) en tant que bioindicateur général de

la qualité du milieu marin. Thèse de doctorat. Option : Biologie animale. Université de Badji Mokhtar Annaba. p.228. Disponible sur : <http://biblio.univ-annaba.dz>.

Guettaf, M., 1997. Contribution à l'étude de la variabilité du cycle reproductif (indice gonadique et histologique des gonades) chez *Paracentrotus lividus* (Echinodermata : Echinoidea) en méditerranée Sud Occidentale (Algérie). Thèse. Doctorat. Option Océanologie. Université D'Aix-Marseille II. France. p.132.

Harmelin, J.C., Bouchon, C., Hong, J.S., 1981. Impact de la pollution sur la distribution des échinodermes des substrats durs en Provence (Méditerranée Nord occidentale).Téthys, 10 : 13 – 36.

Haug, T., Kjuul, A.K., Styrvold, O.B., Sandsdalen, E., Olsen, M. O., Stensvag, K., 2002. Antibacterial activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea) and *Asterias rubens* (Asteroidea). J. Invertebr. Pathol. 81: 94-102.

Humbert, F., 1998. Les Salmonelloses. Manuel de Bactériologie Alimentaire, Edition Polytechnica. Paris. p.150.

ICMSF, 1996. The International Commission on Microbiological Specifications for Foods: update. Food Control 7: 99-101.

Jacinto, D., Bulleri, F., Benetti-Cecchi, L., Cruz, T., 2013. Patterns of abundance, population size structure and microhabitat usage of *Paracentrotus lividus* Echinodermata : Echinoidea in SW Portugal and NW Italy., Mar. Biol., 160 : 1135-1146.

Janda, J. M., Abbott, S. L., 2006. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. The *Enterobacteria*. 2^{ème} ed. Washington, USA. ASM Press.115-129.

Jett, B. D., Huycke, M. M., Gilmore, M. S., 1994. Virulence of *Enterococci*. Clin. Microbiol. Rev. 7:462-478.

Joffin, J.N., Leyrol, G., 2006. Microbiologie technique. Tome 1. Dictionnaire des techniques. 4^{ème} édition. Bordeaux : CRDP d'aquitaine. p.363.

Joly, B., Reynaud, A., 2002. Entérobactéries. Systématique et méthodes de diagnostic. Edition : Tec & Doc Lavoisier. France. p.392.

- Karumi, Y., Onyeyili, P.A., Ogugb uaja, V.O., 2004.** Identification of active principales of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. J.Med. Scien.4 : 179-182.
- Korsak, N., Clinquart, A., Daube, G., 2004.** *Salmonella* spp dans les denrées alimentaires d'origine animale : un réel problème de santé publique. Annales de médecine vétérinaire 148 : 174-193.
- Kuwahara, R., Hatate, H., Yuki, T., Murata, H., Tanaka, R., Hama, Y., 2009.** Antioxidant property of polyhydroxylated naphthoquinone pigments from shells of purple sea urchin *Anthocidaris crassispina*. LWT e Food Science and Technology, 42: 1296-1300.
- Lammaouer, D., 2002.** Fiche technique : détermination des propriétés biologiques (activités pharmacologiques et toxicologiques) des plantes médicinales et aromatiques du PNT. Programme de l'UICN en Afrique du Nord : Phase III. P.9.
- Lawrence, J.M., 2013.** Sea urchins : biology and ecology. 3rd edition, Dev. Fish. Sci., 38 : 297 - 319.
- Lawrence, J.M., Lane, J.M., 1982.** The utilisation of nutrients by postmetamorphic echinoderms. *In* : Jangous, M., Lawrence, J.M., (Eds.). Echinoderm nutrition. Balkema CRC Press. Rotterdam. 331 - 371.
- Lebedev, A.V., Levitskaya, E.L., Tikhonova, E.V., Ivanova, M.V., 2001.** Antioxidant properties, autoxidation and mutagenic activity of echinochrome A compared with its etherified derivative. Biochemistry. 66 : 885–893.
- Le Direac'H, J.P., Boudouresque, C.F., Antolic, B., Kocatas, A., Panayotidis, P., Pancucci, A., Semroud, R., Spain, A., Zaouali, J., Zavodnik, D., 1987.** Rapport sur la pêche des oursins en méditerranée. *In* : Boudouresque, C.F., (Ed.), colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie. Publ.France. 335 - 362.
- Ledireach, J.P., 1987.** La pêche des oursins en méditerranée : histoire, techniques, législation et production. *In* : Boudouresque, C.F., (Ed.), colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie. Publ., France. 335 - 362.
- Li, C., Blencke, H.M., Haug, T., Stensvåg, K., 2015.** Antimicrobial peptides in echinoderm host defense. Dev Comp Immunol 49:190–197.

- Liu, C., Lin, Q., Gao, Y., Ye, L., Xing, Y., Xi, T., 2007.** Characterization and antitumor activity of a polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs. *Carbohydr Polym* 67:313–318.
- Luis, O., Delgado, F., Gago, J., 2005.** Year round captive spawning performance of the sea urchin *Paracentrotus lividus* : relevance for the use of its larvae as live feed. *Aquat. Living Resour.*, 18 : 45 - 54.
- Makarov, V. G., Hiltunen, R., 2012.** Phospholipids and amino-acid composition of eggs of sea urchin from Barents Sea. *Planta Medica*, 78: 1146-1150.
- Malviya, R., Srivastava, P., Kulkarni, G., 2011.** Applications of mucilage in drug delivery a review. *Advances in Biological Research* 5 : 1-7.
- Marimuthu, K. P., Gunaselvam, Rahman, A., Xavier, R., Arockiaraj, J., Subramanian. S., Yousoff FM IOP and Arshad, A., 2015.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 19: 1895-1899.
- Matsuno, T., Tsushima, M., 2001.** Carotenoids in sea urchins. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*. 32:115–138.
- Megran, D.W., 1992.** *Enterococcal endocarditis*. *Clin. Infect. Dis.* 15:63-71.
- Paulsen. I. T. L., Banerjee. G. S., Myers. K. E., Nelson. R., Seshadri. T. D., Read. D. E., Fouts. J. A., Eisen. S. R., Gill. J. F., Heidelberg. H., Tettelin. R. J., Dodson. L., Umayam. L., Brinkac. M., Beanan. S., Daugherty. R. T., DeBoy. S., Durkin. J., Kolonay. R., Madupu. W., Nelson. J., Vamathevan. B., Tran. J., Upton. T., Hansen. J., Shetty. H., Khouri. T., Utterback. D., Radune. K. A., Ketchum. B. A., Dougherty. C., Fraser, M., 2003.** Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* 299:2071-2074.
- Pfaller, M.A., 2012.** *The American Journal of Medicine*. 125 : 3-13.
- Pilly, E., 1975.** *Maladies infectieuses*. 4^{ème} édition. La Madeleine : Crouan et Roques. France. p. 584.

- Powell, C., Hughes, A.D., Kelly, M.S., Conner, S., McDougall, G.J., 2014.** Extraction and identification of antioxidant poly hydroxynaphthoquinone pigments from the sea urchin, *Psammechinus miliaris*. LWT- Food Sci. Technol., 59: 455 - 460.
- Pozharitskaya, O.N., Shikov, A.N., Makarova, M.N., Makarenko, I.E., Selezneva, A.I., 2015.** Effects of the standard extract from green sea urchin gonads on metabolic syndrome model. Eksp Klin Farmakol 78:13–18.
- Pozharitskaya, O.N., Shikov, AN., Laakso, I., Seppänen-Laakso, T., Makarenko, I. E., Faustova, N. M., Makarov, V. G., 2015.** Bioactivity and chemical characterization of gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* from Barents Sea. Journal of functional foods.17:227–234.
- Prakash, D., Suri, S., Upadhyay, G., Singh, B.N., 2007.** Total phenol, antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 58 : 18-28.
- Qin, L., Zhu, B., Zhou, D., Wu, H., Tan, H., Yang, J., Li, D., Dong, X., Murata, Y., 2011.** Preparation and antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from purple sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad. Food Sci. Technol. 44: 1113–1118.
- Régis, M.B., 1986.** Microstructure adaptative des radioles de *Paracentrotus lividus* (*Echinodermata : Echinoidea*) en milieu eutrophisé par les eaux usée. Mar. Biol. Deutsch, 90 : 271 - 278.
- Richardson, J.E., Fay, M.F., Cronk, Q.C. B., Bowman, D., Chase, M.W.A., 2000.** Phylogenetic analysis of Rhamnaceae using rbcL and trnL-F plastid DNA sequences. Am. J. Boot. 87: 1309-1324.
- Robinson, S., Blair, T. J. 2008.** Effects of dietary lipids on the fatty acid composition and lipid metabolism of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. Aquaculture (Amsterdam, Netherlands). 276 : 120–129.
- Roule, L., Suis, M.A., Moquin-Tandon, M.G., 1889.** Cours de zoologie médicale. Edition Privat. France. p.662.
- Rumrill, S.S., 1990.** Natural mortality of marine invertebrate larvae. Ophelia.32:163-198.

- Salas-Rojas, M., Galvez-Romero, G., Anton-Palma, B., Acevedo, R., Blanco-Favela, F., Aguilar-Setien, A., 2014.** The coelomic fluid of the sea urchin *Tripneustes depressus* shows antiviral activity against Suid herpesvirus type 1 (SHV-1) and rabies virus (RV). *Fish Shellfish Immuno* 36:158–163.
- Scaria, J., Palaniappan, R., Chiu, D., Ann Phan, J., Ponnala, L., McDonough, P., Grohon, Y., Porwollik, S., McClelland, M., Chiou, C., Chu, C., Chang, Y.F., 2008.** Microarray for molecular typing of *Salmonella enteric* serovars, *Molecular and Cellular Probes*, 22: 238-243.
- Senez .J., 1968.** Microbiologie générale. Edition Doin. Paris. 592 p.
- Service, M., Wardlaw, A.C., 1984.** Echinochrome-A as a bactericidal substance in the Coelomic fluid of *Echinus esculentus*. *Comp Biochem Physiol B*, 79:161–165.
- Shang, X.H., Liu, X.Y., Zhang, J.P., Gao, Y., Jiao, B.H., Zheng, H., Lu, X.L., 2014.** Traditional Chinese medicine sea urchin. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 14 : 537–542.
- Shikov, A. N., PoZharitskaya, O. N., Krishtopina, A, S., Makarov, V, G., 2018.** Naphthoquinone pigments from sea urchins. *chemistry and pharmacology. Phytochemistry reviews*.17: 509-534.
- Sidiqi, F. M., Pringgenies, D., Setyati, W. A., 2019.** Antibacterial Activity of Gonad Methanol Extract of the Sea Urchin *Diadema Setosum* against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *In : IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*.246: 120 124.
- Singh, S.B., Barrett, J.F., 2006.** Empirical antibacterial drug discovery foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol*. 71: 1006-1015.
- Soualili, D., Dubois, P., Gosselin, P., Pernet, P., Guillou, M., 2008.** Assessment of seawater pollution by heavy metals in the neighbourhood of Algiers: use of the sea urchin, *Paracentrotus lividus* as a bioindicator. *ICES J. Mar. Sci.*, 65 : 132 - 139.
- Soussy, C.J., 2007.** Résistance bactérienne aux antibiotiques. *Monographies en urologie*. p. 21-46.

- Sparg, G.S., Light, M.E., Van staden, J., 2004.** Biological activities and distribution of plant saponine. *Journal of Ethnopharmacology*. 94: 219-243.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 1994.** Differentiation of the genital apparatus in a juvenile echinoid (*Paracentrotus lividus*). In: David, B., Guille, A., Féral, J.P., Roux, M., (Eds.), *echinoderms through time*. Balkema CRC Press. Rotterdam. 881 - 886.
- Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M., 1998.** Reproductive cycle of the echinoid *Paracentrotus lividus*: analysis by means of the maturity index. *Invert. Deprod. Develop.* 34: 69 - 81.
- Struve, C., Stahlhut, S G., Krogfelt, K.A., Reisner, A., 2012.** Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol Med Microbiol* 65: 350–359.
- Susan, M., Damodaran, R., 1997.** Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in a clam *Sunetta scripta* and a mussel *Perna viridis*. *Indian J. Mar. Sci.* 26 : 57-63.
- Tee, L.K., Daneshwar, P., Vishwakalyan, B., 2017.** Antibacterial Activity of Gonad Methanol Extract of the Sea Urchin *Diadema Setosum* Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Biology Biotechnology*. 5: 9-13.
- Tejada, S., Deudero, S., Box, A., Sureda, A., 2013.** Physiological response of the sea urchin *Paracentrotus lividus* fed with the sea grass *Posidonia oceanica* and the alien algae *Caulerpa racemosa* and *Lophocladia lallemandii*. *Mar. Environ. Res.*, 83 : 48 - 53.
- Tortonese, E., 1965.** Fauna d'Italie. *Echinodemata*. Vol. I. Edizioni Calderini. Bologna. p.422.
- Urakova, I.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., 2012.** Scavenging effects of hydrolysates obtained from the sea urchins coelomic fluid. *Rev. Clin. Pharmacol. Med. Therapy* 10:111–112.
- Vangriesheim, A., Guillou, A.P., Prieur, L., 1992.** A deep ocean nephelometer to detect bottom and intermediate nepheloid layer. *Deep-Sea Res.*, 39: 1403 - 1416.

- Verlaque, M., 1987.** Contribution à l'étude du phytobenthos d'un écosystème photophile thermophile marin Méditerranée occidentale. Etude structurale et dynamique du phytobenthos et analyse des relations faune flore. Thèse de doctorat. Option : science de la nature. Université Aix - Marseille II. France. p.359. In : Boudouresque, C.F., (Ed.), colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles. GIS Posidonie. Publ., France. pp.5 – 36.
- Wang, H., Wang, M., Chen, J., Tang, Y., Dou, J., Yu, J., Zhou, C., 2011.** A polysaccharide from *Strongylocentrotus nudus* eggs protects against myelosuppression and immunosuppression in cyclophosphamide- treated mice. *Int Immunopharmacol* 11:1946–1953.
- Wertheim, H.F., Melles, D.C., Vos, M.C., Van Leeuwen, W., Van Belkum, A., Verbrugh, A., 2005.** The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet. Infect Dis.* 5:751-62.
- Yik Ling Chew, Joo Kheng Goh, Yau Yan Lim, 2009.** Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry.* 116 :13-18.
- Yrjöen, T., 2004.** Extraction and Planar Chromatographic Separation Techniques in the Analysis of Natural Products. Faculty of Pharmacy of the University of Helsinki. p.64. Disponible sur : <https://core.ac.uk>.
- Zupi, V., Fresi, E., 1984.** A study on the food web of the *Posidonia oceanica* (L.) Delile ecosystem : analyse of the gut contents of echinoderms. In : Boudouresque, C.F., Jeudy DeGrissac, A., Olivier, J., (Eds.). international workshop *Posidonia oceanica* Beds. GIS Posidonie. Pub., France. p. 373 - 379.

Sites internet

- [1] : <https://coursbiologie.net/wpcontent/uploads/2013/07/> Consulter le :16/04/2019.
- [2] : <http://biologie.ffessm.fr/index.php/kit-de-survie> Consulter le : 19/04/2019.
- [3] : <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/oursinMDC/gonadF> Consulter le : 25/04/2019.
- [4] : <http://www.globepharma.org>. Consulter le : 26/05/2015.
- [5] : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Enterococcusfaecalis#>. Consulter le : 15/04/2016.
- [6] : <http://spiralconnect.univlyon1.fr>. Consulter le : 13/05/2019.
- [7] : [http://www.unige.ch/uni3/Ateliers/Séminaire Bactériologie](http://www.unige.ch/uni3/Ateliers/Séminaire_Bactériologie). Consulter le : 07/04/2016.

[8] : <http://disciplines.ac-montpellier.fr>. Consulté le : 14/05/2019.

[9] : <http://elearn.univ-ouargla.dz>. Consulté le : 14/05/2019.

[10] : <http://univ.ency-education.com>. Consulté le : 14/05/2019.

[11] : <http://www.memoireonline.com>. Consulté le : 14/05/2019.