

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

Screening chimique du test de l'oursin marin *Paracentrotus lividus*

Présenté par

Melle Kahleras Ikhlas
Melle Rezaiguia Khawla
Melle Selmioui Roumaissa

Devant le membre du jury

Dr. Boussadia Meriem Imen
Dr. Sandra Amri
Dr. Benhalima Lamia

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

2020

Remerciements

Nous remercions tout d'abord en premier lieu aux membres du jury

Madame Boussadia Meriem Imen

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, pour avoir accepté de diriger ce travail.

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

Merci 

Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; le symbole de la tendresse, et de l'amour. En témoignage de ses prières , sa patience et ses sacrifices... **maman** que j'adore.*

*Grâce à toi j'ai appris le sens du travail , du courage et de la responsabilité..Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi .. **Mon papa** que dieu te protège.*

*A mon cher frère **ZaKi** Et sa femme **Imane***

*Et mon petit ange : **youssef***

*A mon cher frère **Salah***

*A ma chère sœur **Soumia***

Les mots n'arrive pas à exprimé le respect, le remerciement, l'attachement, et l'amour que je vous porte, Je vous souhaite un avenir radieux et plains de bonheur. je vous remercie d'être toujours là pour moi.

*À mes camarades de travail : **Khawla** et **Roumaïssa**.*

A tous mes très chers amis.

A tous ceux qui me connaissent.

*A toute la famille **Kahleras** et **Lebouahla**.*

K.IKHLAS

Merci 

Dédicaces

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse de courage et d'amour, votre prière, votre bénédiction, et votre patience qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite..ma douce maman.

À mon cher Père Tu as toujours été à mes cotes pour me soutenir et m'encourager. Que dieux te garde

A Ma chère sœur meriem... et son marie imad....et ma petite janna

Les mots n'arrive pas à exprimé le respect, le remerciement, l'attachement, et l'amour que je vous porte, Je vous souhaite un avenir radieux et plains de bonheur.

A mon cher frère Karim imad

A LES personnes qui était toujours là pour me soutient et m'encourager et assurer de me rend heureuse, Soumia , maïssa , Djanet

À mes camarades de travail : IKHLAS et Roumaïssa.

A tous les membres de ma famille.

A tous mes très chers amis.

A tous ceux qui me connaissent.

R.KHAWLA

Merci 

Dédicaces

Avant tout, je remercie 'Dieu'

*De m'avoir donné le courage et la volonté pour réaliser ce
modeste travail ; que je dédie*

A mes chers parents,

*En témoignage de ma reconnaissance pour leur patience,
leurs sacrifices et leur soutien tout au long de mes études et qui
n'ont pas cessé de m'encourager et de prier pour moi. Que Dieu
vous protège et vous garde pour moi.*

*A mes frère **RAMZI** et **YASSER**,*

*A ma sœur **CHAHRAZED**,*

*Qui m'avez toujours soutenu et encouragé durant ces années
d'études.*

A ma chère grand-mère,

QUI je souhaite une bonne santé.

*A mes chers binôme **KHAWLA** et **IKHLAS**,*

Pour toutes ententes et sympathie.

*A toute la promotion de la biologie moléculaire
et cellulaire sans exception et tous ceux qui m'ont apporté leur
aider et leurs conseils, a tous ceux que j'aime.*

S.ROUMAÏSSA

Liste des abréviations

Abréviation	signification
%	: Pour cent
(µg/ml)	: Microgramme/Gramme
°C	: Degré Celsius
µg / g	: Microgramme/gramme
AlCl₃	: Trichlorure d'aluminium
ATCC	: American Type Culture Collection
Cm	: Centimètre
CMB	: Concentration minimale bactéricide
CMI	: Concentration minimale inhibitrice.
DMSO	: Diméthyle Sulfoxyde.
EMMAL	:
FeCl₃	: Chlorure ferrique
g	: Gramme
H₂SO₄	: Acide sulfurique
HCl	: Acide chlorhydrique
Mg	: Milligramme.
mg/ml	: Milligramme/millilitre
ml	: millilitre.
Mm	: Milimetre
Na₂CO₃	: carbonate de sodium
NH₄OH	: L'ammoniaque
pH	: Potentiel d'hydrogène
PHNQ	: Naphtoquinone polyhydroxylée
µl	: Microlitre
µg	: Microgramme

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Position systématique de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	3
02	Noms vernaculaires de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i> .	4
03	Description et fonction des appendices de test d'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	6
04	Taxonomie d' <i>Escherichia coli</i>	11
05	Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i>	12
06	Taxonomie de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
07	Principaux caractères de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
08	Taxonomie d' <i>Enterococcus faecalis</i>	14
09	Principaux caractères d' <i>Enterococcus faecalis</i>	15
10	Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	16
11	Principaux caractères <i>Staphylococcus aureus</i>	17
12	Classification biochimique des antibiotiques.....	18
13	Aspects, couleurs et rendements des extraits du test de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> .	28
14	Dosage des flavonoïdes et polyphénols du test de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	28
15	Caractérisation chimiques du test de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	29
16	Tests chimiques du test de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i>	30
17	Aspects macroscopiques des souches de référence.....	32
18	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelques antibiotiques (moyenne ± écart type).....	34
19	Détermination de la résistance et de la sensibilité des souches de références aux antibiotiques.....	35
20	Effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.....	35

Liste des figures :

N°	Titre	Page
01	Arbre phylogénétique des <i>Echinodermata</i>	03
02	Distribution géographique de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	05
03	Anatomie externe de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> .(A):Vue oral, (B):Vu Aboral	07
04	Anatomie interne de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	08
05	Différent mode d'action des antibiotiques.....	20
06	Procédé d'évaporation avec un évaporateur rotatif	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. Synonymies et noms vernaculaires	04
I.1.3. Répartition géographique	05
I.1.4. Anatomie	06
I.1.4.1. Anatomie externe	06
I.1.4.2. Anatomie interne	07
I.1.5. Mouvement et migration	08
I.1.6. Respiration	09
I.1.7. Alimentation	09
I.1.8. Cycle de vie	09
I.1.9. Croissance et prédation	10
I.1.10. Intérêt économique	10
I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques	11
I.2.1. Entérobactéries	11
I.2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	11
I.2.1.1.1. Taxonomie	11
I.2.1.1.2. Habitat	11
I.2.1.1.3. Caractères généraux	12
I.2.1.1.4. Pouvoir pathogène	12
I.2.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
I.2.1.2.1. Taxonomie	12
I.2.1.2.2. Habitat	13
I.2.1.2.3. Caractères généraux	13
I.2.1.2.4. Pouvoir pathogène	14
I.2.2. <i>Entérocooccus faecalis</i>	14
I.2.2.1. Taxonomie	14
I.2.2.2. Habitat	14
I.2.2.3. Caractères généraux	15
I.2.2.4. Pouvoir pathogène	15
I.2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	15
I.2.3.1. Taxonomie	16
I.2.3.2. Habitat	16
I.2.3.3. Caractères généraux	16

I.2.3.4. Pouvoir pathogène.....	17
I.2.4. Antibiotiques.....	17
I.2.4.1. Définition d'un antibiotique.....	17
I.2.4.2. Classification des antibiotiques.....	17
I.2.4.3. Mécanisme.....	18
I.2.4.4. Différent modes d'action des antibiotiques.....	19

Chapitre II : Matériels et Méthode

II.1. Matériel biologique.....	21
II.2. Extraction.....	21
II.3. Souches de référence.....	21
II.4. Milieux de culture.....	22
II.5. Tests chimiques.....	22
II.5.1. Tests préliminaires.....	22
II.5.1.1. Préparation de l'infusé à 10%.....	22
II.5.1.2. Tanins.....	22
II.5.1.3. Anthocyanes.....	22
II.5.1.4. Leucoanthocyanes.....	23
II.5.1.5. Flavonoïdes.....	23
II.5.1.6. Préparation d'un décocté.....	24
II.5.1.7. Saponosides.....	24
II.5.1.8. Mucilages.....	24
II.5.1.9. Composés réducteurs.....	24
II.5.1.10. Alcaloïdes.....	24
II.5.1.11. Terpènes et stérols.....	25
II.5.1.12. Dérivés anthracéniques.....	25
II.5.1.12.1. Extrait chloroformique.....	25
II.5.1.12.2. Anthraquinones libres.....	25
II.5.1.12.3. Anthraquinones combinées.....	25
II.5.2. Dosage des Polyphénols.....	26
II.5.3. Dosage des Flavonoïdes.....	26
II.6. Activité antibactérienne.....	26
II.6.1. Antibiogramme.....	26
II.6.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	27

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation chimique de pigment naphthoquinone.....	29
III.1.1. Rendement.....	29
III.1.2. Dosage des flavonoïdes et polyphénol.....	29
III.1.3. Test chimique préliminaire.....	30
III.2. Activité antibactérienne.....	33
III.2.1. Etude de l'effet des antibiotiques vis à vis des souches de références.....	35
Conclusion et perspectives.....	39
Références bibliographiques.....	40
Annexes	

Notre étude a pour but, l'étude de la chimie ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne du test de l'oursin *Paracentrotus lividus* vis à vis de 6 souches de référence : *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* K 12 ATCC10798 , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300. Le screening chimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des pigments naphthoquinones de l'oursin *Paracentrotus lividus*. De même, les résultats révèlent la présence de quatre groupes chimiques : saponosides, polyphénol, C-hétérosides et de flavonoïdes, avec une absence des tanins, anthocyanes, O-hétérosides, Terpènes et stérols, mucilage, alcaloïdes, Anthraquinones libres, leuco anthocyanes et les composés réducteurs.

Mots clés : *Paracentrotus lividus*, activité antibactérienne, Screening chimique.

Our study aims to study the chemistry as well as the evaluation of the antibacterial activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus* test against 6 reference strains: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 , *Escherichia coli* K 12 ATCC10798 , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 . chemical screening enabled us to demonstrate the presence of secondary metabolites in the naphthoquinone pigments of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. Likewise, the results reveal the presence of four chemical groups: saponosides, polyphenol, C-heterosides and flavonoids, with an absence of tannins, anthocyanins, O-heterosides, Terpenes and sterols, mucilage, alkaloids, free anthraquinones, leuco anthocyanins and reducing compounds.

Key words: *Paracentrotus lividus*, antibacterial activity, chemical screening.

الهدف من دراستنا هو دراسة الكيمياء وكذلك تقييم النشاط المضاد للبكتيريا في اختبار قنفذ البحر
Escherichia ، *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 مقابل 6 سلالات مرجعية: *Paracentrotus lividus*
Klebsiella pneumoniae ATCC ، *Escherichia coli* ATCC 25922، *coli* K 12 ATCC10798
Staphylococcus aureus (MRSA) ATCC 43300 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، 27853
وقد مكنتنا الفحص الكيميائي من إثبات وجود مستقلبات ثانوية في أصباغ نافثوكينون لقنفذ البحر *Paracentrotus*
lividus. وبالمثل ، كشفت النتائج عن وجود أربع مجموعات كيميائية: وجود *polyphénol* ، *saponosides* ، *C-*
Flavonoïdes و *hétérosides* مع غياب *Terpènes* ، *O-hétérosides* ، *anthocyanes* ، *taninis* و *stérols* ،
composés réducteurs و *leuco anthocyanes* ، *Anthraquinones libres* ، *alcaloïdes* ، *mucilage* .
الكلمات الأساسية: *Paracentrotus lividus* ، النشاط المضاد للبكتيريا ، الفحص الكيميائي .

Introduction

Les pigments des test et des épines sont actuellement les composés actifs les plus étudiés des oursins (**Stevens et Ruxton, 2011; Pereira et al., 2014**), la présence de pigments de naphthoquinone polyhydroxylée (PHNQ) chez les oursins est connue et étudiée depuis quelques années, Certains de ces pigments ont été nommés échinochromes et spinochromes en fonction de leurs sources d'origine. Le rôle des pigments PHNQ dans les coquilles d'oursin n'est pas connu. Les PHNQ s'accumulent uniquement dans la couche de derme vivant qui recouvre les couches internes de la coquille, qui sont principalement composées de carbonate de calcium. Par conséquent, les PHNQ sont en contact avec l'environnement extérieur et peuvent avoir une fonction de protection. Il a été démontré que les PHNQ ont des effets anti-algues et antibactériens et leur accumulation dans les coquilles peut limiter l'infection. (**Powell et al., 2014**).

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 chimie des coquilles de l'oursin *Paracentrotus lividus* et d'autre part tester l'effet antibactérien vis-à-vis de 6 souches de références (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* K12 ATCC10798, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *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 chimique des coquilles 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*

Les oursins appartiennent au phylum des Echinodermes qui comprend cinq classes, *Crinoidea*, *Asteridea*, *Holothuroidea*, *Echinoidea* dont les oursins font partie et *Ophiuroidea* (Fig.01) (Yokota, 2002).

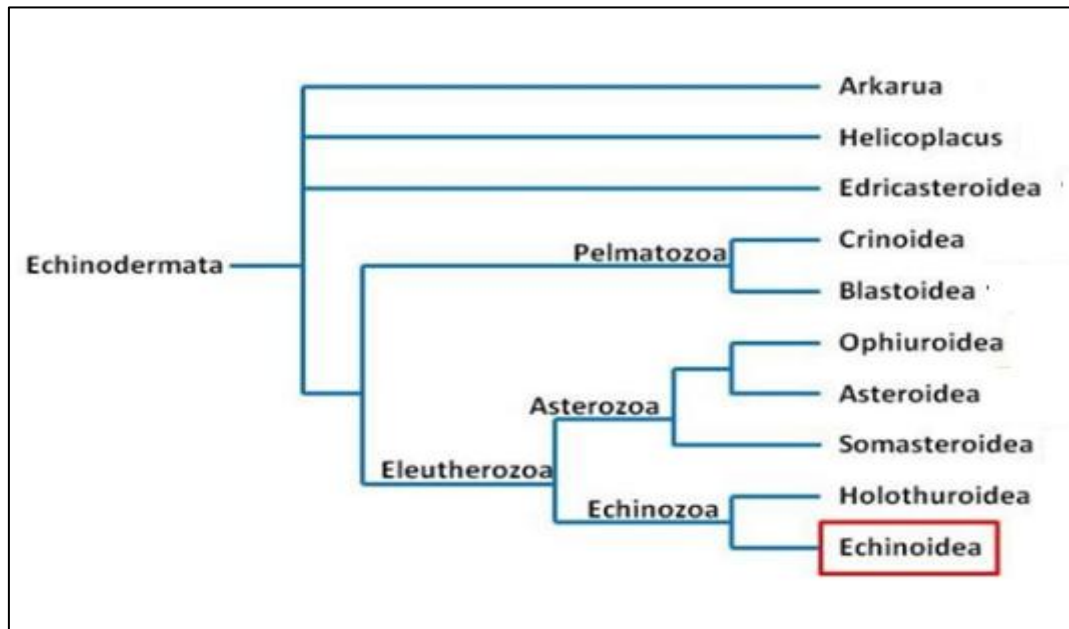


Figure 01 : Arbre phylogénétique des *Echinodermata*.

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.02**), où il occupe surtout l'étage infralittoral (**Grasse 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**).

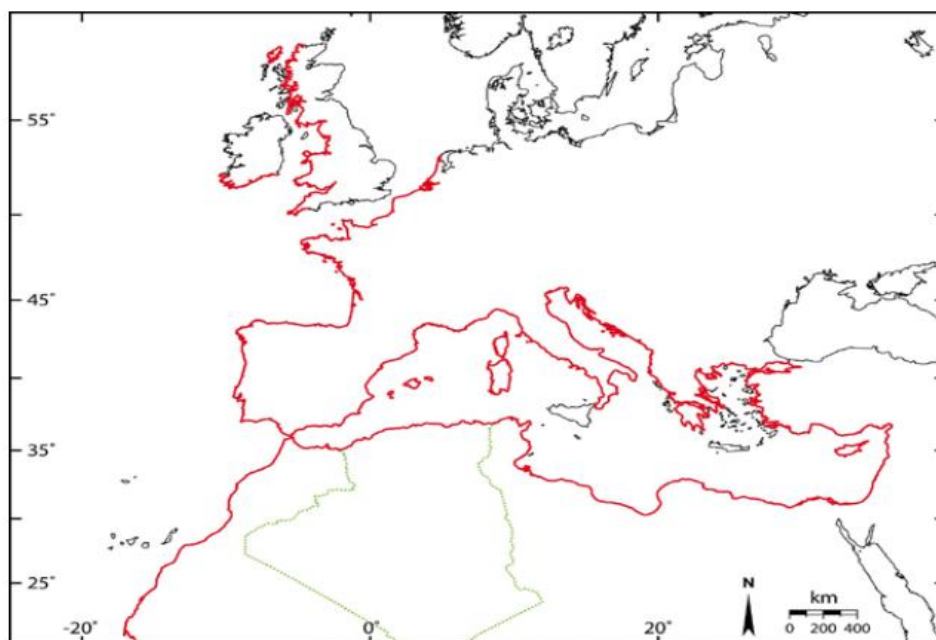


Figure 02 : Distribution géographique de l'oursin *Paracentrotus lividus* (**Soualili, 2008**).

I.1.4. Anatomie

I.1.4.1. Anatomie externe

L'espèce *Paracentrotus lividus* présentent une forme sphérique plus ou moins aplatie à ses deux pôles à une symétrie pentamère (pentaradiée) (**Fig.03**), superposée à une symétrie bilatérale stricte (**Fischer et al., 1987**) . Sa forme est contrainte par un endosquelette, situé juste sous l'épiderme, composé d'osselets calcaires suturés ensemble dans un test solide. Ce test prend en charge les épines mobiles qui couvrent le corps de l'animal leur diamètre peut atteint de 65 à 70 mm. Le corps de l'oursin régulier subdivisé en deux hémisphères : un pôle buccal, dirigée vers le substrat comprend la bouche qui est entourée d'une membrane, le péristome, et un pôle aboral opposé portant l'anus entouré d'une membrane, le périprocte formé de 10 plaques intradermiques calcifiées, étroitement juxtaposées. Il est composé de cinq régions ambulacraires qui alternent avec cinq régions interambulacraires, ces régions sont formées d'une double rangée squelettique (**Grosjean, 2001**).

D'après **Fischer et al .(1987)** ; **Régis (1979)** ; **Le Gall (1989)**, le test (ou dermosquelette) possède différent appendices (**Tableau 03**).

Tableau 03 : Description et fonction des appendices de test d'oursin *Paracentrotus lividus*.

Appendices	Descriptions	Fonction
Les piquants	appendices calcifiés, répartis sur toute la surface du test particulièrement dans les zones interambulacraires de la couronne	la protection, la défense et la locomotion
Les podia (pieds ambulacraires)	s'allonger ou se rétracter, et se terminent généralement par une ventouse.	La locomotion, la respiration, la fixation « ancrage » et retiennent la nourriture
Les pédicellaires	des petits organes calcifiés fixés sur le test entre les piquants On distingue quatre types : - Pédicellaire trifoliés - Pédicellaires tridenté (tridactyles)	capture des proies, le nettoyage du test, la défense et empêche les petits organismes de s'y fixer

	<ul style="list-style-type: none"> - Pédicellaire globifères (glandulaires) - Pédicellaires ophiocéphales 	
--	---	--

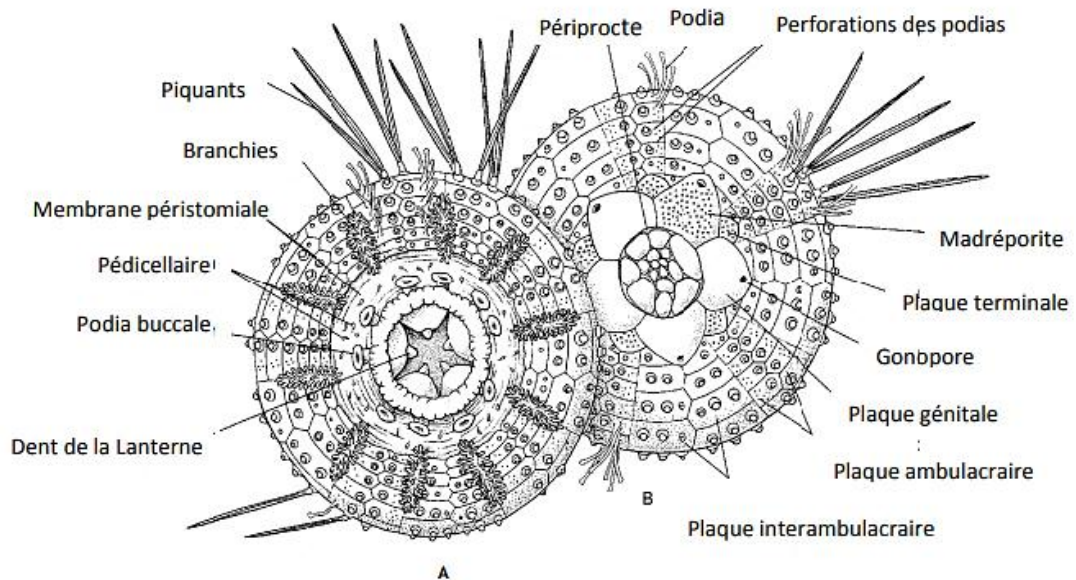


Figure 03: Morphologie externe de l'oursin *Paracentrotus lividus*. (A) : Vue oral, (B) : Vue aboral (**Ruppert et Barnes, 1994**).

I.1.4.2. Anatomie interne

Intérieurement (**Fig.04**), le tube digestif de l'oursin *P. lividus* comprend la bouche au centre de la face inférieure du test, suivi de l'oesophage entouré d'un puissant appareil la lanterne d'Aristote formé de cinq ensembles complexes ou mâchoires. Chaque mâchoire comprend les dents, la rotule, le compas (**Le Gall, 1987**).

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 longeant la paroi intestinale : l'un des deux se place au côté externe de la paroi intestinal, 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'oesophage 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**).

L'organe reproducteur est constitué de cinq gonades en position inter radiaire chacune reliée à l'extérieur par un conduit génital qui traverse le test au niveau des plaques génitales qui entourent l'anus. Les males possèdent des gonades allongées qui émettent un liquide blanchâtre lorsqu'elles sont mure pour les femelles la même forme et de couleur orange émettent un liquide orangé (**Boué et Chanton, 1978**).

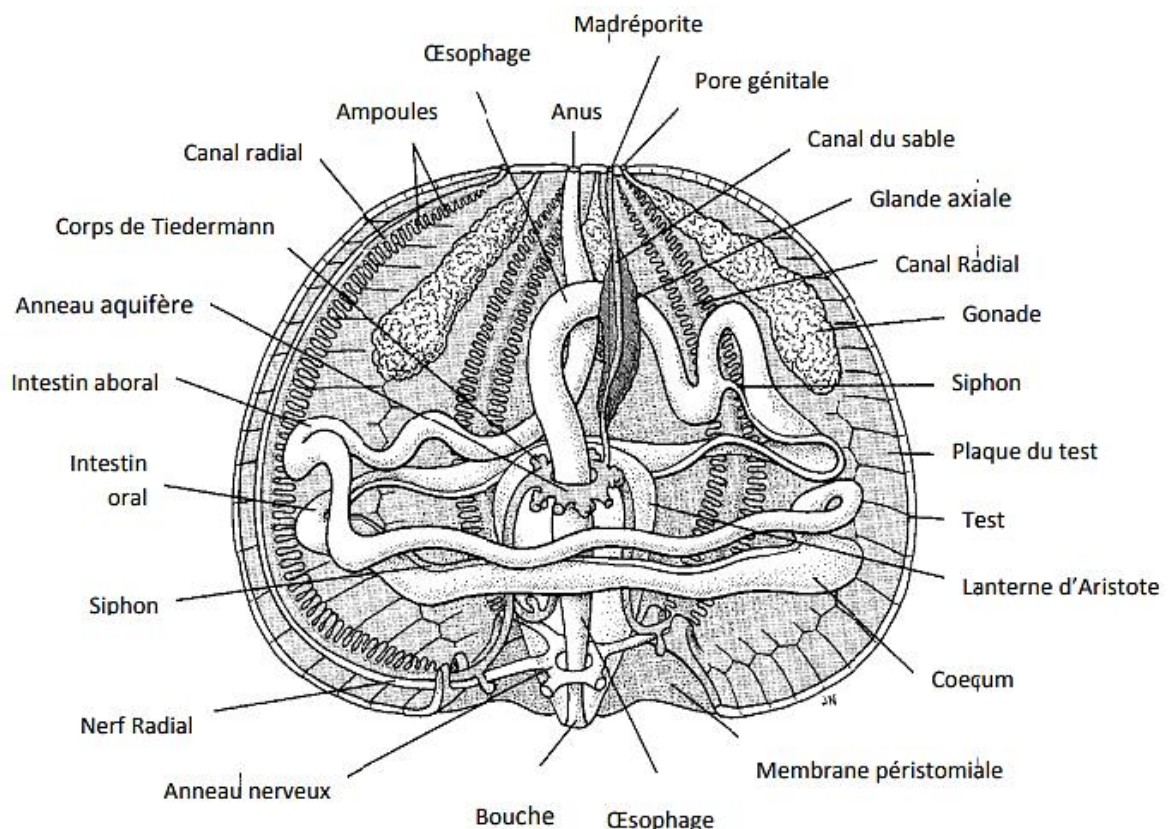


Figure 04: Anatomie interne de l'oursin *Paracentrotus lividus* (**Grosjean, 2001**).

I.1.5. Mouvement et migrations

Comme tout échinoderme, l'oursin *Paracentrotus lividus* présente souvent des mouvements migratoires à l'échelle locale tous les jours (**Barnes et Crook, 2001**). Les mouvements des oursins sont très lents, mais leurs permettent d'aller rechercher leur

nourriture, avec une meilleure position vis -à-vis des conditions de leur environnement (**Belkhedim, 2009**). Ces mouvements sont le résultat de la combinaison des mouvements élémentaires des podia (extension et raccourcissement), sur lesquels l'oursin se hale (**Tifour et Bahoussi, 2005**). Les piquants de la face inférieure 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 la contraction de ces muscles. Les oursins peuvent se déplacer passivement, ils cessent d'adhérer au substrat et se laissent entraîner par les courants en roulant sur l'extrémité de leurs piquants (**Souidi, 2008**).

I.1.6. Respiration

Les oursins réguliers vivent généralement dans les milieux agités très oxygénés, en raison de leur morphologie complexe, ils disposent de tissus qui sont pratiquement tous en contact direct avec le milieu ambiant tant à l'extérieur qu'à l'intérieur du corps. (**Barnabé, 1989**). La respiration s'effectue essentiellement sur toute la surface de certains oranges semblent cependant avoir une fonction respiratoire plus importante. De plus il existe dix « branchies » sur le cercle de fibres conjonctives et de muscles insérés sur les auricules et pieds ambulacraires péribuccal (**Fischer et al., 1987**).

I.1.7. Alimentation

Paracentrotus lividus est une espèce à dominance végétale (**Rico, 1989**), mais dans les zones pauvres où la ressource est limitée, il se comporte comme un omnivore (**Régis, 1978**). Ils se nourrissent souvent pendant la nuit quand les prédateurs sont absents (**Fernandez et Boudouresque, 2000**). Le cycle alimentaire de l'oursin régulier est très variable suivant la région occupé, Il est capable de ronger n'importe quoi y compris la roche. De même, il a la capacité d'absorber la matière organique dissout dans l'eau à travers le test et les piquant (**Régis, 1978 ; Verlaque, 1987**).

I.1.8. Cycle de vie

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 dans les 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 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 3 cm (**Bald et al., 2007 ; Grosjean, 2001**). 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 (**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

La croissance de l'oursin semble être liée principalement à la température de l'eau, la qualité des aliments et leur cycle de vie (**Fernandez, 1996**). La longévité maximale dépasse 13 à 15 ans (**Tomšić et al., 2010**). 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. 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 (**Allain, 1978**).

I.1.10. Intérêt économique

Dans les annuaires statistiques de la F.A.O, la pêche de ces échinodermes se fait à des quantités trop faibles, En effet, ces oursins sont pêchés dans quasiment tous les pays de la méditerranée (**Le Direac'H et al., 1987**), Cet Invertébré est l'oursin le plus important d'un point de vue commercial, est très exploité commercialement, car il est très apprécié. Toutefois, les gonades femelles sont beaucoup plus recherchées que celles des mâles (**Kempf, 1962**). 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. Entérobactéries

I.2.1.1. *Escherichia coli*

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée pour des travaux de physiologie et de génétique. Elle représente l'espèce type du genre *Escherichia*. Appelée communément « colibacille », cette espèce possède certains caractères bactériologiques (Avril *et al.*, 2000).

I.2.1.1.1. Taxonomie

La classification systématique d'*Escherichia coli* est représentée dans le **tableau 04** (Stewart *et al.*, 2015).

Tableau 04: Taxonomie d'*Escherichia coli*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	Entérobactérie
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Escherichia</i>
Espèce	<i>Escherichia coli</i>

I.2.1.1.2. Habitat

E. coli appartient à la microflore commensale de l'Homme et de nombreux animaux. C'est une bactérie colonisatrice du tube digestif des animaux à sang chaud (carnivores, omnivores, herbivores et oiseaux) mais également des reptiles (Gordon et Cowling, 2003). Le tractus digestif constitue son habitat primaire. Cette bactérie est présente principalement au niveau du colon et du cæcum à des concentrations environ > 10⁶ UFC (Unité Formant Colonie)/ g de contenu intestinal (Ducluzeau et Raibaud, 1985). *E. coli* est rejeté dans l'environnement *via* les fèces à une concentration d'environ 10⁸ UFC/ g de fèces (Smati *et al.*, 2015). Sa présence dans l'eau est un indice de contamination fécale.

I.2.1.1.3. Caractères généraux

Les principaux caractères d'*Escherichia coli* sont mentionnés dans le **tableau 05** (Oulymata, 2007).

Tableau 05 : Principaux caractères d'*Escherichia coli*.

Caractères morphologique	bacilles à Gram négatif, mobiles le plus souvent.
Caractères culturaux	<p>Aéroanaérobies facultatifs, culture facile sur milieux ordinaires, lactosés.</p> <p>Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre.</p> <p>Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drigalski.</p>
Caractères biochimique	Oxydase +, Catalase +, Indole +.

I.2.1.1.4. Pouvoir pathogène

E. coli peut non seulement être une bactérie commensale, mais aussi un pathogène. La pathogénèse de ces bactéries se fait par étapes. Tout d'abord elles colonisent une muqueuse. Puis elles se multiplient et causent des dommages à l'hôte tout en essayant d'évader ses défenses (Kaper *et al.*, 2004).

I.2.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae a été décrite pour la première fois par Carl Friedlander en 1882 comme une bactérie isolée des poumons de patients décédés d'une pneumonie. Les espèces de *Klebsiella* se trouvent partout dans la nature, y compris dans les plantes, les animaux et les humains (Podschun et Ullmann, 1998).

I.2.1.2.1. Taxonomie

La classification systématique de *Klebsiella pneumoniae* est représentée dans le **tableau 06** (George *et al.*, 2004).

Tableau 06 : Taxonomie de *Klebsiella pneumoniae*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Entérobactériale</i>
Famille	<i>Enterobacteriaceae</i>
Genre	<i>Klebsiella</i>
Espèce	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

I .2.1.2.2.Habitat

Klebsiella pneumoniae est une espèce ubiquiste, elle peut être isolée de l'environnement (sol, eau de surface, eau usées et végétaux) (Dong *et al.*, 2003). Elle est également retrouvée dans la flore fécale de l'homme et des animaux, elle existe à l'état commensal sur la peau et les muqueuses, notamment respiratoires (Baerwolf *et al.*, 2002).

I .2.1.2.3.Caractères généraux

Les principaux caractères de *Klebsiella pneumoniae* sont représentés dans le tableau 07 (Sekhri, 2011).

Tableau 07 : Principaux caractères de *Klebsiella pneumoniae* .

Caractères morphologique	bacilles à Gram négatif, il mesure de 0,3 à 1,0 µm de diamètre sur 0,6 à 6 µm de longueur, présentant de manière isolée, ou groupés par deux ou en courtes ce sont des bactéries non sporulées, immobile.
Caractères culturaux	Aéro-anaérobies, la température optimale de croissance est de 37 °C. Se développe sur les milieux classiques d'isolement (Gélose Hektoen, Mac Conkey, EMB).
Caractères biochimique	Fermentant le glucose avec production de gaz, oxydase -, catalase +.

	Lactose (+), ONPG (+), VP+.
--	-----------------------------

I.2.1.2.4. Pouvoir pathogène

Certaines souches de *K. pneumoniae* agissent comme des pathogènes opportunistes, infectant les patients gravement malades et immunodéprimés. Ces *K. pneumoniae* sont une cause fréquente d'infections associées aux soins de santé, notamment la pneumonie, les infections des voies urinaires et les infections de la circulation sanguine. (Martin et Bachman, 2018).

I.2.2. *Enterococcus 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.2.2.1. Taxonomie

La classification systématique d'*Enterococcus faecalis* est représentée dans le **tableau 8** (Delarras et al., 2010).

Tableau 8 : Taxonomie d'*Enterococcus faecalis*.

Règne	Bacteria
Embranchement	Firmicutes
Classe	Bacilli
Ordre	Lactobacillales
Famille	Enterococcaceae
Genre	Enterococcus
Espèce	Enterococcus faecalis

I.2.2.2. Habitat

Le réservoir principal d'*Enterococcus faecalis* est le tube digestif de l'homme et de nombreux animaux (des mammifères, des reptiles et des insectes), on peut également le

trouver au niveau du vagin, ou de la cavité buccale. Elles peuvent survivre dans les environnements naturels (c'est-à-dire les plantes, le sol et les plans d'eau), dans les produits laitiers et les aliments fermentés (Hébert, 2008).

I.2.2.3. Caractères généraux

Parmi les principaux caractères d'*Enterococcus faecalis* sont représenté dans le tableau 9 (Avril *et al.*, 1992).

Tableau 9: Principaux caractères d'*Enterococcus faecalis*.

Caractères morphologique	<p>Cocci, Gram positifs, non sporulantes, rond, diplocoque, chaînette elles sont immobile.</p> <p>La taille est environ 0,6 – 2,5µm de diamètre.</p>
Caractères culturaux	<p>Anaérobie facultatif (peuvent se développer en aérobiose),</p> <p>La température optimale de croissance de 37 °C Y compris un intervalle de croissance tolérant de 10 à 45 °C; mésophiles et chimio-hétérotrophes, Le pH optimal est de 7,3</p>
Caractères biochimique	<p>Catalase -, oxydase - .</p>

I.2.2.4. Pouvoir pathogène

Les entérocoques provoquent une gamme d'infections, y compris, le plus souvent, des infections des voies urinaires, des voies urinaires cathétérisées, de la circulation sanguine, des plaies et des sites chirurgicaux, et des valves cardiaques dans l'endocardite. (Goh *et al.*, 2017).

I.2.3. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques ont été identifiés dès l'aube de l'ère pasteurienne par Pasteur lui-même, Ogston et Rosenbach, et n'ont jamais cessé de susciter des recherches tant leur

importance est grande en pathologie. Ce sont en effet des bactéries qui peuvent être d'inoffensifs commensaux ou provoquer des infections d'une extrême gravité ; celles-ci peuvent se présenter sous la forme de cas isolés, de petites épidémies familiales ou de graves épidémies dans les collectivités (**Rebiahi, 2012**).

I. 2.3.1. Taxonomie

La classification systématique de *Staphylococcus aureus* est représentée dans le tableau 10 (**Delarras, 2007**).

Tableau 10 : Taxonomie de *Staphylococcus aureus*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Staphylococcaceae</i>
Genre	<i>Staphylococcus</i>
Espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>

I.2.3.2. Habitat

S. aureus est un germe ubiquitaire présent dans l'environnement et chez les animaux mais son habitat préférentiel est l'homme. Dans les heures qui suivent la naissance, *S. aureus* colonise la peau, l'ombilic, le tube digestif et le périnée du nouveau-né. Cette colonisation fluctue jusqu'à l'âge de 6 ans où l'on considère qu'elle est représentative du portage à l'âge adulte (**Descloux et al., 2008**).

I.2.3.3. Caractères généraux

Les principaux caractères de *Staphylococcus aureus* sont représentée dans le **tableau 11** (**Prescott et al., 2010**).

Tableau 11: Principaux caractères *Staphylococcus aureus* .

Caractères morphologique	Cocci à Gram positif, regroupé en paire, tétrade ou amas réguliers Immobile ; non sporulé.
Caractères cultureux	Aéro anaérobies facultatifs. Halophile – mésophile (37°C) et psychrophile (6-12°C) Neutrophile pH opt=7 ; pHm ; Aw : basse, jusqu'à 0,83.
Caractères biochimique	catalase +, oxydase -.

I.2.3.4. Pouvoir pathogène

Staphylococcus aureus peut causer des infections de la peau, en se liant aux cellules de l'épiderme par un mécanisme d'adhérence (**Tortora et al ., 2003**).

I.2.4. Antibiotiques

I.2.4.1. Définition d'un antibiotique

Les antibiotiques se définissent comme des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules humaines dans notre propos). Ils permettent aux défenses naturelles du corps telles que le système immunitaire, de les éliminer. Ils agissent souvent en inhibant la synthèse d'une cellule bactérienne, la synthèse de protéines, l'ADN, l'ARN, par un agent désorganisant la membrane, ou d'autres actions spécifiques (**Levy et Marshall, 2004**).

I.2.4.2. 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 12**).

Tableau 12: 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

1.2.4.3. Mécanisme

Un antibiotique agit du fait de son affinité pour une cible vitale pour la bactérie. Sa fixation spécifique inhibe le fonctionnement de cette cible qui est en général une enzyme ou structure clé impliquée dans la synthèse de la paroi, les acides nucléiques, des protéines ou de la membrane cytoplasmique. La résistance bactérienne aux antibiotiques est un facteur compliquant l'action de ces antibiotiques. D'après **Guillemot et Leclercq (2005)**, il en existe 3 modes :

- La modification de la cible : la cible de l'antibiotique est modifiée et l'antibiotique ne peut plus s'y fixer.
- L'inactivation enzymatique : l'antibiotique est modifié par la production d'une enzyme bactérienne et ne reconnaît plus sa cible.

- L'imperméabilité : c'est la diminution de la pénétration et l'efflux actif par des pompes plus ou moins spécifiques.

D'après **Andreu et Mainardi (2003)**, ces mécanismes sont responsables :

- Des résistances naturelles : caractéristique propre appartenant à l'ensemble des souches d'une espèce bactérienne, elle est toujours transmissible à la descendance.
- Des résistances acquises : caractéristique ne s'appliquant qu'à certaines souches au sein de la même espèce bactérienne, variable dans le temps.

I.2.4.4. Différents modes d'action des antibiotiques

Un antibiotique peut agir sur cinq types de cibles (**Fig.05**) : la paroi, la membrane plasmique (et membrane externe pour les bactéries Gram-), le cytoplasme et les synthèses protéiques, le chromosome (**Brisson, 2018**).

A. Action au niveau de la paroi bactérienne

L'antibiotique restreint la biosynthèse de peptidoglycane. Il en résulte l'altération de la paroi ayant un effet létal pour la bactérie.

B. Action au niveau de la membrane

L'antibiotique fait des trous dans la membrane responsables de fuites cellulaires.

C. Action au niveau des processus cytoplasmiques

- ✓ La synthèse des protéines : l'antibiotique se fixe sur les ribosomes bactériens et inhibe la synthèse des protéines.
- ✓ La synthèse des acides nucléiques : Les antibiotiques peuvent bloquer la transcription de l'ADN en se fixant sur l'ARN polymérase bactérienne où ils inhibent la synthèse de l'acide folique qui participe à la formation du tétrahydrofolate (cofacteurs de la synthèse d'acides aminés et de bases puriques).

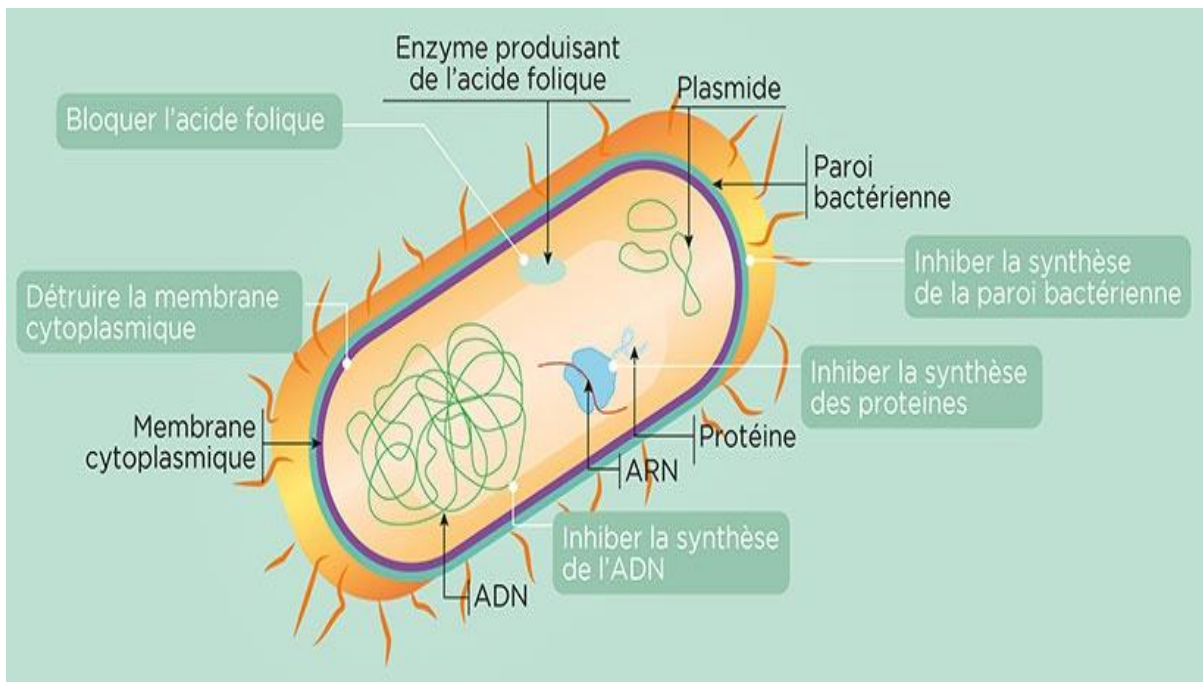


Figure 05: Différents modes d'action des antibiotiques (Brisson, 2018).

Matériel
et
méthodes

II.1. Matériel biologique

L'oursin *Paracentrotus lividus* utilisé pour cette étude, a été récolté au niveau du golfe d'Annaba (Gap de Garde). Ces animaux sont transportés au laboratoire dans des bidons remplis d'eau de mer. Nous avons utilisé le test (coquille) de cet animal. Après dissection, les coquilles ont été nettoyées à l'eau courante puis séchées à 40 °C pendant 48 heures.

II.2.Extraction

Afin de réaliser notre travail, nous avons préparés un solvant (méthanol) l'extraction a été réalisé au laboratoire de microbiologie (Université 08 Mai 1945 -Guelma). Nous avons faits trois macération sous agitation chaque une durant 24 heures, les filtrats étaient évaporer au rotavapeur afin d'éliminer le solvant d'extraction, puis conservés au réfrigérateur à 4°C dans des flacons stériles hermétiquement fermés.



Figure 06: Procédé d'évaporation avec un évaporateur rotatif.

II.3. Souches de référence

Les germes utilisés sont souches de références de type 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 fourni à partir du laboratoire EMMAL (Université de Badji Mokhtar - Annaba).

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- *Escherichia coli* K 12 ATCC 10798.
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300.

II.4. Milieux de culture

Suivant les méthodes employées et les souches étudiées, nous avons utilisé plusieurs milieux tels que la gélose nutritive, Hektoen, Chapman, Mac Conkey, Cétrimide, gélose et bouillon Muller Hinton et du bouillon nutritif. La composition est indiquée en annexe.

II.5. Tests chimiques

II.5.1. Tests préliminaires

II.5.1.1. Préparation de l'infusé à 10 %

Nous avons placé 10 g de la poudre dans 100 ml d'eau bouillante, après 15 min on procède à la filtration et à la récupération de l'infusé puis compléter à 100 ml.

II.5.1.2. Tanins

Dans un tube à essais, 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.5.1.3. Anthocyanes

Les anthocyanes sont des pigments naturels, solubles dans l'eau, de couleur rouge orangé au bleu pourpre (Azevedo *et al.*, 2010). La recherche des anthocyanes 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 quelques 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.5.1.4. Leucoanthocyanes

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.5.1.5. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont de puissants antioxydants vis-à-vis des radicaux libres dus à leur propriété de donation d'atomes d'hydrogène disponibles dans les substituants hydroxyles de leurs groupes phénoliques (Sandhar *et al.*, 2011).

- **Teste 01** : Traiter 5 ml d'extrait avec quelques gouttes d'HCL concentré et une petite quantité de tournures de magnésium (Alliages de magnésium), puis laisser agir pendant 3 min. La coloration rouge (cerise) indique la présence des flavonoïdes. La présence des flavone aglycone est confirmée par l'apparition d'une couleur rouge ou orange.
- **Teste 02 (Réaction à la cyanidine)** : Induire dans un tube à essai 5 ml d'infusé, ajouter 5ml d'alcool chlorhydrique (alcool à 95°, eau distillée, HCL concentré a parties égales en volume) ; 1ml d'alcool isoamylique puis quelque copeaux de magnésium .Il se produit une réaction de crépitation pendant quelque minutes.
 - L'apparition d'une coloration rose orangée (flavones) ou rose – violacée (flavanones) ou rouge (flavonones, flavanonols) rassemblée dans la couche surnageant indique la présence d'un flavonoïde libre (génine).
 - Les colorations sont moins intenses avec les hétérosides flavoniques.
 - La réaction est négative avec les chalcones, les dihydrochalcones, les auronnes, les catéchines et les isoflavones.
 - Effectuer la réaction à la cyanidine sans ajouter de copeaux de magnésium et chauffer pendant 15 min au bain-marie.
 - En présence de leucoanthocyanane, il se développe une coloration rouge cerise ou violacée ; les catéchols donnent une teinte brune –rouge.
- **Teste 03** : Macérer 1 g de la poudre 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 NH_4OH . Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

II.5.1.6. Préparation d'un décocté

Nous avons placé 2g de la poudre dans 100 ml d'eau, porté à l'ébullition pendant 30 min. Après refroidissement et filtration, on réajuste le volume à 100 ml.

II.5.1.7. Saponosides

Ce sont des hétérosides de stérols et de triterpènes très répandus chez les végétaux. Les saponosides sont caractérisés par leurs propriétés tensions actives (**Bruneton, 2009**). La détection des saponosides (décocté a 1%) est réalisée en ajoutant un peu d'eau à 2 ml de l'extrait aqueux, puis la solution est fortement agitée. Ensuite, le mélange est laissé pendant 10 min et la teneur en saponosides est évaluée :

- 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.5.1.8. Mucilages

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.5.1.9. Composés réducteurs

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.5.1.10. Alcaloïdes

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 heures de 5 g de poudre dans 25 ml de H_2SO_4 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.5.1.11. Terpènes et stérols

Nous avons procédé à une macération 5g de la poudre dans 20 ml d'éther de pétrole. Après avoir filtré et évaporé la phase organique dans un bain de sable à 90°C, le résidu est dissout dans 5ml d'acide acétique en ajoutant 1ml d'H₂SO₄ concentré. Dans la zone de contact, entre les deux liquides ils se forment un cercle marron ou violet ensuite il vire vert le gris, ce changement du cercle indique la présence de stérol et de terpène.

II.5.1.12. Dérivés anthracéniques

II.5.1.12.1. Extrait chloroformique

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

II.5.1.12.2. Anthraquinones libres

A 1 ml de l'extrait chloroformique nous avons ajouté 1 ml de NH₄OH (dilué à ½) puis agité. Une coloration plus ou moins rouge indique la présence d'anthraquinones libres.

II.5.1.12.3. Anthraquinones combinées

➤ **O- hétérosides** : A partir de l'extrait chloroformique, nous avons préparé un hydrolysât 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'hydrolysât sont agités avec 5 ml de chloroforme (veiller à bien mettre en contact les 2 phases en effectuant des aller-retour à la pipette sans provoquer d'émulsion) récupérer la phase organique puis ajouter 1 ml de NH₄OH (dilué à ½) 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'hydrolysât 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 NH_4OH (dilué à 1/2). Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines C-hétérosides.

II.5.2. Dosage des Polyphénols

Les polyphénols sont des pigments végétaux caractérisés par leurs propriétés antioxydants (Médart, 2009). Le terme polyphénols est fréquemment utilisé pour désigner l'ensemble des composés phénoliques des végétaux. Bien qu'étant très diversifiées, ils ont tous en commun la présence d'un ou de plusieurs cycles benzéniques portant une ou plusieurs fonctions hydroxyles (Benarous, 2006).

Nous avons pris 200 μl d'extrait ont été ajoutés à 1ml de réactif de Folin-Ciocalteu 10 fois dilué. La solution a été mélangée et incubées pendant 4 minutes. Après l'incubation 800 μl de la solution de carbonate de sodium Na_2CO_3 (7.5%) a été ajoutée puis mélanger et incuber 2 heures dans l'obscurité à température ambiante. L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 765 nm. La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage, établie avec le standard étalon l'acide gallique (5-200 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

II.5.3. Dosage des Flavonoïdes

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), Nous avons pris 1 ml d'extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution d' AlCl_3 (2 % dans le méthanol). Mélanger et agiter puis L'absorbance des extraits a été mesurée par un spectrophotomètre à 430 nm lue après 10 minutes d'incubation. La quantification des flavonoïdes a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire réalisé par un standard étalon "la quercétine" à différentes concentrations (1,75 - 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

II.6. Activité antibactérienne

II.6.1. Antibiogramme

L'activité antibactérienne de l'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.6.2. 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 l'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 chimique de pigment naphthoquinone

III.1.1. Rendement

L'extrait méthanoïque a été caractérisé par sa couleur et son rendement, le résultat obtenu après les trois macérations sous agitation chaque une durant 24 heures sont mentionnés dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Aspects, couleurs et rendements des extraits du test de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Extrait	Couleur	Rendement (%)
Méthanoïque	Orangé foncé	33.47

Le rendement varie en fonction de l'organe utilisé et la période de prélèvement de l'oursin. L'extrait méthanoïque des coquilles de l'oursin *Paracentrotus lividus* a présenté un rendement en extraits assez élevé de l'ordre de 33.47 % par rapport au 200 g de la poudre. 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.1.2. Dosage des flavonoïdes et polyphénol :

Le résultat du dosage des flavonoides et polyphénol sa indiqué que les coquilles de l'oursin *Paracentrotus lividus* présente une valeur de l'ordre de $3,62 \pm 0,09$ $\mu\text{g} / \text{g}$ de polyphénols et $1,54 \pm 0,02$ de flavonoides.

Tableau 14 : dosage de flavonoides et polyphénols du test de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Quantité	Unité
Polyphénols ($\mu\text{g}/\text{g}$ de poudre)	$3,62 \pm 0,09$
Flavonoides ($\mu\text{g}/\text{g}$ de poudre)	$1,54 \pm 0,02$

III.1.3. Test chimiques préliminaire

Le résultat de screening chimique obtenus sur le test de l'oursin *Paracentrotus lividus* a mis en évidence la présence de quatre groupes chimiques. (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Caractérisation chimiques du test de l'oursin *Paracentrotus lividus*.


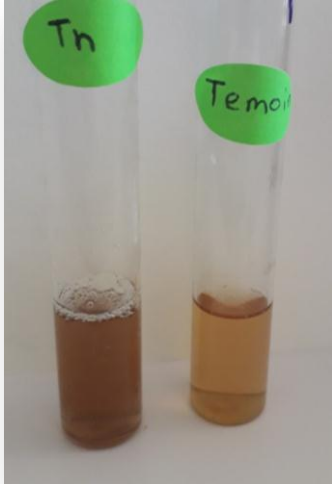
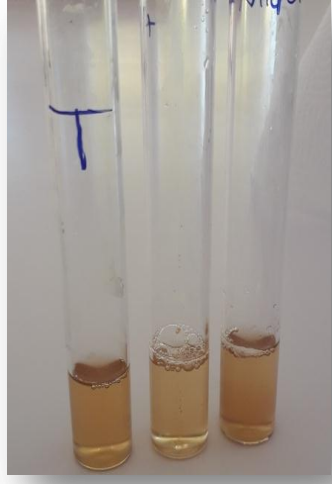
Tests chimiques	Résultats
Tanins catéchiques	-
Tanins galliques	-
Anthocyanes	-
Leucoanthocyanes	-
Saponosides	Test faiblement positif
Mucilages	-
Composés réducteurs	-
Alcaloïdes	-
Anthraquinones libres	-
O-hétérosides	-
C-hétérosides	+
Flavonoïdes	+
Polyphénol	+
Terpènes et stérols	-
(+): Présence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

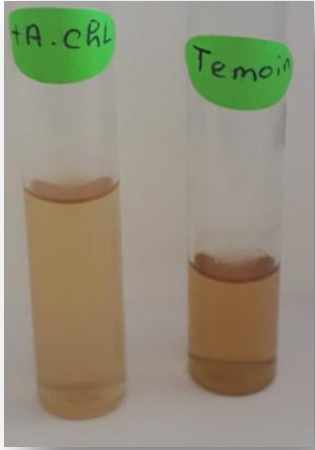
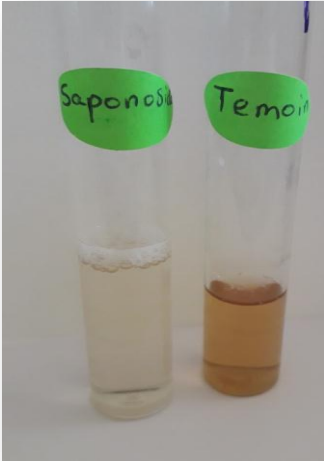

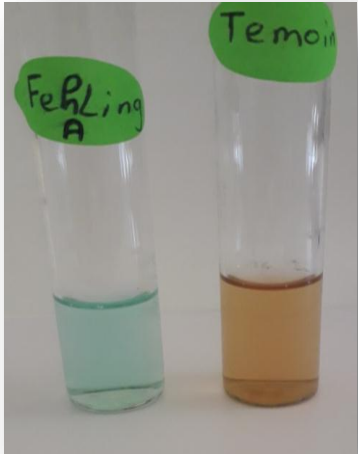
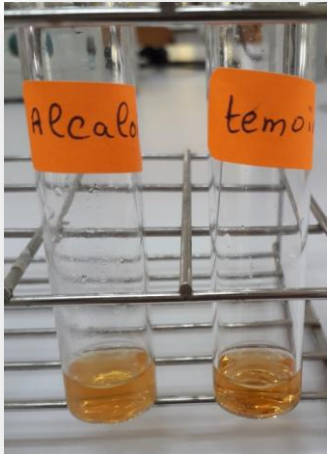

Le screening chimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau de pigment naphthoquinone d'oursin *Paracentrotus lividus*. La détection de ces composés chimiques est basée sur des essais de solubilités des constituants, des réactions de précipitation, de turbidité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






D'après **Jiao et al.(2015)**, le test de l'oursin contient des minéraux, des protéines, des polysaccharides ainsi que des pigments bioactifs de naphthoquinone polyhydroxylée (PHNQ) et des dérivés de PHNQ substitués par des groupes éthyle, acétyle, méthoxy ou amino, connus sous le nom d'échinochrome et collectivement sous le nom de spinochromes

(Hou *et al.*, 2020). De même, plusieurs études scientifiques ont démontré que les tests et les épines des oursins offrent de nombreuses classes de composés à haute valeur médicinale (Shikov *et al.*, 2018). Les résultats obtenus du screening chimique sont plus ou moins comparables à ceux retrouvés par Akerina *et al.*, (2015) et Sidiqi *et al.*, (2019) réalisés sur l'oursin *Diedema setosum*, cette différence de composition peut être due à la capacité de détection du test chimique qui n'est pas en mesure de détecter des quantités très faibles dans l'échantillon (Artini *et al.*, 2013), il peut également être due à des conditions environnementales différentes et à l'âge des oursins qui sont utilisés comme matériel de recherche (Darsono, 1986).

Tableau 16 : Tests chimiques du test de l'oursin *Pracentrotus lividus*.

		
<p>Témoin</p>	<p>Tanins (négatif)</p>	<p>Anthocyanes (négatif)</p>

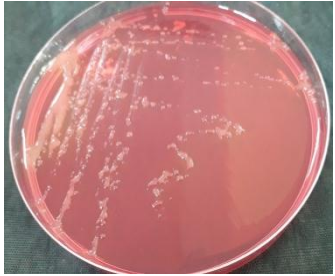

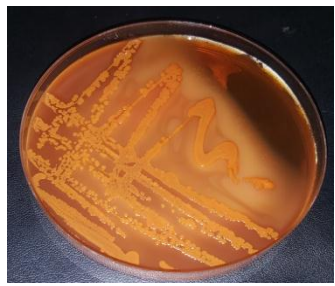
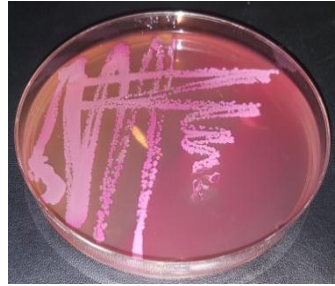
		
<p>Leuco anthocyanes (négatif)</p>	<p>Saponosides (positif)</p>	<p>Mucilages (négatif)</p>
		
<p>Composés réducteurs (négatif)</p>	<p>Alcaloïdes (négatif)</p>	<p>Anthraquinones libres (négatif)</p>


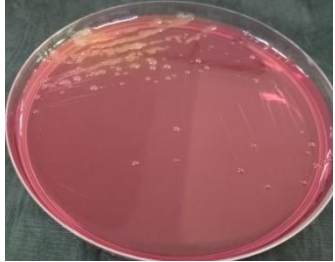
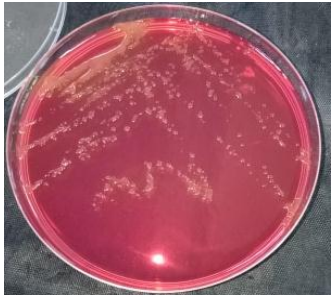
		
<p>O-hétérosides (négatif)</p>	<p>C-hétérosides (positif)</p>	<p>Flavonoïdes (positif)</p>
		
<p>Polyphénol (positif)</p>	<p>Terpènes et stérols (négatif)</p>	

III.2. Activité antibactérienne

Afin de vérifier leur pureté, les souches de référence sontensemencées et repiqués sur des milieux de cultures spécifique, leurs aspects et caractérisations sont représentés dans le **tableau 17**.

Tableaux 17: Aspects macroscopiques des souches de référence.

Souches bactériennes	Caractères culturaux	
<p><i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)</p>	<p>Gélose Chapman</p> <p>Petites colonies lisses, de couleur jaunes</p> <p>Lactose +, mannitol -</p>	
<p><i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)</p>	<p>Gélose Mac Conkey</p> <p>Petites colonies bombé, de couleur rose à rouge</p> <p>Lactose +</p>	
	<p>Gélose Hektoen</p> <p>Petites colonies plate de couleur saumon</p> <p>Lactose +</p>	
<p><i>Escherichia coli</i> K 12 (ATCC 10798)</p>	<p>Gélose Mac Conkey</p> <p>Petites colonies plates de couleur rose à rouge</p> <p>Lactose +</p>	

<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATTC 27853)</p>	<p align="center">Gélose Hektoen</p> <p>Colonies bombées muqueuses de couleur saumon de 2 à 3 mm de couleur saumon</p> <p>Lactose +</p>	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</p>	<p align="center">Gélose Chapman</p> <p>Petites colonies lisses, rondes, se pigmentent habituellement en jaune doré</p> <p>Lactose +, mannitol +</p>	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) (ATCC 43300)</p>	<p align="center">Gélose Chapman</p> <p>Petites colonies lisses, rondes, se pigmentent habituellement en jaune doré</p> <p>Lactose +, mannitol +</p>	

III.2.1. Étude de l'effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références

La sensibilité des souches aux antibiotiques a été testée 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 18**) indiquent que les 6 souches de références peuvent être sensibles ou résistantes aux antiotiques. Les photos prises sont représentées dans le **tableau 18**.

Tableau 18: Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelques antibiotiques (moyenne \pm écart type).

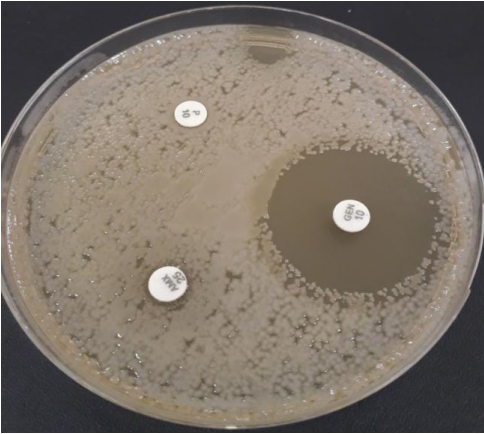
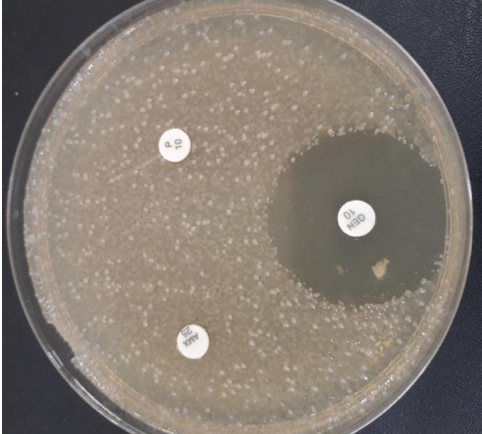
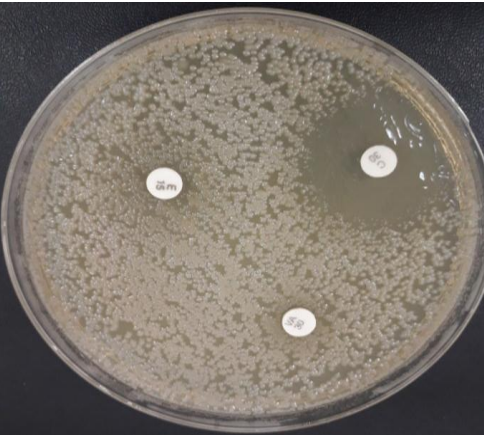
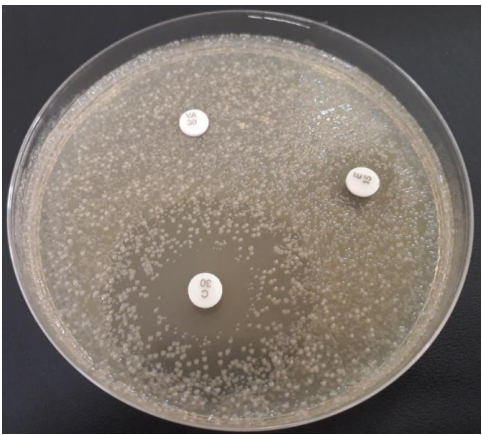
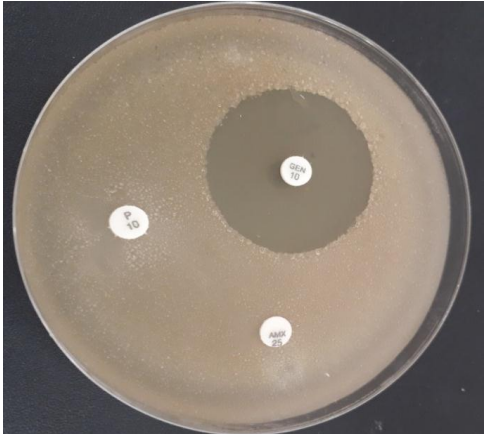
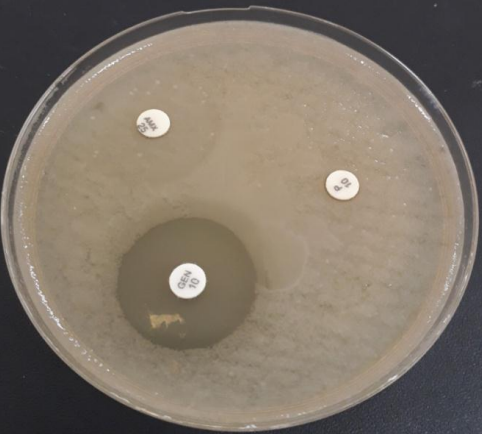
	<i>E. coli</i> (K 12)	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA)
Gentamicin (10 µg)	31,8 ± 0,748	30,4 ± 0,49	27,2 ± 0,40	27,6 ± 0,49	36,6 ± 0,49	25 ± 0,63
Penicillin G (10 µg)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Amoxicillin (25 µg)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Vancomycin (30 µg)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	29,4 ± 0,49	0 ± 0
Erythromycin (15 µg)	10 ± 2,10	0 ± 0	9,6 ± 0,80	10 ± 0,63	0 ± 0	7,2 ± 0,75
Chloramphenicol (30 µg)	18,6 ± 0,80	26,2 ± 1,94	14,6 ± 0,80	26 ± 0,63	16,2 ± 1,17	12,2 ± 1,17

Tableau 19 : Détermination de la résistance et de la sensibilité des souches de références aux antibiotiques.

	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> K12	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA)
Chloromphénicol (30 mcg/disc)	S	R	R	S	R	R
Amoxicillin (25 mcg/disc)	R	R	R	R	R	R
Pénicillines (10mcg/disc)	R	R	R	R	R	R
Erythromycine (15 mcg/disc)	R	R	R	R	R	R
Gentamycine (10 mcg/disc)	S	S	S	S	S	S
Vancomycine (30 mcg/disc)	R	R	R	R	S	R

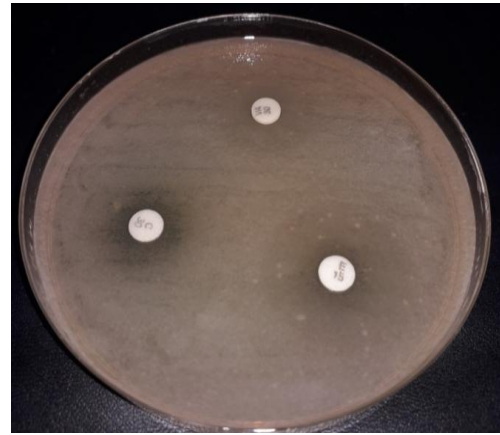
Tableau 20 : Effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	E.K 12
------------------------------------	--------

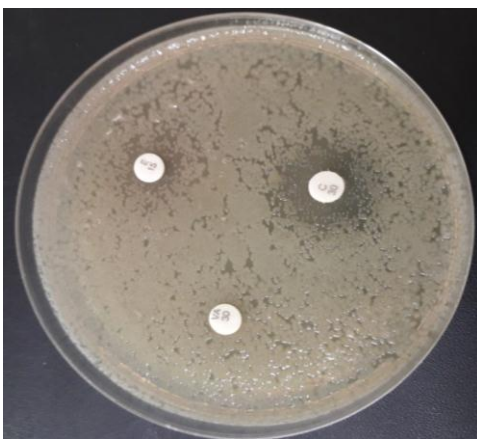
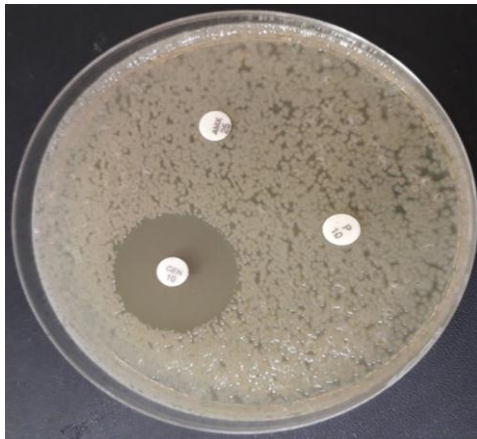
	
	
<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300</p>
	



Enterococcus faecalis ATCC 29212



Klebsiella pneumoniae ATCC 27853



Conclusion
et
perspective

Notre étude indique la richesse potentielle du test de l'oursin *Paracentrotus lividus* en molécules bioactives. Les résultats obtenus, nous ont permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau des pigments naphthoquinones d'oursin *Paracentrotus lividus*. De même, les résultats révèlent la présence de quatre groupes chimiques : saponosides, polyphénol, C-hétérosides et de flavonoïdes, avec une absence des tanins, anthocyanes, O-hétérosides, Terpènes et stéroïdes, mucilage, alcaloïdes, Anthraquinones libres, leuco anthocyanes et les composés réducteurs.

Ainsi, nos résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes montrent une teneur plus élevée en polyphénols totaux par rapport aux teneurs des flavonoïdes.

Vu l'importance de ces résultats, Il est intéressant de développer dans l'avenir des recherches plus approfondies comme :

- ✓ Tester l'activité antibactérienne et activité antifongique.
- ✓ Dosage des constituants bioactifs.
- ✓ Utiliser des souches pathogènes.

Référence
bibliographique

A

- Akerina, F.O., Nurhayati, T., Suwandy, R., 2015.** Isolation and characterization of antibacterial compounds from sea urchin. *JPHPI.*, 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.
- Andreu, M., Mainardi, J.L., 2003.** Que doit-on connaître de la microbiologie pour prescrire un antibiotique ? *Rev. Prat.* ,53: 1545-1553.
- Artini, P.E.U.D., Astuti, K.W., Warditiani, N. K., 2013.** Uji fitokimia ekstrak etil asetat rimpang bangle (*Zingiber purpureum* ROXB). *J. Farmasi FMIPA Univ. Udayana.*, 2 :1-7.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. & Monteil H., 2000.** Bactériologie clinique, Ellipses 2^{ème} édition, Paris, France, 602 p.
- Avril, J.L., François, D., Henry, M., Henry, D., 1992.** Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Edition Ellipses-Marketing. p168.
- Azevedo, J., Fernandes, I., Faria, A., Oliveira, J., Fernandes, A., de Freitas, V., Mateus, N., 2010.** Antioxidant properties of anthocyanidins, anthocyanidin-3-glucosides and respective portisins. *Food Chemistry*, 119: 518-523.

B

- Baerwolf,S.,G.C.,Behnke,M.,Weist,K.,Witte,W.,Klare, I., Jonas, D., Rueden, H., Gastmeier, P., 2002.** Correlation between transmissions and the nosocomial infection rate in five different intensive care units in a German university hospital. The society for healthcare epidemiology of america 12th annual scientific meeting. Abstract 216 (Poster).

- Bald J., Borja A., Garmendia J.M., Rodríguez J.G., Galparsoro I., 2007.** Evaluación de la biomasa submareal de erizo y anémona entre el municipio de Elantxobe y el Cabo de Santa Catalina (Bizkaia, País Vasco) : un análisis para su futura explotación y gestión. 351BI20070011. Informe inédito para la dirección de Pesca y Acuicultura del Gobierno Vasco, 102 p.
- Ballesteros, E., Garcia-Rubies, T., 1987.** La pêche aux oursin 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. pp. 335 - 362.
- Barnabé, G., 1989.** Aquaculture. 2ème édition. Vol. 1. Technique et documentation. Edition Lavoisier. France. p.1308.
- Barnes, D.K.A. et Crook, A.C., 2001.** Quantifying behavioural determinants of the coastal European sea-urchin *Paracentrotus lividus* .Marine biology, 138:1205-1212.
- 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.
- Belkhedim, Leila., 2009** – Contribution à l'étude de la biologie de l'oursin régulier *Paracentrotus lividus* (Lmk, 1816) du port d'Oran et d'Ain Franin. Mémoire de Magister, Université d'Oran, 110p.
- Benarous, K. ,2006.** Effets des extraits de quelques plantes médicinales locales sur les enzymes alpha amylase, trypsine et lipase. Mémoire d'Ingénieur d'état.
- 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.
- Boué, H., Chanton, R., 1978** .Zoologie I, Invertébrés. Ed. Doin, Paris, 713 p.

Brisson, L., 2018. Apprivoisement de l'hôte et domestication de sa flore commensale: antibiorésistance des *E.coli.* isolées des fèces d'animaux sauvages captifs et non captifs. Thèse de Doctorat. L'Université Claude Bernard Lyon I, Fr., 126 p.

Bruneton, J., 2009. Pharmacognosie – Phytochimie, Plantes médicinales, Tec & Doc, Médicales internationales (Eds.), 4ème Edition.

D

Darsono, P., 1986. In: 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*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science. 246.

Davidson, A., 1981. Poisson de la Méditerranée. Edition Edisud. France. p.318.

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. (2007). microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de controle sanitaire. paris : Lavoisier.p.476.

Delarras, C., Trébaol, B., Durand, J., 2010. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : Réglementation-Micro-organismes-Prélèvements-Analyse. 2ème édition. Tec et Doc. Lavoisier. p.542.

Descloux, E., T. Perpoint, T. Ferry, G. Lina, M. Bes, F. Vandenesch, I. Mohammedi, and J. Etienne. 2008. One in five mortality in non-menstrual toxic shock syndrome versus no mortality in menstrual cases in a balanced French series of 55 cases. Eur. J .Clin .Microbiol. Infect .Dis., 27:37-43.

Dong, Y., Chellius, M.K., Brisse, S., Kozyrovska, G., Triplet, E.W., 2003. Comparisons between two *Klebsiella*: the plant endophyt *K.pneumoniae* 342 and clinical isolate *K.pneumoniae* MGH78578. J. Symbiosis, 35: 247-259.

Ducluzeau, R., and Raibaud, P., 1985. Microbial ecology of the digestive system. *Agressologie: revue internationale de physio-biologie et de pharmacologie appliquées aux effets de l'agression.* 26 (2):161-163.

F

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.

Fernandez, C., 1996. Croissance et nutrition de *Paracentrotus lividus* dans le cadre d'un projet aquacole avec alimentation artificielle .Thèse de doctorat. Université de Corse, Fr., 278 p.

Fernandez, C., Boudouresque, C., 2000. Nutrition of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fed different artificial food. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 204:131-141.

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.

G

George, M., Garrity, Julia, A .Bell et Timothy, G., Lilburn, 2004. Taxonomic Outline of the Procaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, 401 p.

Goh, H.M.S., Yong, M.H.A., Chong, K.K.L., Kline, K.A., 2017. Model systems for the study of Enterococcal colonization and infection. *Virulence*. 8(8):1525- 1562.

Gordon, D. M., and A. Cowling. 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 149 (12):3575-3586.

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 *Paracentrotus 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.

Guillemot, D., Leclercq, R., 2005. Impact de l'exposition des populations sur le risque de résistance bactérienne. *Med. Mal. Infect.* , 35 (3): 212-220 .

H

Hébert, L., 2008. Etude de la résistance au lysozyme chez *Enterococcus faecalis*. . Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Caen, Fr. p 158.

Hou ,Y., Carne, A.Mc.,Connell ,M., Mros, S., Vasileva, E.A., Mishchenko, N.P., et al. ,2020.PHNQ from *Evechinus chloroticus* Sea Urchin Supplemented with Calcium Promotes Mineralization in Saos-2 Human Bone Cell Line. *Mar. Drugs*. , 18 :1-25.

J

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.

Jiao, H., Shang, X., Dong, Q., Wang, S., Liu, X., Zheng, H. et al., 2015. Polysaccharide Constituents of Three Types of Sea Urchin Shells and Their Anti-Inflammatory Activities. Mar .Drugs. , 13(9):5882-900.

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

K

Kaper, J. B., Nataro, J. P. And Mobley, H. L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat .Rev .Microbiol., 2(2): 123-140.

Kempf, M., 1962. Recherches d'ecologie comparee sur *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* (L.). Rec Trav Stn Mar Endoume., 25:47-116.

L

Lawrence, J.M., 2013. Sea urchins : biology and ecology. 3rd edition, Dev. Fish. Sci., 38 : 297 - 319.

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. pp. 335 - 362.

Le Gall, P. (1989).Echinoculture. pp: 468-491. In : BARNABÉ, G. (ed.). Aquaculture, vol.1, 2nded. Lavoisier Tech and Doc, Paris.

Le Gall, P., 1987. La pêche des oursins en Bretagne. In : Boudouresque, C.F. (Ed), Colloque international sur *Paracentrotus lividus* et les oursins comestibles .GIS Posidonie Publ., Marseille, pp. 331-324.

Levy, S.B.and Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.*, 10: 122-129.

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.

M

Martin, R.M., Bachman, M.A., 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 08: 1-15.

Médart, J., 2009. Manuel pratique de nutrition: l'alimentation préventive et curative. 2ème édition. Edition de Boeck Université. 293p .

O

Oulymata G. (2007). Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a gram négatif. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 120p.

P

Pereira DM, Valentão P, Andrade PB (2014) Marine natural pigments: chemistry, distribution and analysis. *Dyes Pigm* 111:124–134.

Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev.*, 11(4):589- 603.

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.

Prescott., Harley ., Klein., Wiley., Sherwood., woolverton. (2010). Microbiologie (chapitre 36 : l'épidémiologie des maladies infectieuses). 3ème édition. Paris : Boeck université, pp. 908.

R

Rebiahi S. (2012). Caractérisation de souches des Staphylococcus aureus et étude de leur antibiorésistance au niveay du centre hospitalo-universitaire de Tlemcen. Thèse de doctorat. Université de Tlemcen.P :3.

Régis, M.B., 1978. Croissance des deux Echinoides du Golf de Marseille (*Paracentrotus lividus* (Lmk) et *Arbacia lixula*, L) Aspects écologique de la microstructure du squelette et de l'évolution des indices physiologiques .Thèse de Doctorat d'état, Univ .Aix –Marseille III, Marseille Fr., 221 p.

Régis, M.B., 1979. Analyse des indices physiologiques chez deux échinoides *Paracentrotus lividus* (Lmk) et *Arbacia lixula* (L.) du golfe de Marseille. Téthys, 9 : 167 - 181.

Rico, M.C., Hernández, L., Fernández, M., González, M.J., Montero, M., 1989. Organochlorine contamination in water of the Doñana National Park. Water Res., 23: 57 - 60.

Rico, V. (1989).Contribution à l'étude des Preferenda Alimentaires et du Comportement Moteur de l'Oursin Régulier *Paracentrotuslividus*. Diplôme Etudes Approfondies Océanographie, Université Aix-Marseille 2, Marseille.

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.

Ruppert, E.E., Barnes, R.D., 1994. Invertebrate zoology. 6th edition. Saunders college publishers. Philadelphia. P.592. In: Grosjean, P., 2001. Growth model of the reared

sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). Doctoral thesis. Option: agronomic sciences and biological engineering. Free university of Brussels. Belgium. p. 272.

S

Sandhar H K, Kumar B , Prasher S, Tiwari P, Salhan M and Sharma P; 2011. A Review of Photochemistry and Pharmacology of Flavonoids. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1), 25-41.

Sekhri, A., 2011. Fréquence et marqueurs épidémiologiques de *Klebsiella pneumoniae* dans les services à haut risque infectieux au niveau du CHU Benbadis de Constantine. Thèse de Doctorat .Univ Mentouri de Constantine. Alger, 186 p.

Shikov, A.N., Pozharitskaya, O.N., Krishtopina, A.S., Makarov, V.G., 2018. Naphthoquinone pigments from sea urchins: chemistry and pharmacology. *Phytochem Rev.*, 17 (3):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*. *IOP. Conf., Series: Earth and Environmental Science.*, 246 012040.

Smati, M., O., Clermont, A., Bleibtreu, F., Fourreau, A., David, A.S., Daubie, C., Hignard, O., Loison, B., Picard, and Denamur, E., 2015. Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen*. 4 (4):604-615.

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.

Souidi. H, 2008 – Evaluation du niveau de la pollution bactériologique chez un échinoderme l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) dans la cote oranaise orientale. Mémoire de Magister, université d'Oran, 111p.

Soussy, C.J., 2007. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Monographies en urologie. p. 21-46.

Stevens M, Ruxton GD (2011) Linking the evolution and form of warning coloration in nature. Proc R Soc B Biol Sci 279:417–426.

Stewart et al. Plos Biology February 2015.

T

Tifour et Bahoussi ,2005 – contribution à l'étude des caractères biométrique de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck ,1816) dans la baie de Mostaganem ,82p.

Tomšić, S., Conides, A., Radić, I.D., Glamuzina, B., 2010. Growth, size class frequency and reproduction of purple sea urchin, *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) in Bistrina Bay (Adriatic Sea, Croatia)., p 12.

Tortonese, E., 1965. Fauna d'Italie. *Echinodemata*. Vol. I. Edizioni Calderini. Bologna. p.422.

Tortora, G.J., Funke, B.R. et Case, C.L. ,2003. Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique. Canada. 968p.

V

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., Fr., pp.5 - 36.

y

Yokota, Y. 2002. Fishery and consumption of the sea urchin in Japan. In *The sea urchin: from basic biology to aquaculture*, pp. 129-138. Ed. by Yukio Yokota, Matranga, and Zuzana Smolenicka, Swets & Zeitlinger. Lisse, The Netherlands. 231 pp.

Annexes

Annexe 1 :

- Composition des milieux de culture

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 sodium75 g Mannitol :.....10 g Rouge de phénol0,025 g Agar Agar 15 g Eau distillée1000 ml pH = 7,4
Gélose Muller Hinton	Infusion de viande de bœuf (déshydratée)300 g Hydrolysate de caséine017,5 g Amidon01,50 g Eau distillée1000 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 caséine17,5 g Amidon01,50 g Eau distillée1000 ml

	pH = 7,5	
Gélose Mac Conkey	peptone20,0 g	
	sucres 10,0 g	
	sels biliaires n° 3..... 1,5 g	
	cristal violet0,001 g	
	rouge neutre0,05 g	
	chlorure de sodium5,0 g	
	Agar-agar..... 15,0 g	
	Eau distillée1000 ml	
		pH = 7,1

Annexe 2 :

- Courbe d'étalonnage d'acide gallique :

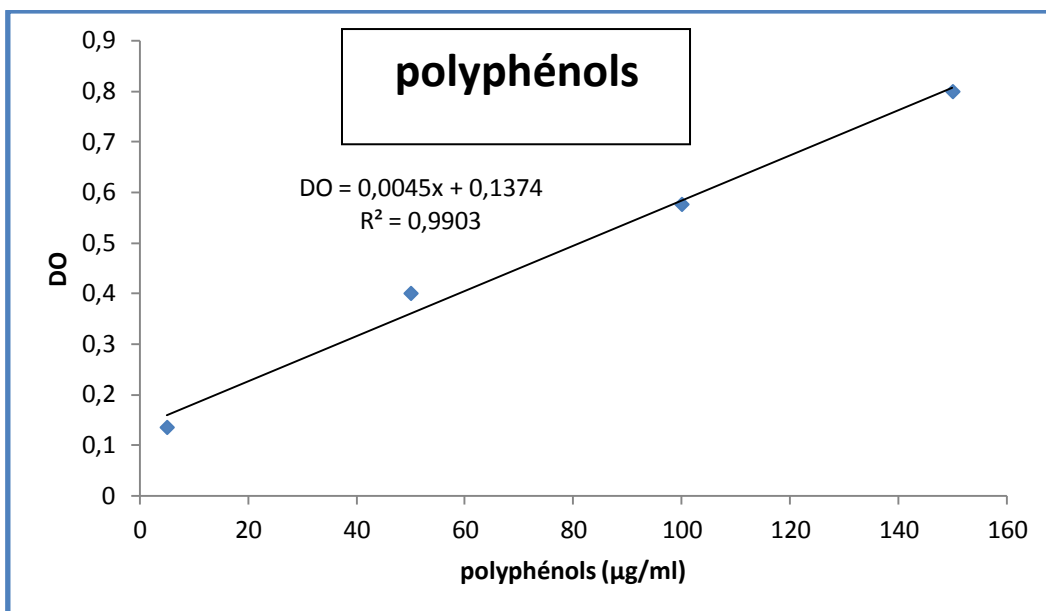


Figure I. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols.

- Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes :

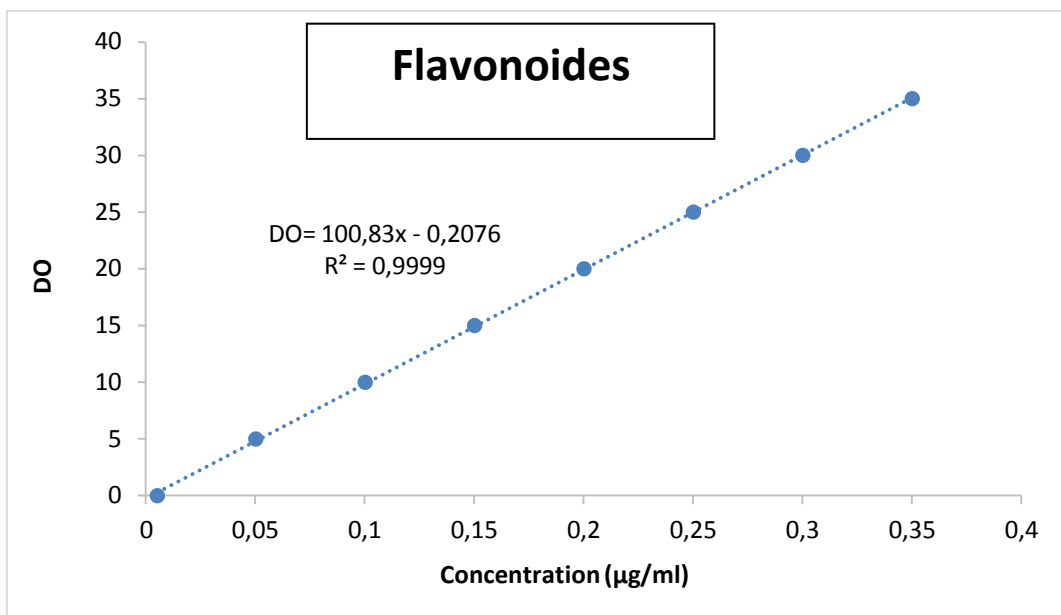


Figure II. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.