

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 : Microbiologie appliquée
Département : Écologie et Génie de l'Environnement

Intitulé

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

Présenté par

Melle Doukhi Bochra
Melle Gheribi Safa

Devant le membre du jury

Dr. Messiad Raouhia
Dr. Amri Sandra
Dr. Benhalima Lamia

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

2020

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

Madame Messiad Raouhia

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 Amri Sandra

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.*

DÉDICACES

*Je dédie ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers,
À mon père « khemissi » et ma mère « zehira », pour tout l'amour et le
soutien qu'ils m'ont donné. Aucune dédicace ne saurait exprimer
l'amour, L'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour
vous. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as Consentis pour
mon éducation et ma formation. Toute ma gratitude et avec mon
respect*

Mes chers frères : Salim, Mounir, Zidan, Faysal, et Toufik

Mes chères sœurs : Radia et Chahira

A tous les membres de la famille Doukhi, petits et grands

*Avec fierté et respect Je dédie aussi ce mémoire à toutes mes chères
amies (**Safa, Khadija, Hanane**)*

*A mon ami distingué qui me tient à cœur qui ne s'ennuie jamais de
m'encourager jusqu'à la fin*

*Enfin a toute personne qui m'ont encouragée ou aidée toute au long
de mes études.*

«D.Bouchra»

Dédicace

Je dédie ce mémoire qui n'aura jamais pu voir le jour sans les soutiens indéfectibles et sans limite de mes chers parents qui ne cessent de me donner avec amour le nécessaire pour que je puisse arriver à ce que je suis aujourd'hui. Que dieux vous protège et que la réussite soit toujours à ma portée pour que je puisse vous combler de bonheur.

Je dédie aussi ce travail à...

Mes sœurs : Ibtissem, Leyla.

Mes chers amis : Bouchra, Hanane, Khadija.

Toutes mes amies et collègues.

Toute ma famille.

Tous ceux que j'aime.

« Gh. Safa »

Liste des abréviations

%	Pour cent
°C	Degré Celsius
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AlCl₃	Chlorure d'aluminium
ARN	Acide ribonucléique
ATCC	American Type Culture Collection
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
Cm	Centimètre
DMSO	Diméthyle Sulfoxyde
FeCl₃	Chlorure Ferrique
H₂SO₄	Acide Sulfurique
HCL	Acide Chlorhydrique
g	Gramme
M	Mètre
Mg/ml	Milligramme par millilitre
ml	Millilitre
Mm	Millimètre
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline
Na₂CO₃	Carbonate de Sodium
NaCl	Chlorure de Sodium
NH₄OH	Ammoniaque
Nm	Nanomètre
ONPG	Orthonitrophényl-β-galactosidase
pH	Potentiel d'hydrogène
UFC	Unité Formant Colonie
µg/ml	Microgramme/Gramme
µg / g	Microgramme/gramme
µl	Microlitre
µm	Micromètre
VP	Voges –Proskauer

Liste des tableaux

N°	Titre	Page
01	Noms vernaculaires de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i>	07
02	Description et fonction des appendices de test d'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	08
03	Taxonomie d' <i>Escherichia coli</i>	13
04	Principaux caractères d' <i>Escherichia coli</i>	14
05	Taxonomie de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
06	Principaux caractères de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
07	Taxonomie d' <i>Enterococcus faecalis</i>	16
08	Principaux caractères d' <i>Enterococcus faecalis</i>	17
09	Taxonomie de <i>Staphylococcus aureus</i>	18
10	Principaux caractères <i>Staphylococcus aureus</i>	19
11	Classification biochimique des antibiotiques.....	20
12	Aspects, couleurs et rendements des extraits du test de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	34
13	Dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans l'extrait du test de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	35
14	Caractérisation chimiques des pigments naphthoquinone de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	35
15	Tests chimiques du test de l'oursin <i>Pracentrotus lividus</i>	37
16	Aspects macroscopiques des souches de référence.....	39
17	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelque antibiotique (moyenne \pm écart type) quelques antibiotiques	41
18	Détermination de la résistance et de la sensibilité des souches de références aux antibiotiques.....	41
19	Effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.....	42

Liste des figures

N°	Titre	page
01	Distribution géographique de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	06
02	Morphologie externe de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> . (A) : Vue oral, (B) : Vue aboral.....	08
03	Anatomie interne de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	10
04	Différents modes d'action des antibiotiques.....	22
05	Procédé d'évaporation avec un évaporateur rotatif.....	24

Sommaire

Remerciements

Dédicace

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction..... 02

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Présentation de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i>	05
I.1.1.Taxonomie et description.....	05
I.1.2.Répartition géographique.....	05
I.1.3.Synonymies et noms vernaculaires.....	06
I.1.4. Anatomie.....	07
I.1.4.1. Anatomie externe.....	07
I.1.4.2 Anatomie interne.....	09
I.1.5.Mouvement et migrations.....	10
I.1.6. Respiration.....	11
I.1.7. Alimentation.....	11
I.1.8.Cycle de vie.....	11
I.1.9. Croissance et prédation.....	12
I.1.10. Intérêt économique.....	12
I.2. Résistance bactérienne aux antibiotiques.....	13
I.2.1.Les entérobactéries.....	13
I .2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	13
I .2.1.1.1.Taxonomie.....	13
I .2.1.1.2. Habitat.....	13
I .2.1.1.3.Caractères généraux.....	14
I .2.1.1.4.Pouvoir pathogène.....	14

I .2.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
I .2.1.2.1.Taxonomie.....	15
I .2.1.2.2.Habitat.....	15
I .2.1.2.3.Caractères généraux.....	15
I .2.1.2.4.Pouvoir pathogène.....	16
I.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i>	16
I.2.2.1.Taxonomie.....	16
I.2.2.2.Habitat.....	17
I.2.2.3. Caractères généraux.....	17
I.2.2.4.Pouvoir pathogène.....	17
I .2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
I.2.3.1. Taxonomie.....	18
I.2.3.2.Habitat.....	18
I.2.3.3. Caractères généraux.....	18
I.2.3.4. Pouvoir pathogène.....	19
I.2.4. Antibiotiques.....	19
I.2.4.1. Définition d'un antibiotique.....	19
I.2.4.2. Classification des antibiotiques.....	19
I.2.4.3. Mécanisme.....	20
I.2.4.4. Différents modes d'action des antibiotiques.....	21

Chapitre II : Matériels et Méthode

II.1. Matériel biologique.....	24
II.2.Extraction.....	24
II.3. Souches de référence.....	25
II.4. Milieux de culture.....	25
II.5. Tests chimiques.....	25
II.5.1. Tests préliminaires.....	25
II.5.1.1. Préparation de l'infusé à 10 %.....	25
II.5.1.2. Tanins.....	25
II.5.1.3. Anthocyanes.....	26
II.5.1.4.Leucoanthocyanes.....	26
II.5.1.5. Flavonoïdes.....	26
II.5.2. Tests sur les métabolites secondaires.....	27

II.5.2.1. Préparation d'un décocté.....	27
II.5.2.2. Saponosides.....	27
II.5.2.3. Mucilages.....	28
II.5.2.4. Composés réducteurs.....	28
II.5.2.5. Alcaloïdes.....	29
II.5.2.6. Terpènes et stérols.....	29
II.5.2.7. Dérivés anthracéniques.....	29
II.5.2.7.1. Extrait chloroformique.....	30
II.5.2.7.2. Anthraquinones libres.....	30
II.5.2.7.3. Anthraquinones combinées.....	30
II.5.3. Dosage des Polyphénols.....	30
II.5.4. Dosage des Flavonoïdes.....	31
II.7. Activité antibactérienne.....	31
II.7.1. Préparation des extraits.....	31
II.7.2. Antibiogramme.....	31
II.7.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et bactéricide.....	32

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Caractérisation chimique	34
III.1.1. Rendement.....	34
III.1.2. Dosage des flavonoïdes et polyphénols.....	34
III.1.3. Test chimiques préliminaire.....	35
III.2. Activité antibactérienne.....	39
III.2.1. Étude de l'effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.....	40
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	47
Annex.....	60

Notre travail a pour but, l'étude de la chimie ainsi que l'évaluation de l'activité antibactérienne du test de l'oursin *Paracentrotus lividus* contre de 6 souches de référence : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* K 12 ATCC 10798, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853.

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, mucilage, alcaloïdes, terpènes et stérols, anthraquinones libres, leuco anthocyanes et les composés réducteurs.

Mots clés : *Paracentrotus lividus*, souche de référence, activité antibactérienne, Screening phytochimique.

يهدف عملنا إلى دراسة الكيمياء بالإضافة إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا لوقعة قنفذ البحر *Paracentrotus lividus* ضد 6 سلالات مرجعية: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* K 12 ATCC 10798 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853.

مكننا الفحص الكيميائي من إثبات وجود مستقلبات ثانوية في أصباغ النافثوكينون لقنفذ البحر *Paracentrotus lividus* ، كشفت النتائج عن وجود أربع مجموعات كيميائية: سابونوزيدات ، بوليفينول ، سي هيتيروسيدات وفلافونويدات ، مع غياب التانينات ، الأنثوسيانين ، س- الهيتيروسيدات ، الصمغ ، القلويات، تربين وستيرول ، الأنثراكينونات الحرة ، الليوكو أنثوسيانين والمركبات المختزلة.

كلمات البحث: *Paracentrotus lividus*، السلالات المرجعية، النشاط المضاد للبكتيريا، الفحص الكيميائي النباتي.

Our work aims to study the chemistry as well as the evaluation of the antibacterial activity of the sea urchin *Paracentrotus lividus*'s test versus 6 reference strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* K 12 ATCC 10798, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853.

The chemical screening allowed 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, mucilage, alkaloids, terpenes and sterols, free anthraquinones, leucoanthocyanins and reducing compounds.

Key words: *Paracentrotus lividus*, reference strain, antibacterial activity, Phytochemical screening.

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 apprécié 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). 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 cœlomique, 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). Les pigments quinones des oursins, en particulier l'échinochrome et les spinochromes, sont connus pour leurs activités antioxydantes, antibactériennes, antifongiques et antitumorales efficaces (Ageenko *et al.*, 2014). Les oursins produisent des naphtoquinones, également appelées spinochromes ou échinochromes, qui interviennent dans la pigmentation de leurs tests, épines et organes internes. À ce jour, plus de 40 naphtoquinones ont déjà été extraites et identifiées chez les oursins (Brasseur *et al.*., 2018).

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 du test de l'oursin *Paracentrotus lividus* et d'autre part tester l'effet antibactérien vis-à-vis de 6 souches de références (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* K 12 ATCC

10798., *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 , *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 43300 , *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853) 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 du test de 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.

Recherche
bibliographique

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

I.1.1. Description et taxonomie

L'oursin est un invertébré marin appartenant à la classe *Echinoidea*, l'espèce *Paracentrotus lividus* est un oursin régulier sans bras, enfermés dans un test rigide, le dermosquelette, formé de plaques calcaires imbriquées. La bouche a une position généralement centrale sur la face inférieure du corps. Le test des oursins réguliers comprend un appareil apical et une couronne qui est formée de 10 doubles rangées méridiennes de plaques s'étendant de l'appareil apical jusqu'à l'ouverture du test à la face inférieure (Shikov *et al.* , 2018).

D'après Fischer *et al.* (1987), La classification systématique de l'oursin *Paracentrotus lividus* est comme suit :

Embranchement:	<i>Echinodermata</i>
Sous-embranchement:	<i>Echinozoa</i>
Classe:	<i>Echinoidea</i>
Sous-classe:	<i>Regularia</i>
Ordre:	<i>Diadematoidea</i>
Sous-ordre:	<i>Camarodonta</i>
Famille:	<i>Echinidae</i>
Genre:	<i>Paracentrotus</i>
Espèce:	<i>lividus</i>

I .1.2.Répartition géographique

L'oursin *Paracentrotus lividus* présente une vaste distribution géographique (Fig.01), c'est une espèce qui colonisent des biotopes très hétérogènes comme les fonds rocheux, les herbiers de posidonies et parfois des fonds sableux (Allain, 1975). Cet invertébré est largement distribué en Méditerranée où il est abondant. En Atlantique, ses limites de répartition sont, vers le nord, les côtes d'Ecosse et les côtes sud et ouest de l'Irlande (Southward et Crisp, 1954), vers le sud, le Sahara espagnol (Mortensen, 1943). Ainsi qu'aux îles Canaries et aux Açores (Tortonese et Vadon, 1987). Cet espèce est présent dès la zone intertidale jusqu'à - 80 mètres. Sa densité décroît avec la

profondeur et les plus fortes densités sont observées entre 0 et 10 mètres (**Lecchini et al., 2002**). Ils vivent principalement dans les régions tempérées ou les conditions thermiques océaniques compris entre 10 et 15 °C en hiver et 18 et 25 °C en été (**Jacinto et al., 2013**).

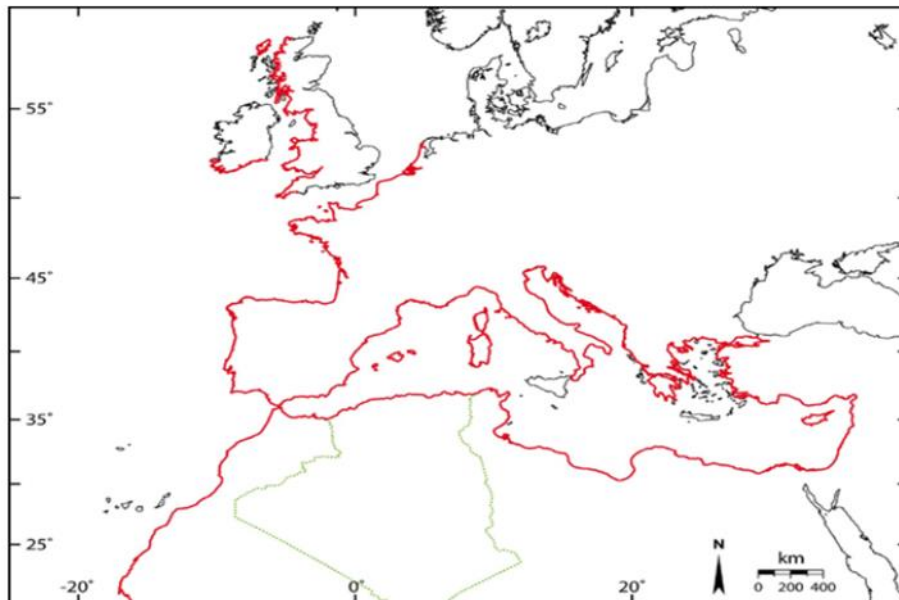


Figure 01 : Distribution géographique de l'oursin *Paracentrotus lividus* (**Soualili, 2008**).

I.1.3.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 01 (Davidson, 1981 ; Fischer *et al.*, 1987)**.

Tableau 01 : 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.1.4. 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. 02**), 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) ; Regis (1979) ; Le Gall (1989)**, le test (ou dermosquelette) possède différent appendices (**Tableau 02**).

Tableau 02 : 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) - Pédicellaire globifères (glandulaires) - Pédicellaires ophiocéphales	Capture des proies, le nettoyage du test, la défense et empêche les petits organismes de s'y fixer

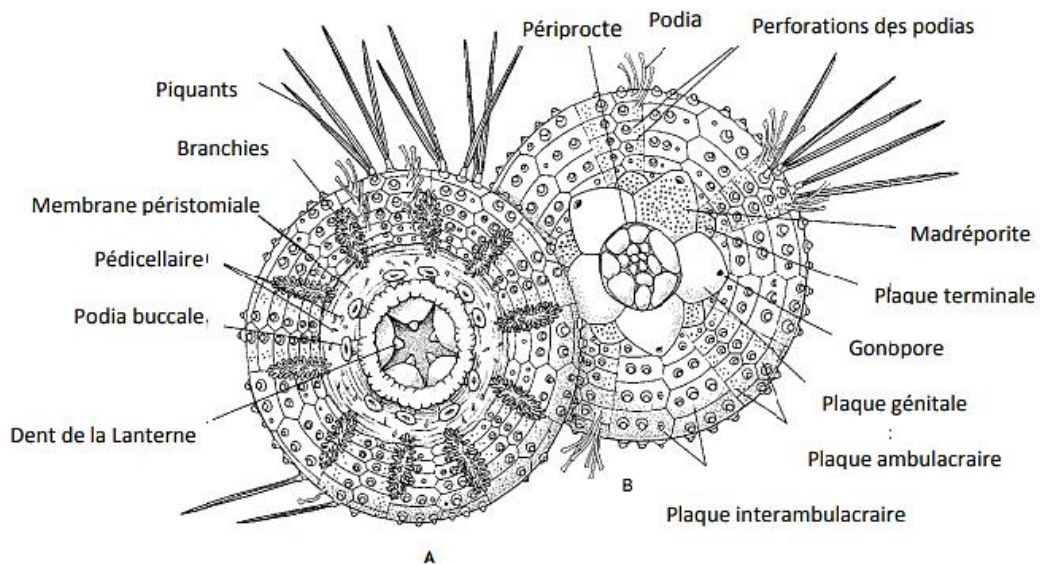


Figure 02 : Morphologie externe de l'oursin *Paracentrotus lividus*. (A) : Vue oral, (B) : Vue aboral (**Ruppert et Barnes, 1994**).

I.1.4.2. Anatomie interne

Intérieurement (**Fig.03**), 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 logeant 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**).

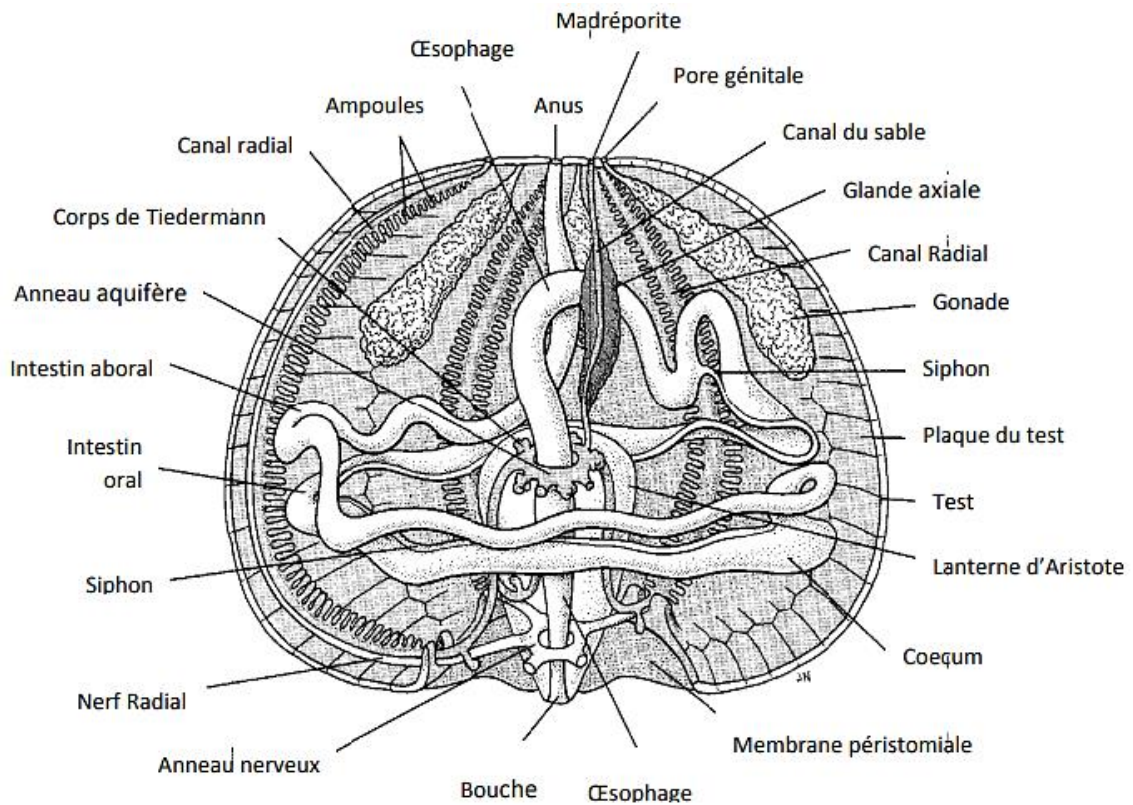


Figure 03 : Anatomie interne de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Grosjean, 2001).

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 entrainer 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 (**Regis, 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 (**Regis, 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*

Escherichia coli est un type de coliforme fécal faisant partie des bactéries retrouvées dans les intestins de l'Homme et d'animaux à sang chaud. La plupart des *Escherichia coli* sont inoffensifs et ont une fonction utile dans le corps en arrêtant la croissance des espèces bactériennes nuisibles et en synthétisant des vitamines nécessaires (vitamines K), qui aide à la coagulation sanguine (Avril *et al.*, 1992).

I.2.1.1.1. Taxonomie

La classification systématique d'*Escherichia coli* est représentée dans le **tableau 03** (Delarras *et al.*, 2010).

Tableau 03: Taxonomie d'*Escherichia coli*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Entérobactérie</i>
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 04** (Clave, 2012 ; Oulymata, 2007).

Tableau 04 : Principaux caractères d'*Escherichia coli*.

Caractères morphologique	Coccobacilles à Gram négatif, asporulée mesurant 2 à 4 µm de long sur 0,4 à 0,6 µm de large, bactérie fine et allongée à extrémité arrondie. Mobile grâce à une ciliature péritriches.
Caractères cultureux	Aéroanaérobies facultatifs, culture facile sur milieux ordinaires, lactosés. Sur milieux solides après 18-24h les colonies sont arrondies, lisses, à bords réguliers, de 2 à 3 mm de diamètre. Pousse sur milieux sélectifs pour entérobactéries type Mac Conkey, Drigalski.
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 pathogenèse 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 05** (George *et al.*, 2004).

Tableau 05 : 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 06** (sekhri, 2011).

Tableau 06 : 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 cultureux	Aéro-anaérobies, la température optimale de croissance est de 37 °C. Se développe sur les milieux classiques d'isolement (Gélose Hektoen, Mac Conkey).
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*

Enterococcus faecalis est une espèce ubiquitaire, isolé de nombreuses niches différentes. Il a été largement étudié en tant que commensal intestinal commun et pathogène nosocomial (**He et al., 2018**).

I.2.2.1. Taxonomie

La classification systématique d'*Enterococcus faecalis* est représentée dans le **tableau 07 (Delarras et al., 2010)**.

Tableau 07 : Taxonomie d'*Enterococcus faecalis*.

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Lactobacillales</i>
Famille	<i>Enterococcaceae</i>
Genre	<i>Enterococcus</i>
Espèce	<i>Enterococcus faecalis</i>

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 08** (Avril *et al.*, 1992).

Tableau 08 : Principaux caractères d'*Enterococcus faecalis*.

Caractères morphologique	Cocci, Gram positifs, non sporulantes, rond, diplocoque, chaînette elles sont immobile. La taille est environ 0,6 – 2,5µm de diamètre.
Caractères cultureux	Anaérobie facultatif (peuvent se développer en aérobiose). 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.
Caractères biochimique	Catalase -, oxydase - .

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 sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses de l'homme et de l'animal. L'homme est le principal réservoir naturel de *Staphylococcus*, il présente un portage sain, principalement au niveau des cavités nasales. Chez l'homme, les staphylocoques en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis* font partie de la flore résidente cutanée de nombreux individus qui sont des « porteurs asymptomatiques » (Wylie et al., 2005).

I.2.3.1. Taxonomie

La classification systématique de *Staphylococcus aureus* est représentée dans le **tableau 09** (Delarras, 2007).

Tableau 09 : 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 10** (Flandrois, 1997).

Tableau 10 : Principaux caractères *Staphylococcus aureus*.

Caractères morphologique	Cocci à Gram positive d'environ 1 µm de diamètre, se disposant le plus souvent en amas ou grappes. Ils sont immobiles et ne produisent pas de spores.
Caractères culturaux	Aéro-anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en milieu ordinaire entre 10 et 42 °C, avec un optimum thermique à 37 °C et à un pH compris entre 7,4 et 7,6. <i>Staphylococcus aureus</i> possède également la faculté de se multiplier sur milieux sélectifs hyper salés.
Caractères biochimique	Oxydase -, catalase +, Coagulase+.

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 11**).

Tableau 11 : 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 triméthoprim
Streptogramines	Pristinamycine, Virginiamycine
Tetracyclines	Tetracycline minocycline
Vancomycines	Vancomycine

I.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 **Andreuet 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.04**) : 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).

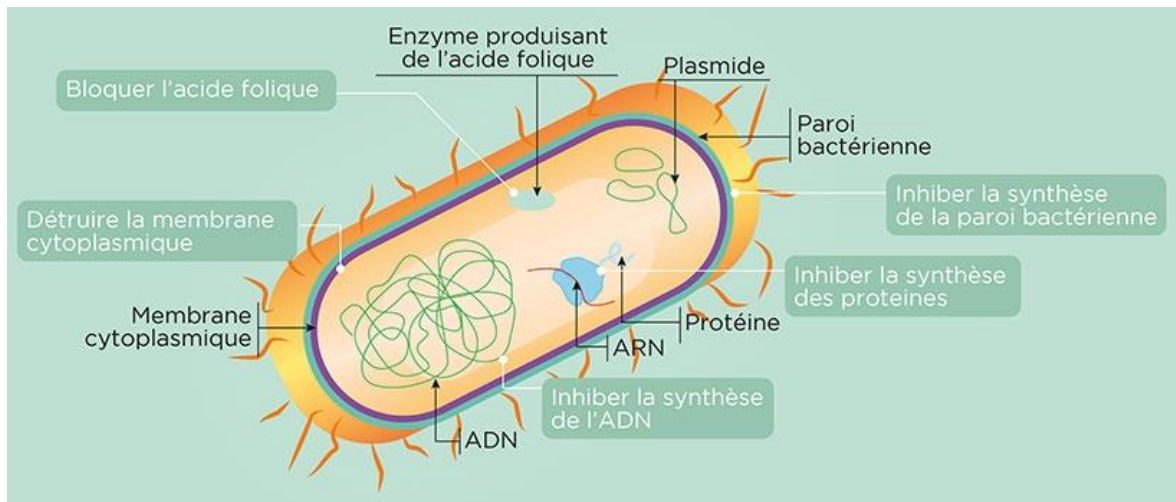


Figure 04 : Différents modes d'action des antibiotiques (Brisson, 2018).

Matériels

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 incubées 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 les solvants d'extractions, puis conservés dans des flacons stériles hermétiquement fermés.



Figure 05: 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* ATTC 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, 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 a 100 ml.

II.5.1.2. Tanins

Les tanins sont des composants polyphénoliques présents naturellement dans les végétaux. Après la cellulose, les hémicelluloses et la lignine, les tanins sont le quatrième composant de la biomasse (**Hernes and Hedges, 2000**). D'après la méthode d'**Edeogal et al. (2005)**, l'identification des tanins a été réalisée comme suit :

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*). D'après la méthode d'*Edeogal et al. (2005)*, l'identification des anthocyanes a été réalisée comme suit :

La recherche des anthocyanes 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.

I.5.1.4. Leucoanthocyanes

D'après la méthode d'*Edeogal et al. (2005)*, l'identification des leucoanthocyanes a été réalisée 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 leucoanthocyanes.

I.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*). D'après la méthode d'*Edeogal et al. (2005)*, l'identification des flavonoïdes a été réalisée comme suit :

- **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 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 leucoanthocyane, 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 NH₄OH. Un test positif est révélé par l'apparition d'une couleur jaune dans la partie supérieure de tube à essai.

II.5.2. Tests sur les métabolites secondaires

II.5.2.1. 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.5.2.2. 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**). D'après la méthode d'**Karumi et al. (2004)**, l'identification des saponosides a été réalisée comme suit :

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.5.2.3. Mucilages

Les mucilages sont des macromolécules osidiques qui se dissolvent plus au moins au contact de l'eau pour former des solutions colloïdales ou des gels. Ils ont considérés comme des constituants cellulaires normaux, préexistants dans des formations histologiques spéciales (**Bruneton, 2012**). D'après la méthode d'**Karumi et al. (2004)**, l'identification des mucilages a été réalisée 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.5.2.4. Composés réducteurs

D'après la méthode (**Karumi et al., 2004**), l'identification des composés réducteurs a été réalisée 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.5.2.5. Alcaloïdes

Un alcaloïde est un composé organique naturel (le plus souvent d'origine végétales), hétérocyclique avec l'azote comme hétéroatome, de structure moléculaire complexe plus ou moins basique et doué de propriétés physiologiques prononcées même a faible dose (**Zenk et Juenger, 2007**). D'après la méthode d'**Edeogal et al. (2005)** l'identification des alcaloïdes été réalisée comme suit :

Nous avons procédé à une macération sous agitation pendant 24 heures de 5 g de poudre 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 ajouté. La présence d'une turbidité ou d'un précipité blanc jaunâtre, après 15 minutes indique la présence d'alcaloïdes.

II.5.2.6. Terpènes et stérols

Les terpénoïdes et les stéroïdes constituent probablement la plus large classe de composés secondaires. Comme les dérivés des acides gras, telles les acétogénines. Formés à partir de l'assemblage d'unités à 5 carbones ramifiées, dérivées du 2-méthylbutadiène (polymères de l'isoprène) (**Krief, 2003**). D'après la méthode (**Karumi et al., 2004**), l'identification des composés réducteurs a été réalisée comme suit :

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.5.2.7. Dérivés anthracéniques

Les dérivés anthracéniques appartiennent au groupe des quinones. Ils se caractérisent par leurs pouvoirs antioxydants élevés (**Daira et al., 2016**).

II.5.2.7.1. 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 complété à 10 ml.

II.5.2.7.2. Anthraquinones libres

A 1 ml de l'extrait chloroformique nous avons ajouté 1 ml de NH_4OH (dilué à $\frac{1}{2}$) puis agité. Une coloration plus et moins rouge indique la présence d'antraquinones libres.

II.5.2.7.3. Anthraquinones combinées

➤ **O- hétérosides** : A partir de l'extrait chloroformique, nous avons préparé un hydrolysats 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'hydrolysats 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 NH_4OH (dilué à $\frac{1}{2}$) et agiter. La présence d'antraquinones est révélée par la coloration rouge plus ou moins foncée. La réaction peut être plus poussée par addition à 5 ml de l'hydrolysats 3 à 4 gouttes de FeCl_3 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 FeCl_3 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 $\frac{1}{2}$). Une coloration rouge plus ou moins intense indique la présence de génines C-hétérosides.

II.5.3. 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**). Selon la méthode de (**Wong et al., 2006**). Le dosage de polyphénols a été effectué comme suit :

Nous avons pris 200µl 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 Na₂CO₃ (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 µg/ml).

II.5.4. Dosage des Flavonoïdes

Selon (**Djeridane et al., 2006**) Le dosage des flavonoïdes a été effectué comme suit :

La méthode de trichlorure d'aluminium (AlCl₃), Nous avons pris 1 ml d'extrait a été ajouté à un volume égal d'une solution d'AlCl₃ (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 µg/ml) dans les mêmes conditions que l'échantillon.

II.7. Activité antibactérienne

II.7.1. Préparation des extraits

L'extrait sec préparés au paravent (méthanolique (S1)) sont repris dans du DMSO à raison de 200 mg/ ml.

II.7.2. 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 10⁶ 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 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 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
Discussions

III.1. Caractérisation chimique

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 12**.

Tableau 12 : 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 des polyphénols

Les résultats obtenus pour le dosage des polyphénols et des flavonoïdes sont rapportés dans le **tableau 13**. Nos résultats montrent une teneur plus élevée en polyphénols totaux ($3,62 \pm 0,09$ µg/g de poudre) par rapport aux teneuses des flavonoïdes ($1,54 \pm 0,02$ µg/g de poudre).

Tableau 13 : Dosage des polyphénols et des flavonoïdes dans le test de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

Composé	Concentration
Polyphénols (µg/g de poudre)	$3,62 \pm 0,09$

Flavonoïdes (µg/g de poudre)	1,54±0,02
-------------------------------------	-----------

III.1.3. Test chimiques préliminaire

Le résultat de screening chimique obtenus sur les pigments naphthoquinone de l'oursin *Paracentrotus lividus* a mis en évidence la présence de quatre groupes chimiques. (Tableau 14 et 15).


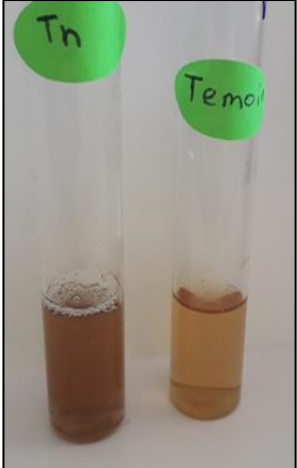
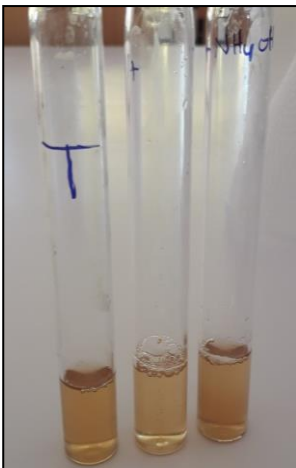
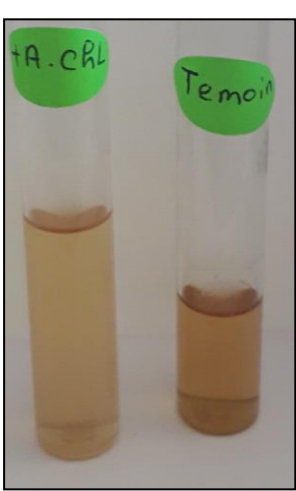


Tableau 14 : Caractérisation chimiques du test de l'oursin *Paracentrotus lividus*.

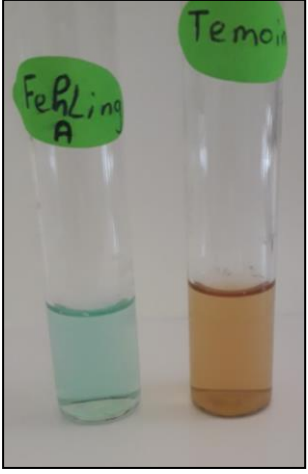
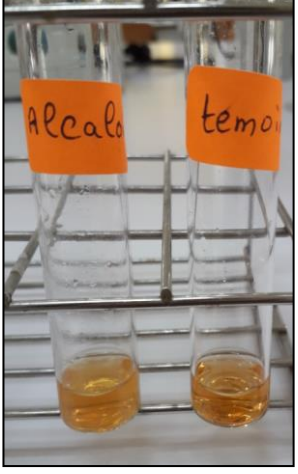

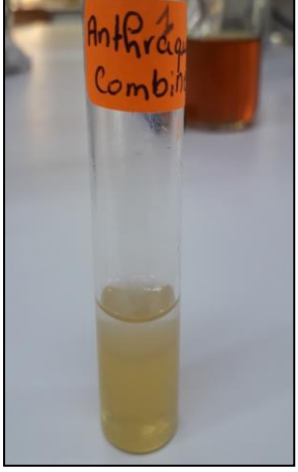



Tests chimiques	Résultats
Tanins catéchiques	-
Tanins galliques	-
Anthocyanes	-
Leucoanthocyanes	-
Saponosides	Test faiblement positif
Mucilages	-
Composés réducteurs	-
Alcaloïdes	-
Terpènes et stérols	-
Anthraquinones libres	-
O-hétérosides	-
C-hétérosides	+
Flavonoïdes	+
Polyphénol	+
(+) : Présence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

Le screening chimique nous a permis de mettre en évidence la présence des métabolites secondaires au niveau du test 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, terpènes et stérols, mucilage, alcaloïdes, anthraquinones libres, leuco anthocyanes 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 phytochimique 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 phytochimique 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 de les oursins qui sont utilisés comme matériel de recherche (**Darsono, 1986**).

Tableau 15: 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>


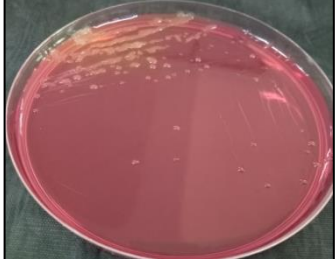
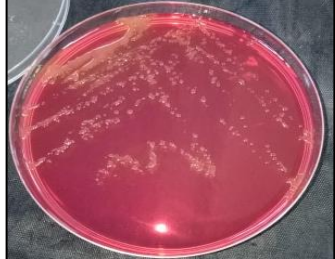
		
<p>Composés réducteurs (négatif)</p>	<p>Alcaloïdes (négatif)</p>	<p>Anthraquinones libres (négatif)</p>
		
<p>O-hétérosides (négatif)</p>	<p>C-hétérosides (positif)</p>	<p>Flavonoïdes (positif)</p>
		
<p>Terpènes et stérols (négatif)</p>		

III.2. Activité antibactérienne

Afin de vérifier leur pureté, les souches de référence sont ensemencées et repiqués sur des milieux de cultures spécifique, leurs aspects et caractérisations sont représentés dans le (tableau 16).

Tableaux 16: Aspects macroscopiques des souches de référence.

Souches bactériennes	Caractères cultureux	
<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>Petite 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>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>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>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 17 et 18**) indiquent que les 6 souches de références peuvent être sensibles ou résistantes aux antibiotiques. Les photos prises sont représentées dans le **tableau 19** :

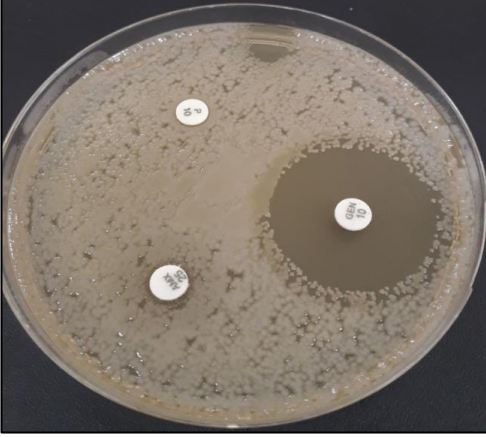
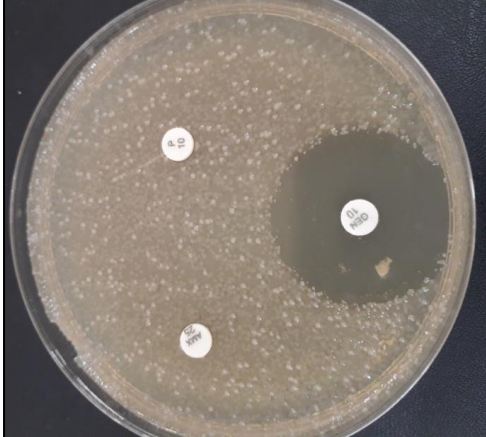
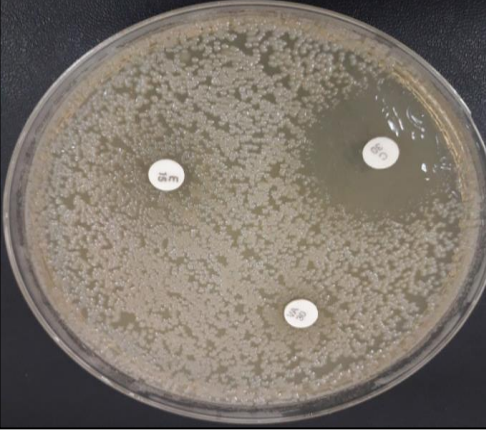

Tableau 17 : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des souches de références vis-à-vis de quelques antibiotiques (moyenne \pm écart type)

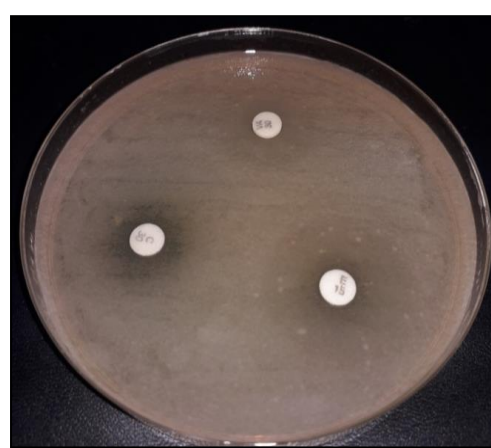
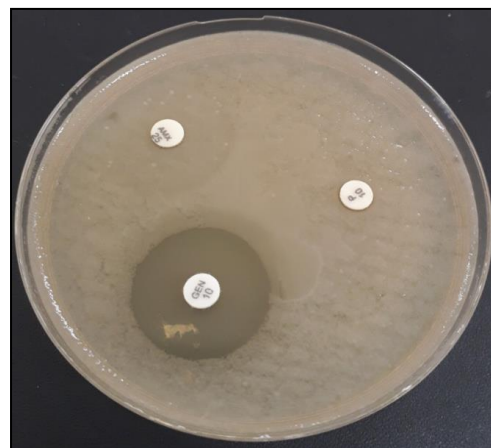
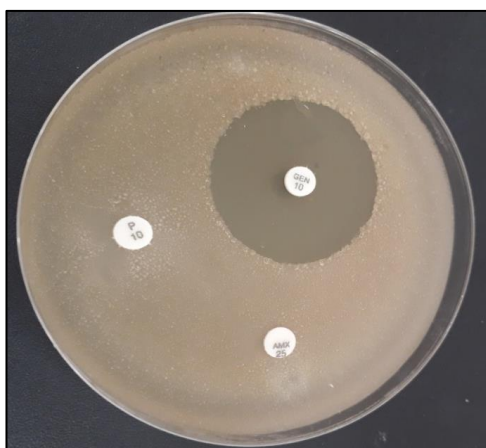
	<i>E. coli</i> (K12)	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> (MRSA)
Gentamicin (10 μg)	31,8 \pm 0,748	30,4 \pm 0,49	27,2 \pm 0,40	27,6 \pm 0,49	36,6 \pm 0,49	25 \pm 0,63
Penicillin G (10 μg)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Amoxicillin (25 μg)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Vancomycin (30 μg)	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	29,4 \pm 0,49	0 \pm 0
Erythromycin (15 μg)	10 \pm 2,10	0 \pm 0	9,6 \pm 0,80	10 \pm 0,63	0 \pm 0	7,2 \pm 0,75
Chloramphenicol (30 μg)	18,6 \pm 0,80	26,2 \pm 1,94	14,6 \pm 0,80	26 \pm 0,63	16,2 \pm 1,17	12,2 \pm 1,17

Tableau 18 : 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

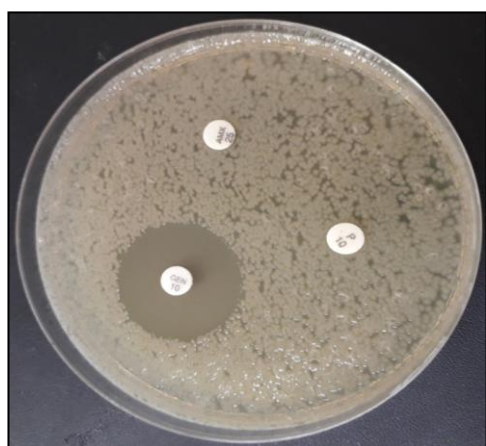
Tableau 19 : Effet des antibiotiques vis-à-vis des souches de références.

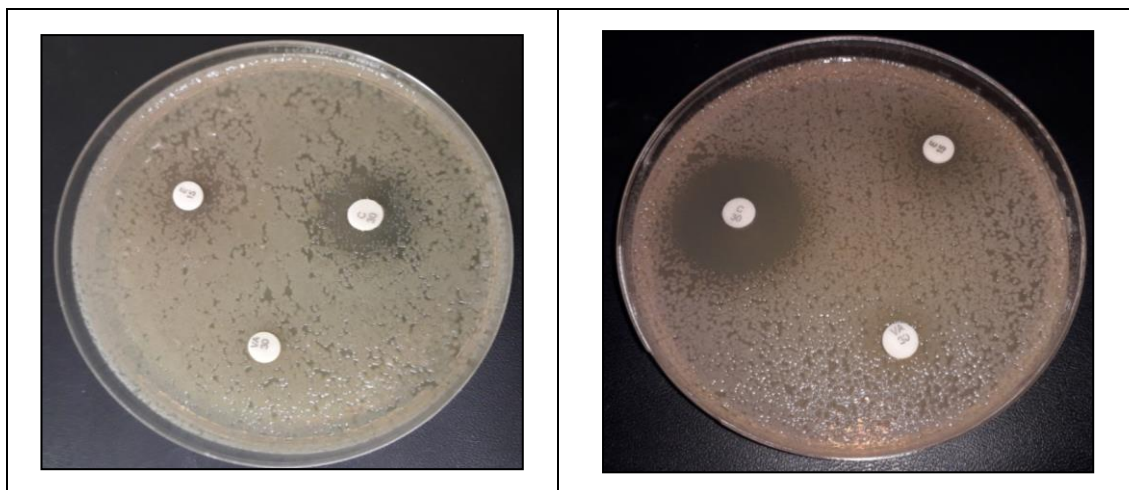
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> K 12 ATCC 10798
	
	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ATCC 43300



***Enterococcus faecalis* ATCC 29212**

***Klebsiella pneumoniae* ATCC 27853**





Conclusion

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.

*Références
bibliographiques*

- Ageenko, N.V., Kiselev, K.V., Dmitrenok, P.S., Odintsova, N.A., 2014.** Pigment Cell Differentiation in Sea Urchin Blastula-Derived Primary Cell Cultures. *Mar. Drugs.*, 12(7):3874-91.
- Akerina, F.O., Nurhayati, T., Suwandy, R., 2015.** Isolation and characterization of antibacterial compounds from sea urchin. *JPHPI.*, 18 : 61-73.
- Allain, J.Y., 1975.** Structure des populations de *Paracentrotus lividus* (Lmk) (*Echinodermata : Echinoïdea*) soumise à la pêche sur les côtes nord de Bretagne. *Rev. Trav. Inst. Peches Mar. Fr.*, 39 : 171-172.
- Allain, J.Y., 1978.** Âge et croissance de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) et de *Psammechinus miliaris* (Gmelin) des côtes nord de Bretagne (*Echinoïdea*). *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.
- Avril, J.L., François, D., Henry, M., Henry, D., 1992.** Bactériologie clinique. 2^{ème} édition. Edition Ellipses-Marketing, p168.
- 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.
- 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.
- 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, p.102.
- 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 diskmethod. 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, p.110.
- 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, p.713.

Brasseur ,L., Demeyer, M., Decroo, C., Caulier ,G., Flammang ,P., Gerbaux ,P., et al.,2018. Identification and quantification of spinochromes in body compartments of *Echinometra mathaei*'s coloured types. R. Soc .Open .Sci., 5(8). 171-213.

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., p.126.

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

Bruneton, J., 2012. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales .4ème édition. Lavoisier. Ed., Tec&Doc.P.1243.

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.

Daira, N.E-H., Maazi, M.C., Chefrou, A., 2016. Contribution à l'étude phytochimique d'une plante médicinale (*Ammoides verticillata* Desf. Briq.) De l'Est Algérien. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège. 85:1-15.

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. P. 246.

- Davidson, A., 1981.** Poisson de la Méditerranée. Edition Edisud. France.P.318.
- 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.
- Edeogal, H.O., Okwu, D.E., Mbaebie, B.O., 2005.** Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. African Journal Biotechnology, 4: 685-688.
- 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.

- 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., p.278.
- 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.
- Flandrois, J.P., 1997.** Bactériologie médicale. Presse Universitaire de Lyon, p.309.
- George, M., Garrity, Julia, A .Bell et Timothy, G., Lilburn, 2004.** Taxonomic Outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, p.401.
- 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.
- 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.
- 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>.

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

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

He, Q., Hou, Q., Wang, Y., Li, J., Li, W., Kwok, L.Y., et al., 2018. Comparative genomic analysis of *Enterococcus faecalis*: insights into their environmental adaptations. *BMC Genomics*, 19:1-12.

Hernes, P.J., Hedges, J.I., 2000. Determination of Condensed Tannin Monomers in Environmental Samples by Capillary Gas Chromatography of Acid Depolymerization Extracts. *Anal. Chem.*, 72(20):5115-24.

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.

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

- Kaper, J. B., Nataro, J. P. And Mobley, H. L., 2004.** Pathogenic *Escherichia coli*. Nat .Rev .Microbiol., 2(2): 123-140.
- 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.
- Kempf, M., 1962.** Recherches d'ecologie comparee sur *Paracentrotus lividus* (Lmk.) et *Arbacia lixula* (L.). Rec. Trav. Stn. Mar. Endoume., 25:47-116.
- Krief, S.2003.** Métabolites secondaires des plantes et comportement animal: surveillance sanitaire et observations de l'alimentation des chimpanzés (*Pan troglodytes schweinfurthii*) en Ouganda. Activités biologiques et étude chimique de plantes consommées.These de Doctorat. Muséum national d'histoire naturelle.P.348.
- Lecchini, D., Lenfant, P., Planes, S., 2002.** Variation in abundance and population dynamics of the sea urchin *Paracentrotus lividus* on the catalan coast (North-western Mediterranean sea) in relation to habitat and marine reserve. Vie et Milieu, 52 : 111- 118.
- 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., 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.
- Le Gall, P., Bucaille, D., Dutot, P., 1989.** Resistance aux variations de salinité chez *Paracentrotus* et *Psammechinus*. Vie Mar. H.S., 10: 83 - 84.
- Levy, S.B.and Marshall, B., 2004.** Antibacterial resistance worlwide: causes, challenges and responses. Nat. Med., 10: 122-129.

- 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.
- 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. P.293.
- Mortensen, T., Reitzel, C. A., Carlsbergfondet, 1943.** A monograph of the Echinoidea III Camarodonta II, p. 469.
- Oulymata G. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles a gram négatif. Thèse doctorat. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. P.120.
- 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.
- 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.

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., p.221.

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.

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.

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.

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, p.186.
- 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. *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, p111.
- Southward, A.J., Crisp, D.J., 1954.** The Distribution of Certain Intertidal Animals around the Irish Coast. *Proceedings of the Royal Irish Academy Section B: Biological, Geological, and Chemical Science.*, 57: 1-29.

- 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.
- Tifour et Bahoussi ,2005.** Contribution à l'étude des caractères biométrique de l'oursin *Paracentrotus lividus* (Lamarck ,1816) dans la baie de Mostaganem, p82.
- 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). Acta Adriatica, 51(1): 67 – 77.
- Tortonese, E., 1965.** Fauna d'Italie. *Echinodemata*. Vol. I. Edizioni Calderini. Bologna.422p.
- Tortonese, E., Vadon C., 1987.** Oursins et holothuries. In : Fischer W., Bouchon, M.L., Scneider, M., (Eds.), Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Révision 1. Zone de pêche 37. Mer Méditerranée et Mer Noire. 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., pp. 743–760.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. et Case, C.L. ,2003.**Introduction à la microbiologie. Edition du renouveau pédagogique.Canada.P.968.
- Urakova, I.N., Pozharitskaya, O.N., Makarov, V.G., 2012.** Scavenging effects of hydrolisates obtained from the sea urchins coelomic fluid. Rev. Clin. Pharmacol. Med. Therapy., 10:111–112.
- 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.

- 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. Immuno.pharmacol.*, 11:1946–1953.
- Wylie, J.L., Deborah, L., Nowicki, L., 2005.** Molecular epidemiology of community-and health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Manitoba, Canada. *J .Clin .Microbiol.*, 43:2830-2836.
- Zenk, M.H., Juenger, M., 2007.** Evolution and current status of the phytochemistry of nitrogenous compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24):2757-72.

Annexes

Composition et préparations des milieux de cultures

Milieux	Composition des milieux de culture
Gélose nutritive	Extrait de viande.....1,0 g
	Extrait de levure.....2,5 g
	Peptone.....5,0 g
	Chlorure de sodium.....5,0 g
	Agar Agar.....15,0 g
	Eau distillée.....1000 ml
	pH = 7
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
	Eau distillée1000 ml
pH = 7,6.	
Gélose Chapman	Peptone.....10,0 g
	Extrait de viande de bœuf 1,0 g
	Chlorure de sodium75,0 g
	Mannitol :.....10,0 g
	Rouge de phénol0,025 g
	Agar Agar15,0 g
	Eau distillée1000 ml
pH = 7,4	
Gélose Mac conkey	Peptone.....17,0 g
	Protéase peptone.....3,0 g
	Lactose..... 10,0 g
	Sels biliaires.....1,5 g
	Chlorure de sodium.....5,0 g
	Rouge neutre0,03 g
	Cristal violet.....0,001 g
	Agar Agar13,5 g
Eau distillée1000 ml	
pH = 7,1	

Gélose Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf (déshydratée)300,0 g
Hydrolysat de caséine017,5 g
Amidon01,5 g
Agar Agar17,0 g
Eau distillée1000 ml
pH = 7,5

Bouillon nutritif

Extrait de viande1,0 g
Extrait de levure.....2.5 g
Peptone5,0 g
Chlorure de sodium.....5,0 g
Eau distillée.....1000 ml
pH = 7

Bouillon Muller Hinton

Infusion de viande de bœuf (déshydratée)300,0 g
Hydrolysat de caséine17,5 g
Amidon01,50 g
Eau distillée1000 ml
pH = 7,5

Les courbes d'étalonnages

1. Courbe d'étalonnage des Polyphénols

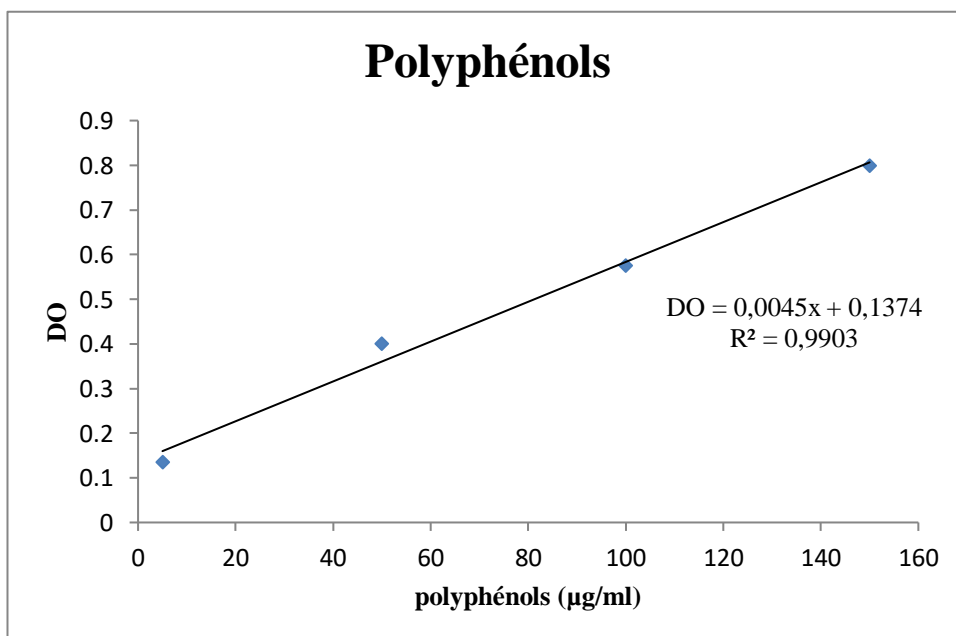


Figure I. Courbe d'étalonnage d'acide gallique pour le dosage des polyphénols totaux

2. Courbe d'étalonnage des Flavonoïdes

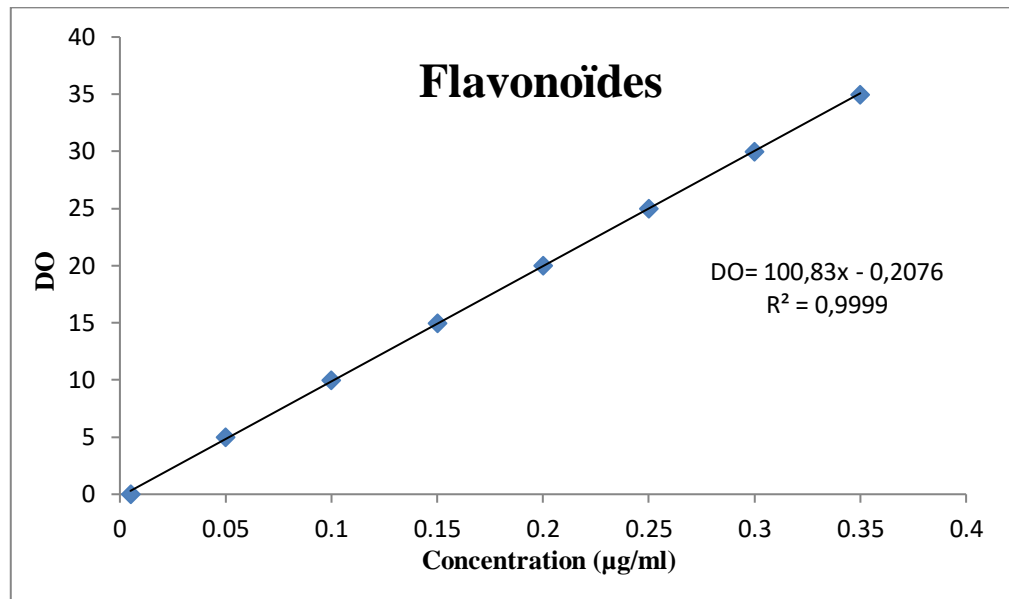


Figure II. Courbe d'étalonnage de la quercétine pour le dosage des flavonoïdes.