

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Saad Dahlab Blida 1



Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de master 2 en Biologie
Option : Biochimie

Thème :

Recherche de molécules bioactives synthétisées par des microorganismes associés à quelques espèces marines

Soutenu le : 21/09/2020

Réalisé et présenté par :

Melle MESSAOUD Farah

Melle KHELLAS Cyrine

Melle HADJER BRAHAM Halla

Devant le jury :

Mme SAIDI. F	Professeur	U.Blida 1	Présidente
Mme HAMAIDI. F	Professeur	U.Blida 1	Examinatrice
Mme TOBAL SEGHIR. S	MAA	U.Blida 1	Promotrice

Année 2019/2020

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



Remerciement

Au terme de ce travail,

*Nous remercions tout d'abord **DIEU** tout puissant de nous avoir donné la foi, la santé et la patience afin de pouvoir mener et réaliser ce modeste travail à terme.*

À notre Encadreur : Madame TOBAL SEGHIR. S, MAA à l'USDB1.

Nous vous remercions de nous avoir fait l'honneur d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Merci pour votre disponibilité, rigueur scientifique, l'acuité de vos critiques et pour vos conseils éclairés.

Nous avons été heureuses de travailler avec vous et nous tenons à vous en remercier sincèrement.

Nous adressons tous nos remerciements à MR CHEBBOUTE. R, et à Madame NAIT ABDALLAH. J qui nous ont ouvert les portes du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico- Chimiques (C.R.A.P.C.). Nous vous remercions jamais assez pour la chance que vous nous avez donnée malgré que nous n'avions pas pu manipuler comme convenu.

Nous tenons à remercier aussi tous les membres de jury pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant de siéger dans ce jury.

À notre Présidente : Madame SAIDI. F, Professeur à USDB1.

À notre Examinatrice : Madame HAMAIDI. F, Professeur à USDB1.

Merci à tous !



Dédicace

Tout d'abord je dedie ce mémoire a celle que j'aime le plus au monde, ma chere et tendre MAMAN FADILA, nulle dedicace ne puisse exprimer mes sincerres sentiments, MERCI pour tout.

À la mémoire de mon cher père ABD EL MADJID.

À mon ami et confident, mon mari AMINE.

À mon adorable fille MELINA.

À mon frère SIDALI, sa femme SOUHILA, ses enfants, YOUCEF et ZAKARIA.

À ma sœur FEDDA et son fils ADAM.

À ma sœur RYMA et sa fille MARIA.

À ma belle sœur NARIMANE et son fils ZINEDDINE.

À mes beaux patents.

À l'equipe CMH !

CERINE et HALLA, merci a vous.

FARAH



Dédicace

Je dédie ce modeste travail accompagné d'un profond amour à :

À mon cher père *Med Abdelhakim*

À ma chère mère *Fouzia*

Pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études, quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point vous remercier. Que DIEU vous procure bonne santé et longue vie.

À mes chères sœurs *Rihanna et Roufida*, et mon adorable frère *Abderahmen* pour leur encouragement permanent, leur soutien moral ainsi que pour m'avoir supporté lors de mes périodes de stress.

À la mémoire de ma chère grand-mère *Meriouma* qui ne m'avait jamais oublié dans ses prières, je ne t'oublierai jamais dans les miennes aussi.

À toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire, spécialement ma chère tante *Schems* et mes chères cousines : *Rabab, Wissem* et *Dalel* et son petit ange *Alaa* et mon cousin *Anouar*.

À tonton *Hemimed* qui a toujours été là pour nous.

À toutes mes amies, à tous ceux qui m'ont encouragé, conseillé et soutenu.

Merci d'être toujours là pour moi.

Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible

CYRINE



Dédicace

*Du profond de mon cœur, Je dédie ce travail a tous ceux qui me sont
Chers
A ma famille, elle qui m'a toujours soutenu et m'a aidé à atteindre mes objectifs,
son amour a fait de moi ce que je suis aujourd'hui.*

A mon cher père

*Ce travail est dédié à mon cher père **MOHAMED**, qui m'a toujours soutenu et
encouragée durant ces années d'études
Celui qu'il a consacré toutes sa vie pour l'éducation, que Dieu vous préserve
pour moi*

A ma chère maman

*A la femme qui n'a jamais dit non à mes exigences et qui m'a rendu toujours
heureuse, mon adorable mère **SAMIRA** que Dieu la protège et lui offre la
santé et le bonheur*

A mes frères ILYES et FETHI et ma soeur

*Pour leurs soutiens tout au long de mes études,
Mon adorable soeur **YASMINE** à être présente dans les moments difficiles et à
m'encourager tout au long de la réalisation de ce travail*

A mes tantes et mes oncles

*A mes cousines et à mes amies, précisément à ma chère cousine **SARAH** qui a
été là pour moi dans tous les moments difficiles, pour m'encourager, me soutenir
et me conseiller, merci beaucoup...*

A ma confidente LYNDA :

*La plus belle et la plus chère, je te remercie d'avoir été là pour moi à chaque
fois que j'ai eu besoin de toi, tu es l'exemple d'une vraie amie, que Dieu te
préserve pour moi ma chère et que notre amitié dure pour toujours...*

*À **KHELLAS CYRINE** et **MESSAOUD FARAH** et à leurs familles.*

*À ceux et à celles qui m'ont soutenu dans ma vie
Et tout au long de mon parcours d'études de près ou de loin*

Halla

Résumé

Les milieux marins sont des écosystèmes riches en biodiversité et constituent de ce fait des réservoirs exceptionnels de biomolécules actives dont le potentiel thérapeutique éveille l'intérêt des chercheurs depuis de nombreuses années. Les invertébrés marins tels que les éponges marines, les coraux et les ascidies, ainsi que les algues marines font partie des organismes possédant une grande diversité de métabolites secondaires, qui sont pour la plupart produits par des bactéries symbiotiques, ayant pour but principal la défense chimique de leur hôte.

Ces molécules bioactives couvrent un large éventail de métabolites secondaires telles les terpénoïdes, les alcaloïdes, les peptides, les stérols, les terpènes, et les polycétides, etc. Avec un éventail tout aussi large de propriétés biotechnologiques pertinentes : anticancéreuses, antibactériennes, antifongiques, antivirales et anti-inflammatoires. De ce fait, ces composés bioactifs constituent des perspectives prometteuses à utiliser dans le domaine biomédical.

Depuis les années 1950, diverses méthodes ont été employées afin d'accéder à cette importante chimiodiversité. Par ailleurs, les méthodes de culture bactérienne seules n'ont cependant pas abouti à des résultats pertinents, laissant la grande majorité des microorganismes et leurs voies biochimiques inaccessibles. Par la suite, une association des méthodes de cultures des bactéries symbiotiques aux organismes marins cités avec des techniques de la métabolomique telles que les techniques chromatographiques (liquide ou gazeuse) ou spectroscopiques (RMN, FT-IR) s'est révélée le meilleur moyen permettant le criblage et la caractérisation de nouvelles biomolécules ayant une activité biologique importante.

Mots-clés : Biomolécules actives, microorganismes associés aux espèces marines, métabolites secondaires, screening des activités biologiques, métabolomique.

Abstract

Marine environments are ecosystems rich in biodiversity and therefore constitute exceptional reservoirs of active biomolecules whose therapeutic potential has been arousing the interest of researchers for many years. Marine invertebrates such as marine sponges, corals and ascidians, as well as seaweed, are among the organisms with a wide variety of secondary metabolites, most of which are produced by symbiotic bacteria, whose main purpose is the chemical defense of their host.

These bioactive molecules cover a wide range of chemical classes such as terpenoids, alkaloids, peptides, sterols, terpenes, and polycetides. With an equally wide range of relevant biotechnological properties: anticancer, antibacterial, antifungal, antiviral and anti-inflammatory. As a result, these bioactive compounds represent promising prospects for use in the biomedical field.

Since the 1950s, various methods have been used to access this important chemodiversity. However, bacterial culture methods alone have not yielded relevant results, leaving the vast majority of microorganisms and their biochemical pathways inaccessible. Subsequently, a combination of bacterial culture methods associated with the marine organisms mentioned with metabolomic techniques such as chromatographic (liquid or gas) or spectroscopic (NMR, FT-IR) techniques proved to be the best way to screen and characterize new biomolecules with significant biological activity.

Keywords : Active biomolecules, microorganisms associated with marine species, secondary metabolites, screening of biological activities, metabolomics.

ملخص

البيئات البحرية هي أنظمة إيكولوجية غنية بالتنوع البيولوجي وبالتالي فهي تشكل مستودعات استثنائية للجزيئات الحيوية النشطة التي أثارت إمكاناتها العلاجية اهتمام الباحثين لسنوات عديدة. تعتبر اللافقاريات البحرية مثل الإسفنج البحري والشعاب المرجانية والأسكيدية ، وكذلك الأعشاب البحرية من بين الكائنات الحية التي تحتوي على مجموعة متنوعة من المستقلبات الثانوية ، والتي تنتج في الغالب عن طريق البكتيريا التكافلية ، و التي يتمثل هدفها الرئيسي في الدفاع الكيميائي.

بالإضافة إلى أن هذه الجزيئات النشطة بيولوجيًا تغطي مجموعة واسعة من الفئات الكيميائية مثل تربينويدس ، قلويدات ، ببتيدات ، ستيروول ، تربين ، بوليكتينيدات ، إلخ. تتميز هذه الجزيئات على نطاق واسع بخصائص تكنولوجية حيوية المتمثلة في: مضاد للسرطان، مضاد للجراثيم، مضاد للفطريات، مضاد للفيروسات ومضاد للالتهابات. لذلك، هذه المركبات الحيوية تشكل آفاقاً واعدة للاستخدام في مجال الطب الحيوي.

منذ الخمسينيات من القرن الماضي، تم استخدام طرق مختلفة للوصول إلى هذا التنوع الكيميائي المهم. علاوة على ذلك ، فإن طرق الزراعة البكتيرية وحدها ، لم تسفر عن نتائج ذات صلة ، مما يجعل الغالبية العظمى من الكائنات الحية الدقيقة ومساراتها البيوكيميائية غير قابلة للوصول بعد ذلك ، تم الجمع بين طرق استزراع البكتريا المصاحبة للكائنات البحرية المذكورة بتقنيات الايض مثل تقنيات الكروماتوغرافيا (السايل أو الغاز) أو التحليل الطيفي (FT-IR،NMR وما إلى ذلك) بالإضافة إلى فحص الأنشطة البيولوجية ، أفضل طريقة للفحص و توصيف جزيئات حيوية جديدة ذات نشاط بيولوجي كبير .

الكلمات المفتاحية :

الجزيئات الحيوية النشطة، الكائنات الحية الدقيقة المرتبطة بالأنواع البحرية ، المستقلبات الثانوية، فحصاً لأنشطة البيولوجية دراسة الأيض.

Glossaire

Benthiques : Organismes aquatiques vivant à proximité du fond des mers et océans, des lacs et cours d'eau, comme les éponges.

Biofilm : Un biofilm est une communauté multicellulaire plus ou moins complexe, souvent symbiotique, de micro-organismes, adhérant entre eux et à une surface, et marquée par la sécrétion d'une matrice adhésive et protectrice. Il se forme généralement dans l'eau ou en milieu aqueux.

Dinoflagellés : Cryotes unicellulaires qui possèdent deux flagelles perpendiculaires l'un à l'autre. Ceux rencontrés chez les Cnidaires appartiennent tous au genre symbiodinium.

Dulçaquicole : Un organisme dulçaquicole, ou dulcicole, est un organisme qui vit et se reproduit en eau douce.

Entomologique : Animaux articulés, spécialement les insectes.

Épibionte : Organisme qui vit sur un autre être vivant, ce dernier servant de substrat fixe dans une épibiose. Il n'y a ni parasitisme ni symbiose, cette interaction se trouve surtout en milieu marin.

Épibiose : Type de comportement utilisé par un ensemble d'organismes qui vivent fixés sur un substrat précis.

Épiphytes : Organismes qui poussent en se servant d'autres plantes comme support.

Fumeurs abyssaux : Sources hydrothermales se formant près des dorsales océaniques, en raison de la tectonique des plaques. Ces cheminées éjectent des jets brûlants de plus de 350 °C. Ceux-ci peuvent être blancs ou noirs, en fonction du fluide qu'ils éjectent. Les fumeurs noirs contiennent du soufre, du fer et du manganèse. Ce sont des lieux remarquables, riches en biodiversité et qui contrastent avec l'immensité des plaines océaniques, froides et obscures.

Holobionte : Ensemble composé par un organisme animal ou végétal et les micro-organismes qu'il héberge.

Médicament orphelin : Un médicament non développé par l'industrie pharmaceutique pour des raisons de rentabilité mais qui répond à un besoin de santé publique.

Médicaments hospitalier (RH) : Médicaments prescrits, dispensés et administrés exclusivement au cours d'une hospitalisation. Ils ne sont donc pas disponibles pour les patients ambulatoires.

Mésogée : Couche gélatineuse contenant 90% d'eau, du collagène et des fibres élastiques.

Pharmacopée : Recueil officiel national des médicaments.

Glossaire

Polype : Constitue l'unité de base du corail. C'est une vésicule fixe qui possède un seul orifice (faisant office de bouche et d'anus) entouré par une ou plusieurs rangées de tentacules. La bouche aboutit dans la cavité gastrovasculaire

Probiotique : Qui contient des micro-organismes vivants (bactéries, levures) exerçant un effet bénéfique sur l'organisme qui les ingère.

Sessile : se dit pour les espèces vivant fixées sur un substrat.

Substance allélochimique : Substances conduisant à des interactions entre individus d'espèces différentes, ce sont des substances interspécifiques.

Sclérite (ou spicule) : Élément squelettique calcaire, présent dans le tissu des coraux mous, permettant une certaine rigidité dans les courants et assurant un moyen de défense physique contre les prédateurs.

Zone de balancement des marées : La partie du littoral située entre les limites extrêmes des plus hautes et des plus basses marées.

Zones abyssales : L'ensemble des zones très profondes d'un océan.

Liste d'abréviations

µM : Micromètre.

3D7 : Parasite malarique.

A549 : Cellules épithéliales basales alvéolaires humaines adénocarcinomatiques.

AGS : Carcinome gastriques.

ARNr : Acide ribonucléique ribosomique.

BLSE : Bêta-lactamases à spectre étendu.

CC50 : Concentration Cytotoxique médiane.

CCM : Chromatographie sur couche mince.

CE50 : Concentration Efficace médiane.

Chl : Chlorophylle.

CI50 : Concentration Inhibitrice médiane.

CO2 : Dioxyde de carbone.

COX-2 : Cyclooxygénase 2.

CT-26 : Lignée murine de cancer du côlon.

E coli : Escherichia coli.

EPS : Exopolysaccharide.

ET743 : Trabectédine (médicament).

FDA : Food and Drug Administration, l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments.

GC-MS : Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse.

HEK 293 : Cellules embryonnaires humaines du rein.

HeLa : Lignée cellulaire cancéreuse.

H1N1 : La grippe A.

HPLC : High performance liquid chromatography ou La chromatographie en phase liquide à haute performance.

HSV-1 : Virus Herpes simplex type 1.

HT-29 : Carcinome colorectal.

IC50 : Concentration inhibitrice médiane.

INOS : Oxyde nitrique synthase.

KB : Carcinome épidermoïde.

KDa : Kilodalton.

Kg : Kilogramme.

Liste d'abréviations

LC-MS : Chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse.

LPS : Lipopolysaccharides.

m : Mètre.

MA : Marine agar- Gélose marine.

MAO : Monoamine Oxydase.

MDA-MB : Lignées cellulaires cancéreuses du sein.

mg : Milligramme.

mL : Millimètre.

NCI-H : Lignées cellulaires cancéreuses du poumon.

NF- κ B : Nuclear factor-kappa B.

nM : Nanomètre.

NO : Monoxyde d'azote.

P388 : Cellules de leucémie.

PS : Leucémie lymphocytaire.

RAW 264.7 : Cellules de macrophages murins.

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire.

ROS : Reactiveoxygenspecies.

S. Aureus : Staphylocoque aureus.

SARM : Staphylococcus aureus résistant à la méticilline.

SH-SY5Y : Lignée cellulaire humaine.

Sp : Espèce non précisée.

t-BHP : Hydroperoxyde de tert-butyle.

THP-1 : Lignée monocyttaire humain.

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.

VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine type 1.

Liste des tableaux

Tableau I : Composition des trois principaux groupes d'algues.....	19
Tableau II : Quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités anti bactériennes.....	40
Tableau III : Quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités anti virales.....	41
Tableau IV : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités anti bactériennes.....	42
Tableau V : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités anti virales.....	43
Tableau VI : Quelques biomolécules extraites des algues et leurs activités anti cancéreuses.....	45
Tableau VII : Quelques biomolécules extraites des algues et leurs activités anti microbiennes.....	47
Tableau VIII : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux algues et leurs activités biologiques.....	51
Tableau IX : Quelques biomolécules extraites des coraux et leurs activités anti inflammatoires.....	53
Tableau X : Quelques biomolécules extraites des coraux et leurs activités anti cancéreuses.....	54
Tableau XI : Les activités antimicrobiennes de quelques biomolécules extraites des coraux.....	55
Tableau XII : Résumé des activités biologiques des alcaloïdes : méridianines et aplicyanins.....	57
Tableau XIII : Quelques peptides et biomolécules extraites des ascidies et leurs activités biologiques.....	59

Liste des figures

Figure 1 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différentes sources marines de 2001 à 2010.....	7
Figure 2 : Diversité de formes et de couleurs des éponges marines : a- Myxilla austini ; b- Suberites concinnus ; c- Homaxinella subdola ; d- Paratimealalori ; e- Myxilla incrustans ; f - Halichondria (Eumastia) sitiens.....	8
Figure 3 : Photographies de 03 espèces d'éponges représentant les 03 classes existantes : A : éponge calcaire - B : Hexactinellida - C : Demospongiae.....	9
Figure 4 : Structure histologique d'un Porifera de type asconoïde vue en coupe.....	11
Figure 5 : Aspect général d'un spongiaire montrant la trajectoire de l'eau.....	12
Figure 6 : Diversité bactérienne associée à 32 espèces d'éponges de localisation géographique distincte à travers le monde.....	14
Figure 7 : Appareil végétatif des algues marines.....	17
Figure 8 : Certaines espèces d'algues : a-les algues vertes (Chlorophycées), b-Les algues brunes (Phéophycées), c-Les algues rouges (Rhodophycées), d- Les algues bleues (Cyanophycées).....	18
Figure 9 : Bilan des phyla bactériens rencontrés à la surface des macro-algues.....	22
Figure 10 : Corail rouge de Méditerranée <i>Corallium rubrum</i>	23
Figure 11 : Organigramme simplifié des Cnidaires classe Anthozoaires.....	23
Figure 12 : Anatomie générale d'un polype de Cnidaire.....	24
Figure 13 : Exemple de corail dur, (a) : <i>Silunaria flexibilis</i> , exemple de corail mou ; (b) : <i>Porites cumulatus</i>	26
Figure 14 : Schéma simplifié des différentes formes des ascidies.....	28
Figure 15 : a) exemple d'ascidie simple : <i>Halocynthia pyriformis</i> ; b) exemple d'ascidie coloniale : <i>Clavelina lepadiformis</i> ; c) exemple d'ascidie composée : <i>Botrylloides violaceus</i>	29

Liste des figures

Figure 16 : Aspect général d'une ascidie simple.....	30
Figure 17 : Aspect général d'une ascidie coloniale.....	30
Figure 18 : Nombre total de nouveaux composés isolés à partir de différentes éponges marines avec diverses activités biologiques de 2001 à 2010.....	35
Figure 19 : Structure chimique de l'Eribulinmesylate $\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$	36
Figure 20 : Structures chimiques des alcaloïdes : acide 20-norcrambescidique (7); monachoradine A (1) et (-)-crambescine A2 392 (9).....	36
Figure 21 : Structures partielles a et b de l'alcaloïde Neopetrosiamines A.....	37
Figure 22 : Structure chimique du peptide cyclique Orbiculamide A.....	37
Figure 23 : Structure chimique du peptide Koshikamide B.....	38
Figure 24 : Structures chimiques des peptides Microcionamides A (1) et B (2).....	39
Figure 25 : Structure d'un polymère de phloroglucinol.....	49
Figure 26 : Structure chimique du sargachromanol G (SG).....	49
Figure 27 : Structure chimique des meridianines 4-10.....	56
Figure 28 : Structures desleptoclinidamines A, B, C.....	59
Figure 29 : Structure du métabolite 6-bromindole-3-carbaldéhyde.....	61
Figure 30 : Schéma explicatif du principe de la méthode d'hybridation par fluorescence <i>in situ</i>	67
Figure 31 : Schéma explicatif du principe du pyroséquençage.....	69
Figure 32 : Schéma récapitulatif des principales étapes de la métagénomique en illustrant l'exemple de l'extraction d'ADN à partir des micro-organismes associés aux éponges.....	71
Figure 33 : Schéma récapitulatif de l'approche métabolomique et ses principales méthodes.....	74
Figure 34 : Représentation des techniques analytiques pouvant être envisagées pour réaliser des études métabolomiques.....	75

Liste des figures

Figure 35 : Molécule partiellement purifiée analysée par chromatogramme en phase gazeuse - analyse du spectre de masse du SEB32. Chromatogramme (axe x = temps de rétention ; axe y = % intensité/ % abondance).....84

Figure 36 : Métabolites secondaires bioactifs dans un extrait de culture de la souche *Vibriosp.* EA348 détecté par analyse LC/MS. (a) Analyse LC/MS en mode positif et (b) analyse LC/MS en mode négatif.....85

Plan de travail

INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I : LA BIODIVERSITÉ DES MILIEUX MARINS	4
I.1. Définition de la biodiversité	4
I.2. Biodiversité terrestre et biodiversité marine.....	4
I.3. Aperçu général sur la chimiodiversité marine.....	6
I.4. Eude de la biodiversité de quelques espèces marines.....	7
I.4.1. les spongiaires.....	7
I.4.2. Les algues.....	16
I.4.3. Les coraux.....	22
I.4.4. Les ascidies.....	28
Concluion.....	31
CHAPITRE II : CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINSD'INTÉRÊT	33
II.1. Les spongiaires.....	34
1.1. Métabolites issus des éponges	35
1.2. Métabolites actifs issus des micro-organismes associés aux éponges ...	41
II.2. Les algues.....	44
2.1. Métabolites issus des algues	44
2.2. Métabolites issus des microorganismes associés aux algues.....	51

III.3. Les coraux	52
3.1. Métabolites actifs issus des coraux	53
III.4. les ascidies	56
4.1. Métabolites actifs issus des ascidies	56
4.2. Métabolites actifs issus des micro-organismes associés aux ascidies	61
Conclusion	62

**CHAPITRE III : LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE
DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES
ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT**.....63

**I. Principales méthodes de la mise en évidence des microorganismes associés aux
espèces marines et de criblage de molécules d'intérêt**.....63

**I.1. Historique de travaux de recherchesur les invertébrés marins d'intérêt
et leurs microorganismes associés**.....63

I.1.1. Culture des microorganismes produisant des métabolites....63

**I.1.2. Amélioration de la culture des bactéries associées aux
éponges**.....64

I.1.3. Méthodes indépendantes de la culture.....65

I.1.3.1. Analyses microscopiques.....65

I.1.3.2. Lhybridation de fluorescence *in situ* (FISH).....66

I.1.3.3. La construction de bibliothèques d'ARNr 16S.....68

I.1.3.4. Pyroséquencage.....68

I.1.3.5. Métagénomique.....70

I.1.3.6. Approche métabolomique.....72

II Méthodes d'extraction et d'identification des métabolites secondaires à partir des micro-organismes associés aux éponges.....	75
1. Collecte et identification des invertébrés marins.....	75
2. Séparation des cellules et localisation des métabolites	76
3. Isolement et purification des bactéries symbiotiques.....	77
4. Screening préliminaire de l'activité antibactérienne des bactéries marines isolées par méthode de diffusion sur disque.....	77
5. Production extracellulaire et optimisation du système de solvant pour l'extraction des métabolites secondaires.....	78
6. Vérification de l'activité antibactérienne.....	80
7. Purification et criblage chimique des métabolites bruts.....	80
7.1. Séparation et purification des métabolites.....	80
7.2 Caractérisation de la structure chimique des biomolécules.....	82
7.2.1 Caractérisation de l'extrait brut par chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse (GC-MS).....	83
7.2.2 Caractérisation de l'extrait brut par chromatographie en phase liquide et spectroscopie de masse (LC-MS).....	84
7.2.3 Analyse spectrale FT-IR.....	85
7.2.4 Elucidation de la structure par RMN.....	85
Conclusion.....	87
CONCLUSION GENERALE	88
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94



INTRODUCTION

Introduction :

L'étude de la biochimie des organismes marins et la recherche de nouvelles substances naturelles bioactives d'origine marine constituent un domaine de recherche peu exploré en Algérie. En effet, la diversité biochimique et génétique des océans est beaucoup plus grande que celle des espaces émergés à cause de l'ancienneté de la vie marine et la longue période d'évolution qui ont permis au vivant de passer par de très nombreux modèles moléculaires et de développer des solutions d'adaptation à des environnements très divers. Par conséquent, les biomasses marines constituent un ensemble de ressources exploitables et valorisables, utiles pour l'homme.

Notre planète bleue est dominée à près de **70 %** de sa surface par les mers et les océans. L'Algérie de par ses **1622,48 Km** de littoral, a une superficie marine de **27 998 Km²** donnant sur le grand bassin méditerranéen (rapport du ministère de l'aménagement du territoire, 2008). La mer Méditerranée est la mer fermée la plus grande (**2 501 000 km²**) et la plus profonde (en moyenne **1 500 m**, maximum **5 150 m**) du monde (**Manon, 2001**). Sa localisation entre l'Afrique, l'Europe et l'Asie lui attribue une grande biodiversité terrestre et marine. En effet, elle contribue à hauteur de **7 %** à la biodiversité marine mondiale. Les estimations taxonomiques des espèces méditerranéennes indiquent qu'il existe environ **17 000** espèces marines décrites dont un très grand nombre d'espèces endémiques (**Coll et al., 2010**), lui attribuant la deuxième place mondiale en termes de richesse en espèces endémiques (taux d'endémisme égal à **20%** chez les algues, **46%** chez les éponges et **50%** chez les ascidies) (**Boudouresque, 1995**).

Cette forte biodiversité s'accompagne d'une exceptionnelle chimiodiversité. Durant ces trente dernières années, de nombreuses études ont été menées sur les invertébrés marins (éponges, ascidies, bryozoaires, cnidaires...), leurs micro-organismes associés, ainsi que sur les algues marines, aboutissant ainsi à la caractérisation d'un nombre important de nouveaux produits naturels pouvant dépasser les quinze mille nouveaux produits (**Salomon et al., 2004**). Les scientifiques explorent de plus en plus ce domaine afin de répondre à certains problèmes majeurs de santé publique tels la résistance croissante des bactéries et des champignons,

INTRODUCTION

l'émergence de nouveaux et d'anciens agents pathogènes, les problèmes d'infections virales et les graves conséquences de la chimiothérapie.

Ces produits ont vu le jour grâce aux méthodes de criblage à haut débit et aux améliorations techniques apportées aux techniques de séparation et d'isolement, qui sont basées sur une logique essentiellement biochimique par la compréhension des processus chimiques biologiques de ces organismes (**Bérdy, 2005**). En effet, certaines éponges et autres organismes marins ont la capacité d'héberger dans leurs tissus des micro-organismes qui peuvent représenter jusqu'à près de **40 %** à **50 %** de leur biomasse. Ces derniers répondent à des stratégies de défense et de protection contre un environnement chimique ou biologique hostile, de compétition pour l'espace ou de séduction pour la reproduction (**Guezennec et al., 2010**), en produisant des métabolites secondaires uniques (**Banaigs et Kornprobst, 2007**) qui constituent de nouvelles structures moléculaires méconnues jusqu'à lors chez les microorganismes d'origine terrestre, comme l'affirme les études réalisées dans la Scripps Institution of Oceanography aux États-Unis. Parmi ces métabolites secondaires on retrouve : des tanins, des alcaloïdes, des peptides des terpènes, des stérols ainsi que des polyphénols (**Crue, 2016**). Présentant pour la plupart, des activités antimicrobiennes (antibactériennes, antifongiques, anti-protistes), anti-tumorales, antivirales et anti-inflammatoires qui feront l'objet de notre synthèse au chapitre 2.

Dans cette optique, l'objectif de notre travail devrait être le screening et la recherche de nouvelles biomolécules actives synthétisées par des microorganismes associés à quelques espèces marines telles que les spongiaires, les ascidies, les coraux et les algues. Néanmoins, vue la situation inédite de la pandémie du covid-19 et l'impossibilité de réaliser la partie pratique notre mémoire consiste alors à synthétiser des données bibliographiques en lien avec notre thématique.

Notre synthèse s'articule au tour de trois chapitres :

Chapitre 1 traitera : la biodiversité des milieux marins, notamment la biodiversité des espèces que nous avons ciblé pour ce travail, ainsi qu'une étude détaillée de chaque espèce.

Chapitre 2 resumerà : les principales biomolécules extraites à partir des éponges marines, d'algues, de coraux et d'ascidies ainsi qu'à partir de leurs micro-organismes associés.

INTRODUCTION

Chapitre 3 est consacré aux : méthodes de la mise en évidence des micro-organismes associés aux invertébrés marins d'intérêt, et les approches de l'extraction et la purification de leurs métabolites secondaires.



CHAPITRE I

CHAPITRE I : LA BIODIVERSITÉ DES MILIEUX MARINS :**I.1. Définition de la biodiversité :**

Le concept de la biodiversité est relativement récent. En 1984, Edward O. Wilson publie « *Biological Diversity* » qui met en avant pour la première fois l'idée de diversité biologique (**Joyard, 2019**) qui désigne la variété des éléments constitutifs du vivant. La biodiversité regroupe à la fois les différentes espèces et formes de vie (animales, végétales, entomologique et autres) et leur variabilité c'est-à-dire leur dynamique d'évolution dans leurs écosystèmes. Ce concept concerne trois niveaux principaux de la biodiversité selon **Pichon, (2016)** : « la diversité génétique, organismique et écologique autrement dit les gènes, les espèces et les écosystèmes ».

La diversité organismique dite aussi diversité spécifique, englobe toutes les espèces vivantes : animaux, végétaux, bactéries... etc d'un milieu. Elle est modulée par leurs gènes, leurs molécules, leurs physiologies, leurs comportements et de leurs multiples interactions écologiques avec leur environnement.

Cette diversification étendue des espèces vivantes est aussi la résultante d'une très longue histoire évolutive, qui est contrainte par tout un complexe de variables physico-chimiques, de relations biologiques, de modifications génétiques, de symbioses et d'adaptation qui encadrent chaque organisme (**Pichon, 2016**).

I.2. Biodiversité terrestre et biodiversité marine :

Dans un ouvrage de **Gouletquer et ses collaborateurs, (2014)** il a été montré qu'il existe un nombre total d'espèces eucaryotes variant entre **3,6** millions jusqu'à plus de **100** millions espèces. À ce jour, **1,9** millions d'entre elles sont effectivement déposées dans les muséums et environ **1,5** à **1,8** millions d'espèces ont fait l'objet de descriptions. Ces espèces sont regroupées dans trente et un phyla, dont douze sont exclusivement marins (Mollusques, Echinodermes, Chordés, Arthropodes, Cnidaires, etc), contre dix-neuf dans le domaine continental (dont un seul est d'origine exclusivement terrestre). Selon les dernières

statistiques, la base de données World Register of Marine Species a comptabilisé **550 792** espèces marines dont **528 276** sont décrites, et parmi lesquelles **234 591** sont validées (**WoRMS consulté en juillet 2020**). « Alors que les scientifiques estiment leur nombre [des espèces marines] entre **500 000** et plus de **10** millions (estimations qui n'englobe pas le monde microbien, dont le nombre d'espèces approcherait la dizaine de milliards) » (**Boeuf, 2010**).

Comparée à la vie terrestre, la vie marine a connu une évolution beaucoup plus poussée, qui est expliquée par l'apparition de la vie dans les océans il y a près de **3,8** milliards d'années tandis que dans la vie continentale serait évaluée à **400** millions d'années seulement (**Le Gal, 2004**). Ce qui nous laisse à dire que le paysage de la biodiversité de la planète s'est forgé dans les océans, seuls quelques exemplaires ayant réussi leur passage vers l'univers terrestre pour, ensuite, se diversifier, tel que les végétaux verts qui sont les plus anciens, dérivant des premiers micro-organismes photosynthétiques voisins de nos cyanobactéries actuelles. Ils ont pu coloniser depuis les océans, les rivières et les eaux douces, puis les terres émergées (**Kornprobst, 2005**), ils sont donc à l'origine de toute la végétation terrestre.

Alors que le monde terrestre est surtout (mais pas uniquement) un monde végétal vert, il existe deux autres groupes de végétaux marins : les algues rouges et bruns (sans parler des algues bleues qui sont des bactéries) (**Perez, 2000**). Après les algues vertes, les algues rouges sont apparues. Une algue rouge appelée *Bangiomorpha pubescens* a été trouvée fossilisée dans des roches de la période géologique de l'Ectasien datant de **1,2** milliard d'années, faisant d'elle le plus vieil organisme multicellulaire connu (**Butter field, 2000**). Les dernières venues, les algues brunes qui sont essentiellement marines : elles n'ont pas eu le temps d'aborder l'espace terrestre (**Kornprobst, 2005**).

Par ailleurs, d'autres facteurs différencient le milieu marin du milieu terrestre citons : la pression et la température. En effet, les grands fonds marins dont la profondeur moyenne se situe vers **3800** m sont aussi le domaine des fortes pressions auxquelles répondent tout un ensemble d'adaptations. La température dans les zones des extrêmes est caractérisé par de fortes températures à proximité des monts hydrothermaux (ou fumeurs) ou, au contraire, basses températures des zones marines polaires. Ce qui génère des adaptations moléculaires chez les organismes y vivant tel que le développement d'enzymes thermophiles, psychrophiles dont on prospecte aujourd'hui les capacités pour des finalités biotechnologiques (**Le Gal, 2004**).

Même si il existe une grande différence de températures et de pression dans l'environnement océanique, ce dernier reste très stable par rapport à la terre, où il y a de grandes fluctuations de température et d'humidité diurnes et saisonnières (**Briggs, 1994**). Cette stabilité écologique favorise les réactions biologiques, le métabolisme et améliore les propriétés cellulaires des organismes marins (**Desbruyères, 2010**).

La salinité, l'absence de lumière aux très grandes profondeurs, les îlots chimiosynthétiques près des fumeurs abyssaux et la composition chimique de l'eau de mer font aussi distinguer le milieu marin du milieu terrestre (**Pichon, 2016**).

I.3. Aperçu général sur la chimiodiversité marine :

Cette importante biodiversité marine est quant à elle, source d'une exceptionnelle chimiodiversité. En effet, les invertébrés marins sessiles tel que les spongiaires, les coraux, les gorgones, les ascidies, ainsi que les végétaux aquatiques : les algues, ont su développer des mécanismes de défense chimique pour se protéger de la prédation, de la colonisation, et la compétition pour l'espace, en impliquant des substances dits « métabolites secondaires » ces derniers ne sont pas indispensables à la vie c'est à dire ils ne sont pas directement impliqués dans la croissance, le développement ou la reproduction normale des organismes. Leur particularité est leur toxicité vis à vis des prédateurs et le goût désagréable qu'ils confèrent pour certains prédateurs, protégeant ainsi l'organisme producteur de la prédation et attribuent à l'océan une richesse en substances allélochimiques de tous genres, des plus simples, comme l'acide chlorhydrique ou l'acide sulfurique, aux plus complexes, comme certains alcaloïdes, pseudopeptides ou autres macrolides (**Pichon, 2016**).

La composition chimique de l'eau de mer contribue à cette chimiodiversité. En effet, les organismes marins possèdent de plus des éléments de base (le carbone, l'oxygène, l'hydrogène et l'azote), d'autres éléments importants (% > 10ppm) comme le chlore, le soufre et le brome mais également des éléments un peu moins abondants comme le bore, le silicium, l'iode et l'arsenic qui sont, pour la plupart absents ou rarement présents dans les métabolites des organismes dulçaquicoles ou terrestres (**Pichon, 2016**). Ce qui a suscité l'intérêt de nombreuses équipes de recherche et de grands groupes pharmaceutiques dans le monde. En une quarantaine d'années, plus de **18 000** nouvelles molécules isolées du milieu marin ont été caractérisées (ce qui sera le sujet du prochain chapitre).

Par conséquent, après de nombreuses recherches, nous avons constaté que les espèces les plus étudiées et celles qui constituent les sources marines les plus importantes de métabolites spécialisés sont : les éponges marines en premier lieu, les cnidaires entre autres les coraux, les algues marines, les ascidies, ainsi que leurs micro-organismes associés tels que les cyanobactéries, les champignons et les actinomycètes qui sont de plus en plus étudiés (Corbin, 2016) (figure 1). Pour cela notre choix d'étude s'est posé sur ces quatre organismes marins pour lesquels nous allons étudier leur biologie, leur biodiversité, et leur chimio-diversité.

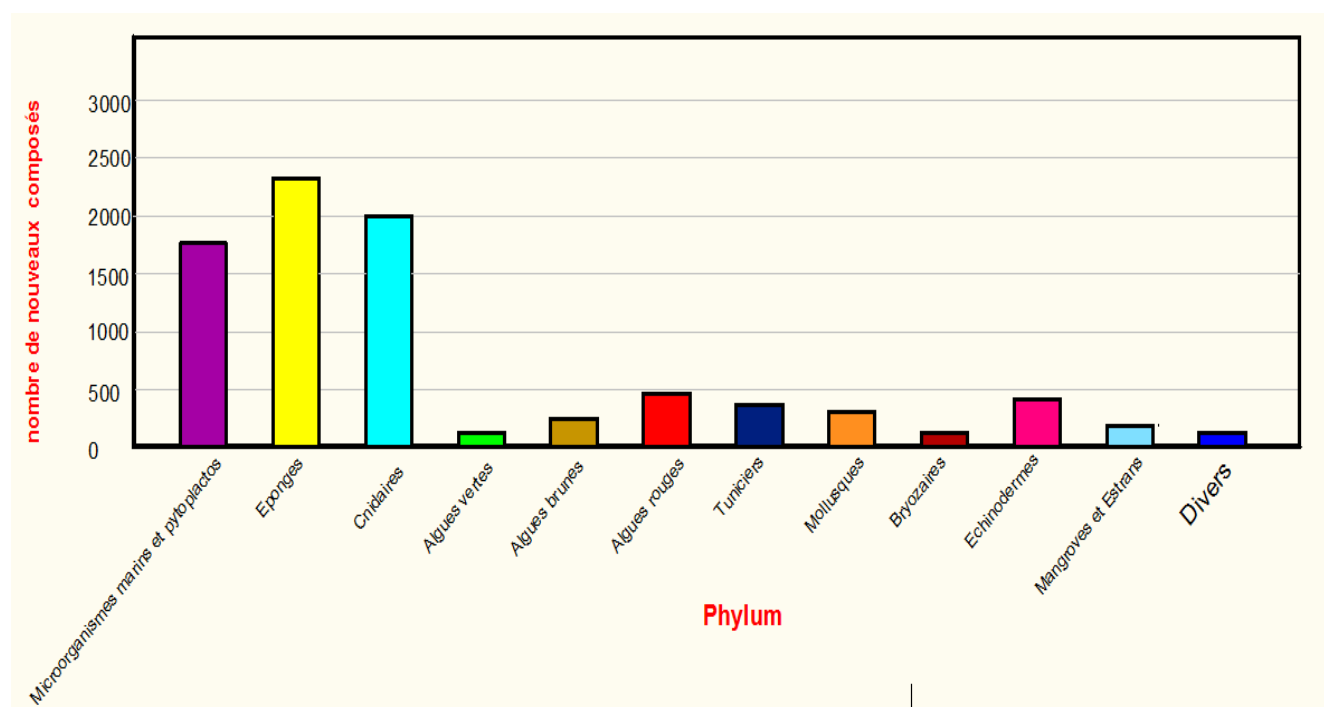


Figure 1 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différentes sources marines de 2001 à 2010

(Mehbub *et al.*, 2014)

I.4. Etude de la biodiversité de quelques espèces marines :

4.1. Les spongiaires :

4.1.1. Biodiversité globale des spongiaires :

Les spongiaires (phylum Porifera) sont les métazoaires les plus primitifs (Van Soest *et al.*, 2012). En effet, le plus ancien fossile qui a été identifié date de **580** millions d'années, alors que les éponges calcaires pourraient avoir une histoire prolongée au Précambrien

supérieur (Li *et al.*, 1998). Ces organismes marins sont retrouvés depuis le littoral marin jusqu'aux zones abyssales (0-8000 mètres), divisées en quatre classes distinctes, 25 ordres, 128 familles et 680 genres (Hooper *et Van soest*, 2002), 19 800 espèces sont décrites à ce jour, dont 9314 acceptées sont actuellement enregistrées dans la World Porifera Database (WPD), soit 794 Calcarea, 682 Hexactinellida, 126 Homoscleromorpha et 7511 Demospongiae (WPD consulté en juillet 2020). Possédant une grande diversité de formes et de couleurs, quelques exemples sont présentés ci-dessous (Figure 2).

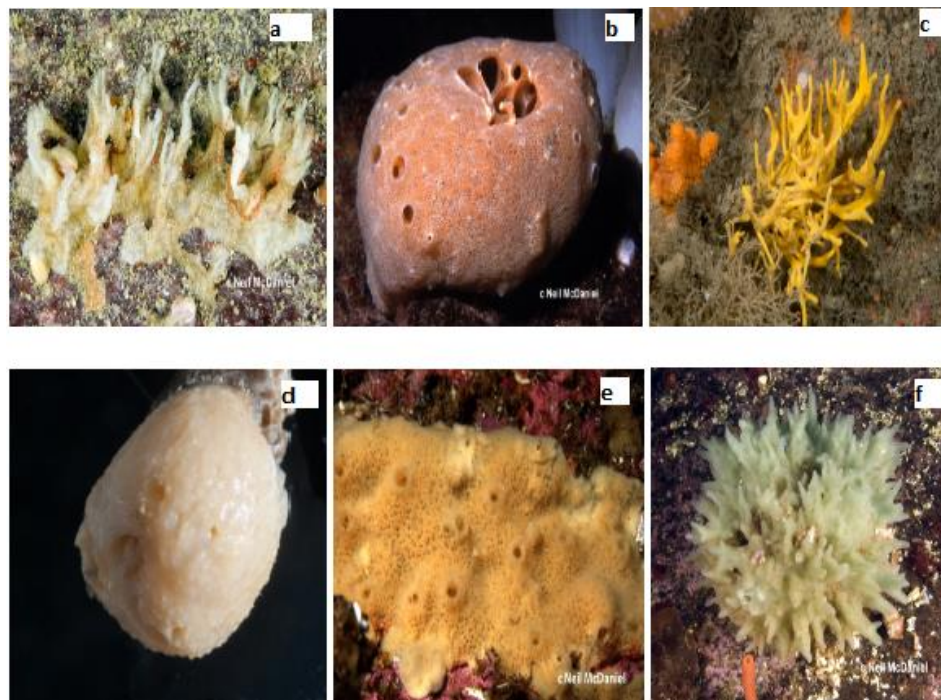


Figure 2 : Diversité de formes et de couleurs des éponges marines : a- *Myxilla austini* ; b- *Suberites concinnus* ; c- *Homaxinella subdola* ; d- *Paratimea kalori* ; e- *Myxilla incrustans* ; f- *Halichondria (Eumastia) sitiens* (Source : galerie de photos de la base de donnée World Register of Marine Species WoRMS, 2020)

Cette grande biodiversité des éponges marines, leur résistance aux crises éteintes et leur longue période d'évolution s'expliquent par leur capacité à s'adapter aux changements environnementaux et à leurs associations intimes avec des symbiotes microbiens qui ont assuré leur survie et l'assurent encore en grand nombre dans les mers récentes (et dans les habitats d'eau douce) (Van Soest *et al.*, 2012).

4.1.2 La taxonomie des Porifera :

La taxonomie des Porifera est basée principalement sur un mélange de caractéristiques cellulaires, de constructions squelettiques et de modes de développement.

Trois classes existent aujourd'hui :

a) **Calcarea** : calcispongia, leur squelette est constitué de spicules calcaires. C'est la classe d'éponges la moins abondante (5 % des espèces du phylum Porifera). Elles sont toutes marines localisés dans les eaux peu profondes (< 100 m) (Simpson, 1984 ; Hooper *et Van Soest*, 2002).

b) **Hexactinellida** : les éponges de verre, possèdent des spicules en silice triaxiaux à six pointes (hexactines). Elles constituent 7 % des espèces de spongiaires et sont rares à moins de 200 m de profondeur (Simpson, 1984 ; Hooper *et Van Soest*, 2002).

c) **Demospongiae** : leur squelette est constitué de spicules de silice hydratée, ou d'un mélange de spicules siliceux et de fibres de spongine, ou des fibres de spongine uniquement ou pas de squelette. Elles représentent environ 85 % des espèces de ce phylum et sont présentes dans les différents milieux, de la zone de balancement des marées jusqu'aux abysses (8600m) (Simpson, 1984 ; Hooper *et Van Soest*, 2002).



Figure 3 : Photographies de 03 espèces d'éponges représentant les 03 classes existantes : A : éponge calcaire - B: Hexactinellida - C: Demospongiae (Source : galerie de photos de la base de donnée World Register of Marin Species WoRMS, 2020)

4.1.3. Présentation générale des éponges marines :

Les éponges sont des organismes sessiles essentiellement marins avec une cinquantaine d'espèces d'eau douce. Réparties dans le monde entier, elles constituent les organismes benthiques les plus abondants (dans la mer Méditerranée et l'océan Atlantique en premier lieu) (**Jackson *et al.*, 2015**). Leur nutrition est par filtration d'eau, de bactéries et d'autres pico planctons, l'eau est amenée dans le corps de l'éponge par de minuscules trous dans les cellules des pores appelées porocytes dans l'épithélium de surface, ce qui donne au groupe son nom de Porifera ("porteur de pores") (**Dunn, 2015**).

De plus d'être des organismes sessiles et dépourvues de coquilles, les spongiaires renferment un squelette de spicules siliceux, calcaires ou de fibres de spongine, rendant leur défense physique contre les prédateurs quasi rare, ils recourent donc à une stratégie de défense chimique (**Guézennec, 2014**), notamment par leurs microorganismes associés qui représentent **40 à 60 %** de leur biomasse totale (**Yarden, 2014**).

4.1.4. Biologie des éponges :

Les spongiaires sont des métazoaires dits "Parazoaires" car ils ne présentent pas de vrai tissu, ce sont des animaux diploblastiques de structure composée de deux couches de cellules, la couche externe : le pinacoderme, percé de pores inhalants appelés ostia, et la couche interne : le choanoderme, formé de cellules appelées choanocytes. Ces deux couches de cellules sont séparées par une matrice appelée : la mésohyle qui contient différents types cellulaires tel que : les archaeocytes totipotents, les collencytes sécrétant le collagène, les sclérocytes formant des spicules et les porocytes qui permettent le passage de l'eau entre l'ectoderme et l'endoderme (**Simpson, 1984 ; Borchiellini *et al.*, 2001; Hooper *et Van Soest*, 2002**).

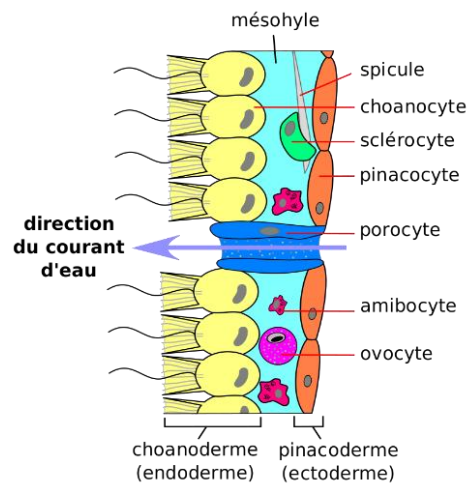


Figure 4 : Structure histologique d'un *Porifera* de type asconoïde vue en coupe

(Source : Wikimedia Commons)

Les éponges obtiennent le carbone organique et l'oxygène par un simple mécanisme de filtration d'eau qui y pénètre à travers les pores en se dirigeant à l'intérieur du réseau inhalant de l'organisme à travers le mouvement continu des cellules à collerettes flagellées qui emportent l'eau vers les chambres choanocytaires où elle est filtrée, et les particules nutritives sont captées par la collerette. À la fin de cette opération l'eau rejoint un réseau de canaux exhalants avant de quitter l'éponge via l'oscule (Hofmann *et al.*, 2005 ; Vogel, 1977).

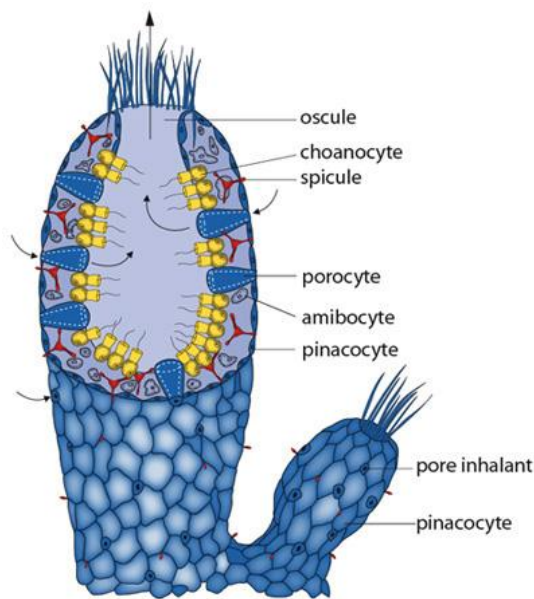


Figure 5 : Aspect général d'un spongiaire montrant la trajectoire de l'eau : L'eau pénètre par les pores de l'éponge à la surface et sort via l'osculum (**Auteur anonyme**)

4.1.5. Microorganismes associés aux éponges :

Ce qui est le plus intéressant chez ces créatures marines est que non seulement elles ont pu résister à une très longue période d'évolution avec la présence dans la mer de nombreux agents pathogènes et de parasites potentiels, mais aussi elles ont la capacité d'héberger des communautés extrêmement denses et diverses de micro-organismes symbiotes : eucaryotes (**Baker et al., 2008 ; Cerrano et al., 2004 ; Bovio, 2019**), archées (**Webster et al., 2004**), bactéries (**Taylor et al., 2007**) et même des virus et des bactériophages (**Lohr et al., 2005; Harrington et al., 2012**). Ces interactions se présentent sous de nombreuses formes. Pour une éponge, différents microbes peuvent représenter des sources de nourriture, des pathogènes/parasites ou des symbiotes mutualistes. Pouvant constituer jusqu'à **35 %** de la biomasse totale des éponges et se trouvent à des densités supérieures à **10⁹** cellules microbiennes par centimètre cube de tissu d'éponge (**Taylor et al., 2007**). Cependant, aucune donnée concluante n'était disponible pour dire quelles souches bactériennes sont symbiotiques et quelles souches sont parasitaires.

4.1.6. Diversité connue des microorganismes associés aux éponges :

Grâce aux travaux de **Hentschel et ses collaborateurs (2002)**, qui à travers différentes techniques moléculaires et/ ou de culture dépendante ils ont pu établir plusieurs bibliothèques d'ARNr 16S, à partir de l'analyse de 190 séquences d'ADN ribosomique 16S (ADNr) dérivées d'une éponge. **14** groupes de séquences monophylétiques spécifiques aux éponges ont été identifiés, appartenant à au moins sept différentes divisions bactériennes : Acidobactéries (n 44; **23%**), Chloroflexi (n 42; **22%**), Actinobactéries (n 24; **12%**), Alphaproteobacteria (n 13; **7 %**), les gamma protéobactéries (n 20; **10 %**), les deltaproteobacteria (n 15, **8 %**), les cyanobactéries (n 7; **4 %**) et l'embranchement Nitrospira (n 7; **4 %**) étaient également abondants. Les séquences liées aux Bacteroidetes (n 5; **3%**) et à la classe des Spirochaetes (n 1; **0,5%**) n'étaient que des composants mineurs des banques de gènes (**Figure 6**). (Cinq membres de ces groupes ont été présents dans chacune des trois espèces d'éponge à partir desquelles des banques d'ARNr 16S ont été construites).

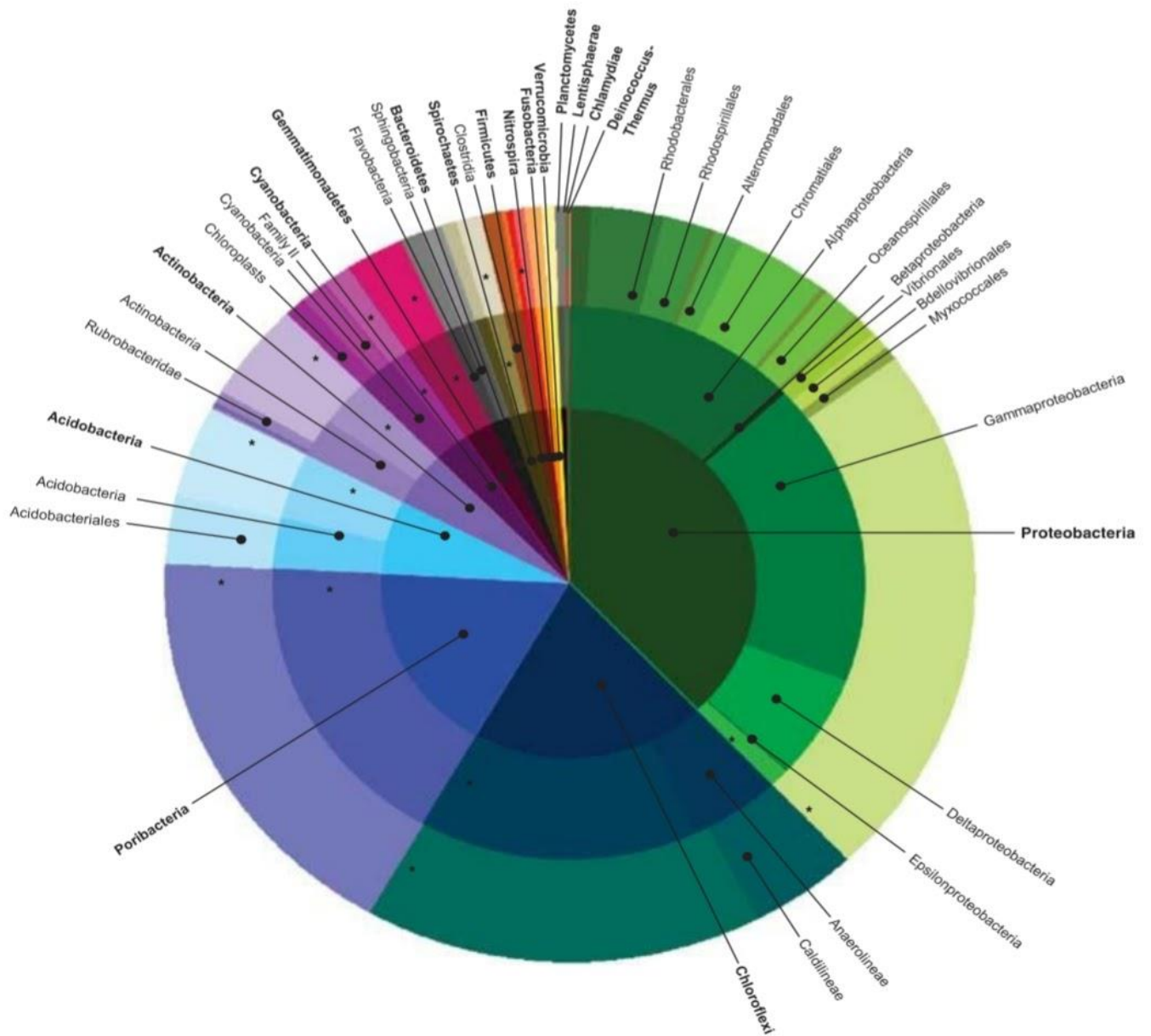


Figure 6 : Diversité bactérienne associée à 32 espèces d'éponges de localisation géographique distincte à travers le monde (données de pyroséquençage ARNr 16S). Distribution phylogénétique à **97 %** d'identité, phylum (cercle intérieur), classe (cercle du milieu), et ordre (cercle extérieur) (**Schmitt *et al.*, 2012**)

4.1.7. Micro-organismes symbiotiques ou source d'alimentation ?

La plupart des microorganismes associés aux éponges habitent la mésohyle, elle est donc à la fois le site de digestion des microorganismes (qui peuvent être des particules alimentaires) et le foyer de vastes communautés de microorganismes symbiotiques (**Hentschel *et al.*, 2012**), ce qui constitue une énigme qui n'a pas de réponse concrète à ce jour. Cependant, de nombreuses recherches ont été réalisées pour comprendre les mécanismes de reconnaissance, d'adhésion et de signalisation cellulaires responsables d'éliminer les particules du non-soi et garder les particules du soi. Il a été découvert que les éponges marines possèdent un système d'immunité innée étonnamment bien développé qui se caractérise par la présence :

- de domaines SRCR du récepteur de reconnaissance type scavenger contenant des molécules de surface cellulaire impliquées dans la reconnaissance bactérienne (**Müller *et al.*, 2003**).
- d'un système variable de type immunoglobuline et des cascades de kinases activées par lipopolysaccharide LPS (**Müller *et al.*, 2003**).
- d'un mécanisme enzymatique : interferon-like 2',5'-Oligoadénylate synthétase qui est responsable de la défense contre les virus à ARN double brin (**Müller *et al.*, 2003**).

Il existe donc des preuves que les éponges sont capables de reconnaître ces microorganismes, ce qui fait que les symbiotes présumés qui sont ingérés passent à travers l'hôte indemnes, alors que les bactéries non symbiotes ingérées sont généralement consommées (**Hentschel *et al.*, 2012**).

4.2. Les algues :

4.2.1. Présentation générale des algues et leur biodiversité :

Les algues sont les plantes aquatiques (**Ziani, 2019**) les plus anciennes (**Lavie, 2019**). Pouvant être unicellulaires ou multicellulaires (**Bhowmick et al., 2019**), ces organismes se trouvent souvent fixés sur un substrat par des crampons riches en polysaccharides (**Chbani et al., 2011; Zehlila, 2017**); et vivent généralement isolés ou regroupés en colonies, en particulier dans les milieux aquatiques, humides et éclairés tels que les mers, les eaux douces, les sols humides et même sur la neige (**Bhowmick et al., 2019 ; Gévaert, 2001**).

Leur appareil végétatif est dépourvu de racines, de tiges et de feuilles (**Djilali et Kherouni, 2016**) il est appelé thalle (**Lavie, 2019**). Elles possèdent une paroi cellulaire partiellement cellulosique, des petits noyaux et des chromatophores qui contiennent la chlorophylle (**Garon-Lardiere, 2004**). Ces plantes chlorophylliennes, sont classées comme des organismes photosynthétiques dépendant de la lumière (**Gévaert, 2001**), synthétisant leur propre matière organique. Elles sont aussi considérées comme productrices d'oxygène (**Djilali et al., 2016**). Par ailleurs, elles peuvent être influencées par des facteurs physiques et chimiques tels que : la salinité, la profondeur, la lumière, le substrat et l'émersion (**Ozenda, 2000**).

Les algues représentent la grande masse végétale du milieu marin (**Zehlila, 2017**) ; il existe entre **20 000** à **30 000** espèces dans le monde environ **22 250** espèces selon la base de donnée (**World Register Of Marine Species consultée en août 2020**), équivalant à **18%** du règne végétale (**Garon-Lardiere, 2004**).

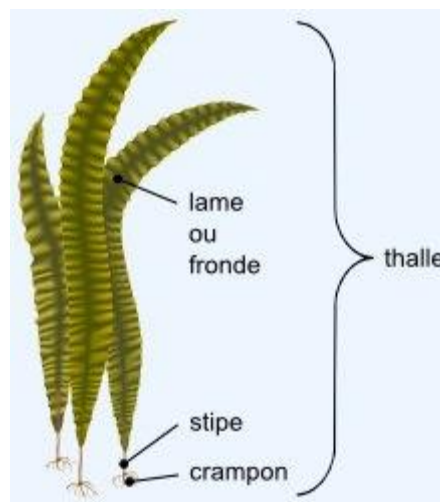


Figure 7 : Appareil végétatif des algues marines (Ziani, 2019)

4.2.2. Classification des algues :

La classification se fait selon des critères précis, parmi lesquels : la taille, la pigmentation, la présence ou l'absence du noyau.

Les algues se répartissent en deux groupes principaux selon leur taille, qui varie de moins d'un micromètre à plusieurs dizaines de mètres, on distingue :

A. Les macro algues (algues marines) : comprennent environ **25 000** espèces dont seulement 50 sont exploitées aujourd'hui (Zehlila, 2017)

Ce sont des algues macroscopiques, uni-multicellulaires que l'on trouve principalement dans les eaux peu profondes (Lavie, 2019 ; Burlot, 2016), elles contiennent des noyaux différenciés qui veut dire eucaryotes (Garon-Lardiere, 2004)

Selon Ziani, (2019), ces macroalgues sont divisées en trois groupes en fonction de leur pigmentation :

-**Les algues vertes (Chlorophyta)** : peuvent vivre dans les eaux douces ou les milieux marins.

-**Les algues brunes (Phaeophyta)** : la majorité sont marines.

-**Les algues rouges (Rhodophyta)** : elles sont marines (Garon-Lardiere, 2004).



Figure 8 : Certaines espèces d'algues : a-les algues vertes (Chlorophycées), b-Les algues brunes (Phéophycées), c-Les algues rouges (Rhodophycées), d- Les algues bleues (Cyanophycées)

(Source : la base de données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la faune et la flore Subaquatiques et la galerie photo de World Register of Marine Species, 2020)

Ces distinctions de couleurs des différents groupes d'algues se retrouvent dans leur composition biochimique : pigments photosynthétiques, substances de réserve (amidon : α -1-4 glucanes chez les verts et laminaranes, β -1-3 glucanes chez les bruns), constituants des parois cellulaires et extracellulaires (cellulose chez les verts, alginates chez les bruns) (Tableau I) (Kornprobst, 2005).

Tableau I : Composition des trois principaux groupes d'algues

Pigments	Vert	Rouge	Brun
	Chl. a & b Caroténoïdes	Chl. a Caroténoïdes	Chl. a & c Caroténoïdes Phycobilines
Réserves	Amidon (α -1,4 glucanes)	Amidon Floridéen (α -1,4 glucanes)	Laminaranes (β -1,3 glucanes)
Parois	Cellulose (β -1,4, glucans)	Carraghénanes Agars (galactanes sulfatés)	Acides alginiques (Poly-mannuronates) Acides fuciniques (Fucanes sulfatés)

(Kornprobst, 2005)

B. Les micros algues :

Le monde végétal marin, contient également du phytoplancton, qui est composé de toutes les plantes vivantes en suspension dans l'eau appelées microalgues. (Lavie, 2019).

Elles sont divisées en quatre lignes, chacune comportant de 1 à 7 branches : Ligne marron : chlorophylles a et c, telles que les dinoflagellés et les diatomées (Elgamal, 2010) ; Ligne verte : chlorophylles a et b ; Ligne rouge : chlorophylle a et biliprotéines ; Cyanobactéries : chlorophylle a et biliprotéines (Pasquet, 2011).

Ce sont des organismes microscopiques et unicellulaires qui constituent le phytoplancton ; ils vivent en suspension dans les eaux de surfaces (Lavie, 2019 ; Garon-Lardiere, 2004).

Les microalgues et les cyanobactéries utilisent la lumière comme source d'énergie pour fixer le dioxyde de carbone (CO₂) (Cadoret et Bernard, 2008).

Les cyanobactéries ou algue bleue comprend environ 756 espèces selon la base de donnée (World Register Of Marine Species, 2020), elles sont une classe des bactéries mais ont un trait commun avec les algues (Taourirt et Kemmad, 2019) qui est la présence de la chlorophylle et d'autres pigments hydrosolubles (Djemai, 2019), considérées comme procaryote grâce à l'absence du noyau (Garon-Lardiere, 2004). Ils sont définis comme une flore commensale qui peut vivre en symbiose avec les invertébrés marins (Pasquet, 2011) et qui est la source de plusieurs métabolites bioactives intra ou extracellulaires ayant des activités biologiques diverses (Trabelsi et al., 2010).

4.2.3. Bactéries associées aux algues :

Les algues, comme les autres organismes marins, ont la caractéristique de vivre en symbiose avec les micro-organismes. Les plus abondants à la surface des algues sont les bactéries, notamment les bactéries Gram négatif qui sont les plus étudiées (Othmani, 2014). Ces bactéries peuvent être intracellulaires ou extracellulaires (dans la phycosphère), et leur abondance est positivement proportionnelle à la concentration d'algues (Sechet et al., 1997).

Selon Kong & Chan, (1979) et Longford et al., (2007), les bactéries associées aux algues sont spécifiques et différentes de celle de la mer environnante. Les communautés bactériennes symbiotiques varient d'une espèce d'algue à une autre en fonction de la saison et des sections du thalle (Salaün et al., 2012; Egan et al., 2013). Selon une étude récente sur la diversité des bactéries associées aux algues et à l'eau de mer, il a été constaté que les isolats de phytoplancton montraient que 70% des souches appartenaient aux genres *Vibrio* ou *Aeromonas*, contrairement aux isolats d'eau de mer qui ne contenaient que 45% de ces genres (Cole, 1982)

Certaines bactéries épibiontes qui sont fixées à la surface des algues ont la capacité de protéger leur organisme hôte contre le biofilme, comme des bactéries symbiotiques des algues brunes *Fucus serratus*, *Laminaria digitata* et l'algue verte *Codium fragile* qui contrôlent la communauté microbienne à la surface des algues, par deux mécanismes : en inhibant la croissance, ou bien en repoussant les bactéries concurrentes (Dobretsov et Pei-Yuan, 2002).

Selon **Rishiram Ramanan *et al.*, (2016)**, il existe trois type d'interactions algue-bactérie : le mutualisme, le commensalisme et le parasitisme :

- Le mutualisme : est une interaction qui conduit au bénéfice mutuel des deux organismes bactéries-algues par exemple les bactéries qui produisent la vitamine B12 en échange de carbone fixe.
- Le commensalisme : Contrairement au mutualisme, le commensalisme est une relation dans laquelle un partenaire profite des avantages de l'autre ; comme les bactéries commensales qui s'associent aux algues pour le carbone et l'abri.
- Le parasitisme : est lorsqu'un organisme vit dépendant d'un autre et l'utilise pour se nourrir, se loger et se reproduire et peut être dangereux pour l'hôte, par exemple, les bactéries parasites qui se trouvent dans la paroi cellulaire des algues, pour faciliter la dégradation de la paroi cellulaire.

Chaque partenaire dans cette interaction a la capacité de stimuler ou d'inhiber la croissance de l'autre, nous citons trois exemples : l'algue inhibe la croissance des bactéries par la production des antibiotiques, la bactérie stimule la croissance des algues par la synthèse de la vitamine B, et la bactérie inhibe la croissance des algues par son métabolisme en produisant des acides organiques modifiant l'environnement qui influence la croissance des algues (**Cole, 1982**).

L'association bactérie-algue stimule la synthèse des composés bioactifs produits par les communautés bactériennes associées (**Khelloufi, 2014**), ces métabolites sont synthétisés au cours de la longue phase stationnaire des bactéries marines (**Dobretsov *et* Pei-Yuan, 2002**).

La facilité de culture d'une quantité importante de biomasse de ces bactéries épiphytes produisant des métabolites actifs indique que les bactéries associées aux algues peuvent être investies dans le domaine des biotechnologies tels que la production d'antimicrobiens, il est donc conclu que ces substances produites constituent une source naturelle intéressante pour le secteur biomédical et industriel (**Salaun, 2009**).

À ce jour, il n'existe que quelques exemples de bactéries isolées à partir de macroalgues qui sont étudiées pour leurs propriétés pharmaceutiques et industrielles, mais la recherche en est encore à ses débuts (Salaun, 2009).

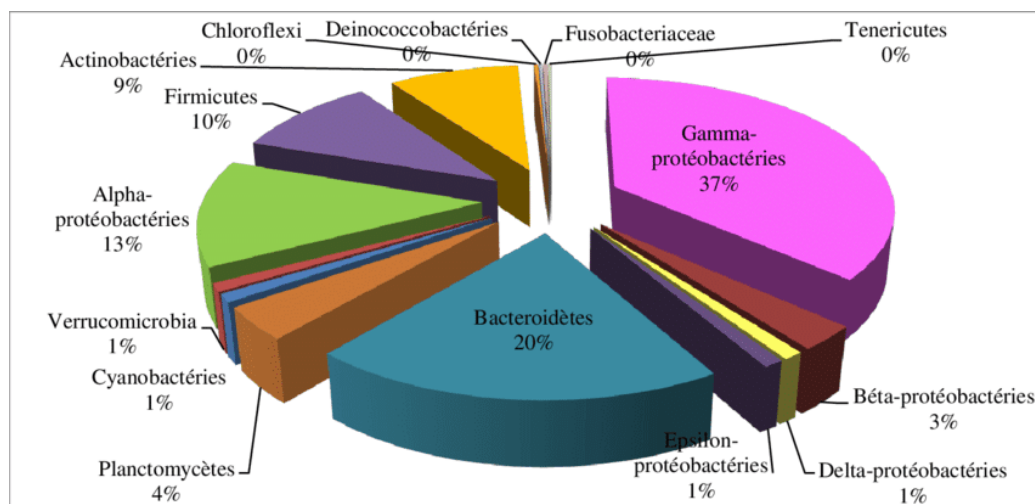


Figure 9 : Bilan des phyla bactériens rencontrés à la surface des macro-algues (Hollants *et al.*, 2012)

4.3. Les coraux :

4.3.1. Présentation générale des coraux :

Les coraux sont des invertébrés métazoaires, ce nom a été donné pour les coraux rouges de Méditerranée *Corallium rubrum* (Linnaeus, 1758) ou corail de bijouterie, aujourd'hui en revanche, il désigne de nombreuses espèces de cnidaires marins (Figure 11) avec des caractères biologiques et anatomiques différents (Vimal, 2007).

A la fois animal, végétal et minéral, le corail reste un organisme méconnu. Il joue pourtant un rôle important dans la biodiversité marine.



Figure 10 : Corail rouge de Méditerranée *Corallium rubrum*

(Source : Galerie de photos de la base de donnée World Register of Marine Species WoRMS, 2020)

4.3.2. Biodiversité globale des coraux :

Les coraux appartiennent au phylum des Cnidaires apparus il y a au moins **500** millions d'années (Stanley, 2003), et à la classe des Anthozoaires qui contient actuellement environ **7 500** espèces existantes de tailles, de couleurs et de formes différentes et fascinantes. Elle se divise en deux sous-classes principales : les Octocoralliaires et les Hexacoralliaires. Les Hexacoralliaires constitués de **4300** espèces environ, comprennent tous les coraux scléactiniaires et noirs, les anémones tubulaires et les anémones de mer. Les Octocoralliaires constitués de **3000** espèces environ, comprennent les coraux mous, les gorgones (gorgones, fouets de mer), les plumes de mer et le corail bleu (Daly *et al.*, 2007).

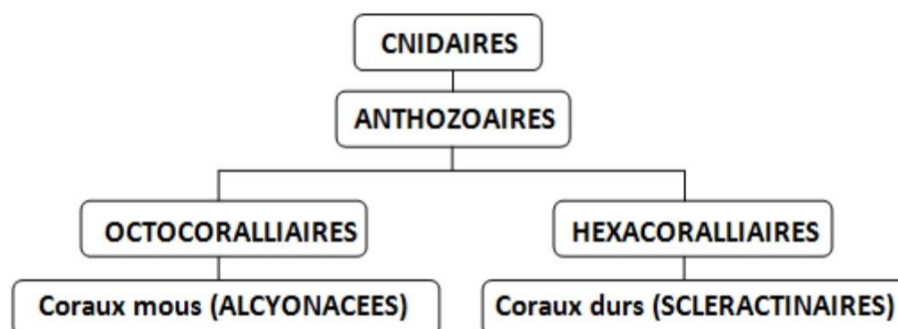


Figure 11 : Organigramme simplifié des Cnidaires classe Anthozoaires (Daly *et al.* 2007)

Les cnidaires sont considérés parmi les espèces les plus fréquentes sur le plan de la biodiversité des récifs coralliens. Selon Guibert, (2018), environ au moins **25%** d'espèces

marines cohabitent dans les récifs coralliens. Parmi ces espèces marines on trouve : les poissons, les mollusques, les cnidaires, les crustacés, les échinodermes, les algues, les éponges et les ascidies (**Guibert, 2018**).

4.3.3. Biologie des coraux :

Les coraux sont des organismes diploblastiques, ils vivent généralement en colonies d'individus appelées polypes à l'état fixé au substrat (**Erhenberg, 1831 et Kayal, 2011**), leur anatomie présente une symétrie radiaire. Possédant une organisation interne très simple, ils sont constitués d'une double paroi autour d'une cavité gastro-vasculaire centrale, qui est constituée de deux feuillets accolés et emboîtés : un feuillet externe : l'ectoderme et un feuillet interne : l'endoderme. Entre ces deux feuillets se trouve une substance gélatineuse plus ou moins abondante et pauvre en cellules : la mésoglée (**Barnes, 1987**). Cette cavité gastro-vasculaire joue à la fois le rôle d'estomac et d'intestin, elle est munie d'une ouverture unique jouant le rôle de bouche mais aussi d'anus.

Les cnidaires ne possèdent pas de tête différenciée, cependant autour de la bouche on retrouve une couronne de tentacules couverte de cellules urticantes aboutissant à la cavité gastrique. Le système nerveux est rudimentaire ; il assure les réflexes et la coordination. (**Vimal, 2007**).

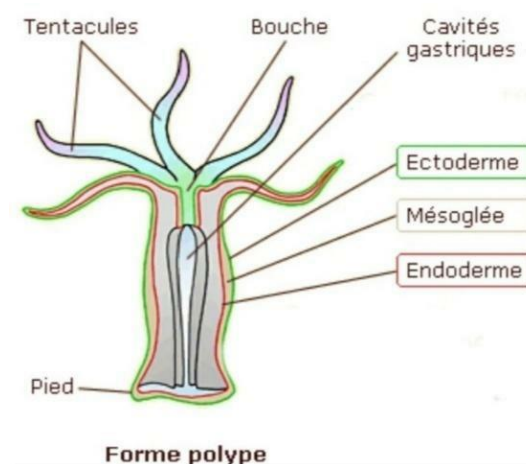


Figure 12 : Anatomie générale d'un polype de Cnidaire (**Hedouin, 2015**)

a. Catégories des coraux :

On distingue 3 grandes catégories de coraux :

- **Les coraux mous** : ce sont des Alcyonacea, constitués de polypes comme unité de base et dépourvus de squelette, ils ne participent pas à l'élaboration calcaire des récifs.

- **Les coraux durs ou coraux récifaux** : ce sont des scléactiniaires constructeurs de récifs possédant une partie vivante et contractile, formée d'un ou plusieurs polypes comme unité de base et d'un squelette calcaire correspond la partie interne du corail et constitue sa base. Les coraux créent leur squelette de carbonate de calcium selon un processus cellulaires et moléculaires complexes contrôlés par les gènes appelé calcification. Ce squelette est l'équivalent des os des vertébrés. (Vimal, 2007).

Les coraux Scléactiniaires existent depuis environ **250** millions d'années, Ce sont eux qui vivent en symbiose avec les Dinoflagellés (Stanley Jr, 2003). Ces micro algues du genre *Symbiodinium* : les zooxanthelles utilisent certaines molécules jouant un rôle très important dans le métabolisme de l'animal ; Les zooxanthelle contribuent dans la fabrication de l'ADN et fabriquent eux-mêmes des vitamines et des hormones utilisées par le polype (Crossland et Barnes, 1977 ; Grasse et al., 1987). Ils assurent l'élimination des déchets azotés et phosphorés du corail, enfin ils jouent aussi un rôle important dans la calcification. Les coraux et leurs algues symbiotiques exigent un environnement très stable pour se développer, tout stress environnemental risquerait leur mort.

- **Autres** : corail rouge, corail bleu...

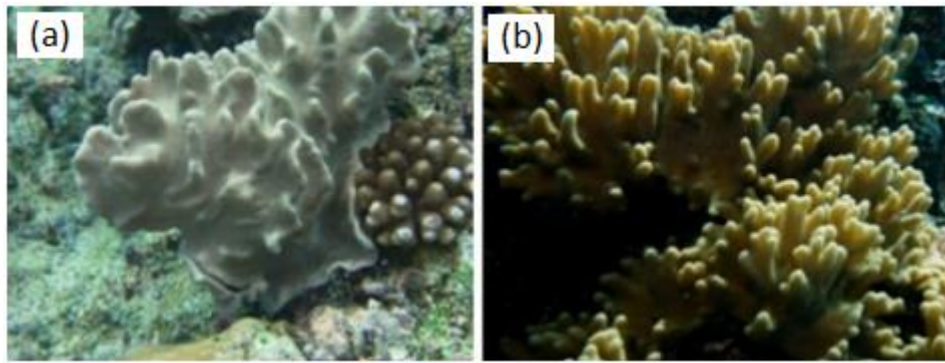


Figure 13 : (a) : *Silunaria flexibilis* exemple de corail mou ; (b) : *Porites cumulatus* exemple de corail dur (Source : Galerie de photos de la base de donnée World Register of Marine Species WoRMS, 2020)

b. Types de coraux :

On retrouve deux types de corail :

- a. Les coraux ahermatypiques dépourvus d'algues.
- b. Les coraux hermatypiques qui possèdent des microalgues dans leurs tissus (zooxanthelles).

Le couple corail (hôte) / zooxanthelle (symbiote) est couramment appelé holobionte. (Vimal, 2007).

4.3.4. Les récifs coralliens :

Les récifs coralliens sont des formations sous-marines construites par des organismes animaux qui synthétisent un squelette de carbonate de calcium (CaCO_3) : les coraux Scléactiniaires. On distingue deux catégories de récifs coralliens : les récifs d'eau froide en grandes profondeurs et les récifs tropicaux peu profonds. Les récifs en général font partie des écosystèmes les plus riches et diversifiés de la planète, car ils hébergent le quart des espèces marines connues. Ainsi, ils jouent un rôle de protection des côtes. (Bednarz *et al.*, 1988-2020).

4.3.5. Les microorganismes associés aux coraux :

Il est apparu clairement que les coraux sont également associés à d'autres microorganismes (bactéries, virus, champignons) qui jouent un rôle clé dans leur santé ou leur nutrition. Les coraux ont su élaborer de nombreuses défenses, correspondant à un potentiel d'innovations précieux pour la santé humaine. Selon **Gault, (2009)** « 40% des molécules des coraux possèdent des propriétés antivirales, antimicrobiennes ou anti-inflammatoires. Il y a tout dans la nature ! ».

Les communautés les plus diverses que l'on trouve sont les procaryotes précisément les bactéries productrices d'antibiotiques ou de vitamines (**Van Oppen et al., 2017**).

Les bactéries symbiotes d'organismes sont différentes par leur diversité ainsi que par leur abondance, ce qui entraîne des interactions spécifiques (**Rohwer et al., 2001**). Les interactions entre les coraux et les microorganismes autotrophes et hétérotrophes et/ou bactéries, peuvent être associés à leur tissu coralliens (**Frias-Lopez et al., 2002**), à leur mucus (**Boume et Munn, 2005 ; Ritchie, 2006 ; Kellogg, 2004**), aux tissus eux-mêmes (**Banin et al., 2000 ; Boume et Munn, 2005**), ainsi que dans leurs squelette (**Rohwer et al., 2002**).

Certaines études recherchent les effets de la température sur l'association coraux-bactéries, en effet l'élévation de la température de l'eau peut favoriser le développement des pathogènes, leur transmission à l'hôte et diminuer sa résistance.

Selon **Reshef et al., (2006)**, les coraux s'adaptent aux changements environnementaux en modifiant les communautés bactériennes associées.

Les bactéries associées aux coraux sont divisées en quatre groupes fonctionnels ils peuvent avoir des effets à la fois bénéfiques et néfastes sur la santé et la survie de l'hôte (**Guibert, 2018**) :

- 1) Les bactéries pathogènes.
- 2) Les bactéries ayant un rôle possible dans la nutrition des coraux.
- 3) Les bactéries probiontes aidant à la croissance des bactéries bénéfiques et limitant la croissance des pathogènes.

4) Les bactéries purement commensales qui n'ont aucun impact sur les trois autres groupes (Klaus *et al.*, 2005; Tremblay, 2009).

4.4. Les ascidies :

4.4.1. Biodiversité des ascidies :

Les ascidies ont peuplé toutes les mers et tous les océans du monde. Représentées par plus de 2 300 espèces identifiées, elles sont trouvées à de grandes profondeurs (plus de 400 mètres) (World Register Of Marine Species, 2020).

4.4.2. Présentation générale des ascidies :

Les ascidies sont des invertébrés sessiles (Erwin *et al.*, 2012) benthiques qui vivent fixées sur tout type de support (roche, sable, coraux, algue, quais, épaves...) et sont rencontrées souvent dans les ports et les marinas (Erwin *et al.*, 2012).

Ces animaux marins appartiennent à l'embranchement des Prochordés, au sous-embranchement des Urochordés ou Tuniciers.

4.4.3. Différentes classes des ascidies :

Il existe 3 formes d'ascidies selon leurs apparences physiques :

1. Les Ascidies simples ;
2. Les Ascidies sociales ;
3. Les Ascidies composées ou synascidies. (Moreau, 2009).

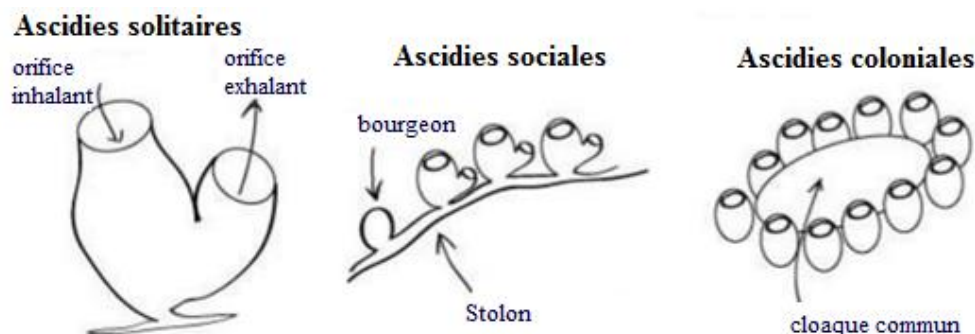


Figure 14 : Schéma simplifié des différentes formes d'ascidies (Moreau, 2009)



Figure 15 : a) exemple d'ascidie simple : *Halocynthia pyriformis* ; b) exemple d'ascidie coloniale : *Clavelina lepadiformis* ; c) exemple d'ascidie composée : *Botrylloides violaceus*

(Source : Galerie de photos de la base de donnée World Register of Marine Species WoRMS, 2020)

4.4.4. Biologie des ascidies :

Les ascidies sont des organismes deutérostomiens (la bouche apparaît après la formation de l'anus au niveau de l'embryon) avec une symétrie bilatérale.

La corde est une structure rigide dorsale qui se situe entre le système nerveux (dorsal) et le tube digestif (ventral). Les chordés possèdent fentes branchiales au niveau du pharynx.

Les ascidies sont des animaux filtreurs microphages, ils sont constitués d'un sac percé d'un orifice inhalant le siphon buccal et d'un orifice exhalant le siphon cloacal.

L'eau, et les aliments entrent par le siphon buccal ou ils seront filtrés au niveau du pharynx, les nutriments se dirigent vers l'estomac tandis que l'eau se dirige vers la cavité du pharynx constitué de cellules péribranchiales. La vibration des branchies assure la circulation de l'eau et sa filtration. L'anus se situe dans la cavité péribranchiale, les déchets et l'eau et du métabolisme vont être redirigés vers le siphon cloacal et être ainsi évacués.

Au stade larvaire la corde de l'animal est caudale, cette larve est aquatique, libre et nageuse, une fois arrivée au stade adulte, elle reste toujours aquatique mais avec un mode de vie fixé sur les roches, coques de bateaux, algues.

Ces animaux possèdent un tégument constitué de tunicine (riche en cellulose) qui permet la fixation et sert d'abri, on retrouve aussi des polysaccharides sulfatés, des protéines (élastine, collagène). Les adultes vivent soit en colonies, soit de façon solitaire (**Monniot, 2005**).

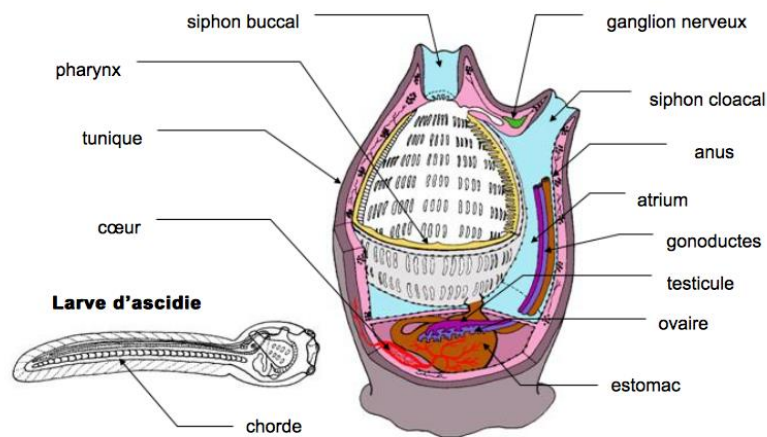


Figure 16 : Aspect général d'une ascidie simple (**Lavie, 2019**)

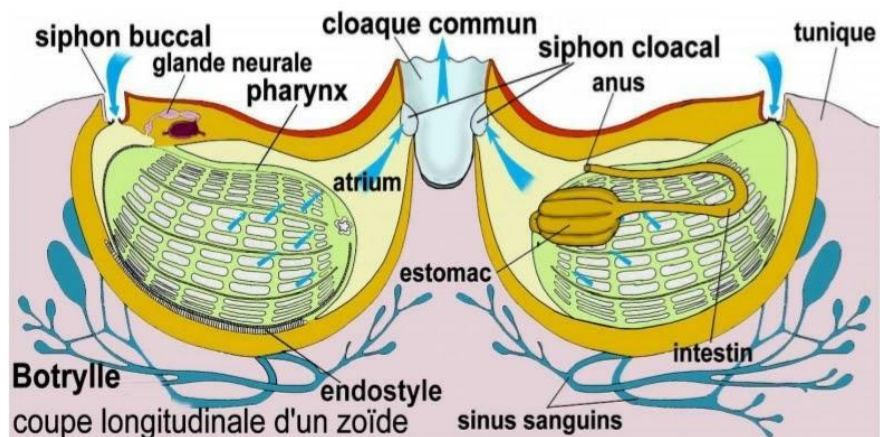


Figure 17 : Aspect général d'une ascidie coloniale (**Moreau, 2009**)

4.4.5. Les microorganismes associés aux ascidies :

La majorité des ascidies ne vivent pas de manière indépendante, elles forment des associations symbiotiques avec différents microorganismes, cette association est appelée holobionte. Le rôle écologique de ces symbioses microbiennes n'est pas bien défini chez les ascidies. D'autre part, elles participent également à l'enrichissement du métabolisme de l'hôte en synthétisant des métabolites secondaires (**Erwin *et al.*, 2012**).

Ces micro-organismes associés coexistent dans l'enveloppe polysaccharidique (tunique) de l'ascidie plissée, une région qui entoure les zooïdes et est isolée de l'appareil de filtration (poche branchiale) et du système digestif (**Erwin *et al.*, 2012**).

Les associés microbiens des ascidies sont très peu étudiés par rapport aux éponges et aux coraux. Les ascidies adultes et/ou fixes peuvent accueillir des symbiotes chez certaines espèces, qui peuvent être des cyanobactéries (**Beaumont *et al.*, 2009**). L'association la plus connue est celle entre les ascidies de la famille des didemnidae et les cyanobactéries unicellulaires Prochloron (Prochlorales), les bactéries les plus abondantes chez les ascidies sont les protéobactéries, en particulier les protéobactéries alpha et gamma proteobacteria (**Erwin *et al.*, 2012**).

Conclusion :

La biodiversité marine est dans sa globalité très différente de celle observée sur l'espace terrestre. L'environnement marin abrite beaucoup d'anciens phyla, pas autant d'espèces que l'environnement terrestre mais une diversité de phyla beaucoup plus développée.

Les organismes marins que nous avons étudiés dans ce chapitre ont des caractéristiques anatomiques très originales. Notamment les éponges marines qui représentent une composante importante de l'écosystème des communautés benthique dans le monde. Leur succès évolutif et écologique est donc attribué, au moins en une partie, à leurs associations intimes avec des symbiotes microbiens. Cependant de nombreux aspects fondamentaux de la biologie des micro-organismes des éponges restent inexploités, en particulier dans les

domaines du métabolisme. Ce qui a fait croître notre intérêt pour la recherche sur ce sujet qui promet un avenir brillant.



CHAPITRE II

CHAPITRE II : CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

L'habitat marin est une source prolifique de métabolites secondaires bioactifs qui pourraient servir à traiter plusieurs maladies (**Montaser et Luesch, 2011**). Plus de **50 %** des médicaments vendus en pharmacie correspondent à des produits naturels (ou issus de synthèses à partir de produits naturels) et plus de **5 000** de ces molécules sont issues d'organismes marins. Une analyse comparative effectuée par Kong et ses collègues a montré que les produits naturels marins sont supérieurs aux produits naturels terrestres en termes de nouveauté chimique et de bioactivité (analyse mentionnée dans le Dictionary of Natural Products (DNM) et Dictionary of Marine Natural Products (DMNP)) (**Kong et al., 2010**).

De ce fait, de nombreux groupes de chercheurs ont exploré durant ces trente dernières années les composés bioactifs issues de nouvelles sources marines tel que les invertébrés marins et de leurs micro-organismes symbiotiques.

Malgré le grand nombre de produits naturels isolés de sources marines au cours de la dernière décennie qui présentent une forte bioactivité pour diverses maladies, seuls quelques-uns ont eu la chance d'arriver au bout de la chaîne de découverte de médicaments (**Blunt et al., 2010, 2017**). **Leal et ses collègues (2012)**, ont montré qu'entre 2000 et 2009, un grand nombre de produits naturels provenant d'invertébrés marins ont été isolés du phyla Porifera (**47 %**) et des Cnidaires (**33 %**).

La littérature a décrit que la moitié (**50%**) des métabolites actifs des organismes marins ont une activité biologique anti-tumorale, et **10%** sont appliqués dans le domaine des antifongiques et le reste est divisé en différents domaines tels que les immuno-modulateurs, les antibiotiques, les anti-inflammatoires, les inhibiteurs enzymatiques (**Guezennec et Debitus, 2005**).

Dans ce qui suit nous allons vous présenter les principales biomolécules extraites à partir des éponges marines, d'algues, de coraux et d'ascidies ainsi qu'à partir de leurs micro-organismes associés.

1. Les spongiaires :

Les Porifera représentent un des phyla les plus étudiés. Plus de **5 300** produits différents sont connus à partir des éponges et de leurs microorganismes associés, et plus de **200** nouveaux métabolites provenant des éponges sont signalés chaque année (**Abad et al., 2011**). Faisant des spongiaires la source marine la plus importante des métabolites spécialisés.

Ces métabolites produits par les éponges et leur microflore associée peuvent être classés chimiquement en : alcaloïdes, terpénoïdes, glycosides, phénols, phénazines, polycétides, produits d'acides gras et peptides, analogues d'acides aminés, nucléosides, porphyrines, peroxydes cycliques aliphatiques et stéroïls (**Mehbub et al., 2014; Anjum et al., 2016 ; Taylor, 2007**).

Cette grande chimio-diversité est quant à elle responsable de nombreuses activités biologiques principalement : (**Mehbub et al., 2014**)

- les activités anticancéreuses ou antitumorale par : les quinones, les stéroïdes, les acides gras, les dicétopipérazines, les alcaloïdes, les terpènes, les terpénoïdes, les trichoverroïdes et les dérivés de prodigiosine, le diglucosyl-glycérol, les polykétides, les cyclopeptides, les glycoglycérolipides, les dérivés de l'acide benzoïque.
- antimicrobiennes par : polyketidesglycopeptides, dérivés de α -pyrone, peptides, protéines, antimycine, lipopeptides, éther biphényliquepolybromé, depsipetide cyclique, terpènes, pentaketides, acide furanecarboxylique, alcaloïdes, dicétopipérazines, anthraquinones, chromones, stéroïdes, lactones, dérivés de la quinolone, dérivés du trisindole, macrolactame, éthers, dérivé du phénol.
- anti-VIH par : les dérivés de quinolone.
- anti-inflammatoires par : les esters d'acides gras et les acides gras.

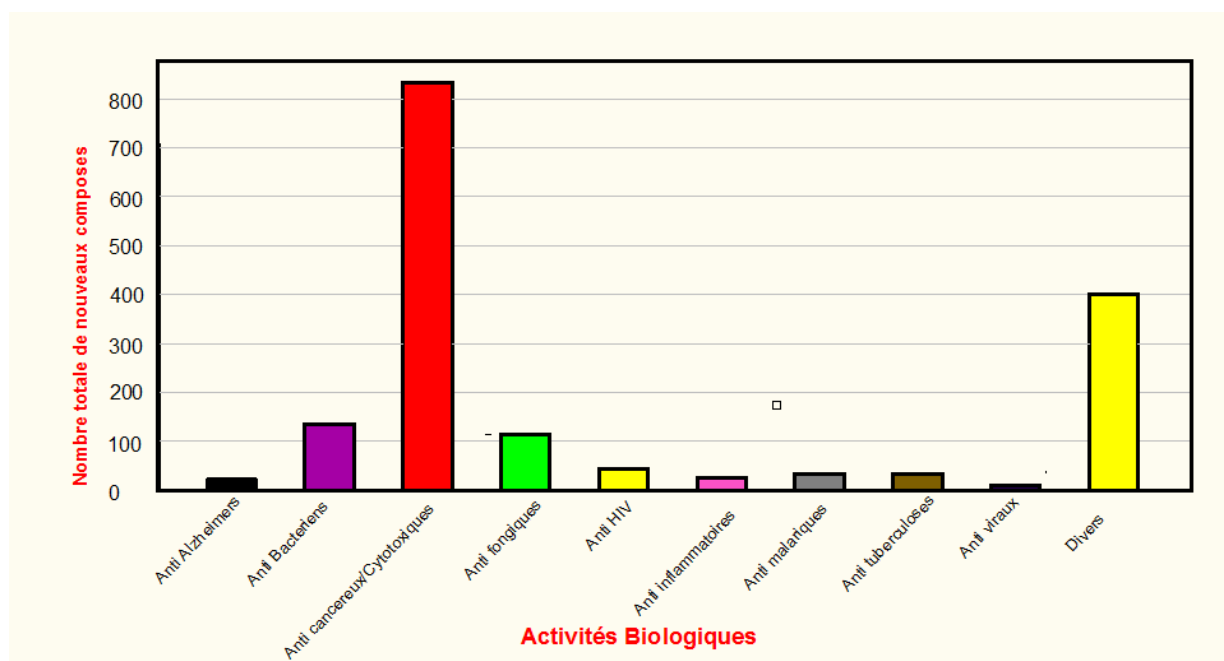


Figure 18 : Nombre total de nouveaux composés isolés à partir de différentes éponges marines avec diverses activités biologiques de 2001 à 2010 (Mehbub *et al.*, 2014)

En effet, en raison de la symbiose des éponges avec de nombreux micro-organismes, les métabolites spécialisés étudiés peuvent être d'origine bactérienne, de l'éponge elle-même ou encore issus d'une collaboration entre les deux organismes.

1.1. Métabolites actifs issus d'éponges :

Regroupés selon leurs activités biologiques en :

A. Anticancéreux :

- L'éribuline, un analogue synthétique de l'halichondrine B provenant des éponges *Halichondria* et *Lissodendoryx* spp a été approuvée en 2011 par la FDA comme médicament pour le traitement du cancer du sein métastatique (Huyck *et al.*, 2011).

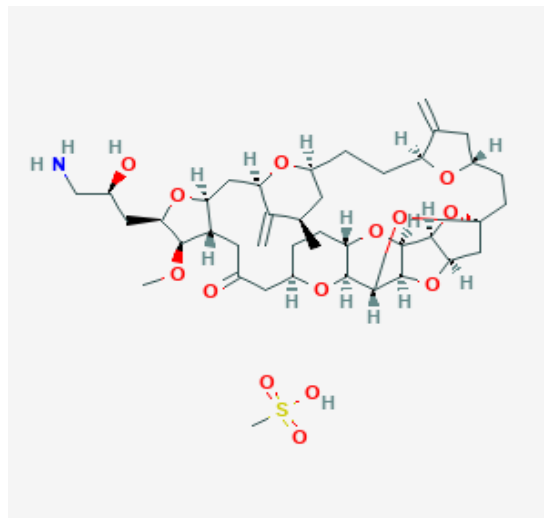


Figure 19 : Structure chimique de l'Eribulinemesylate CH₃SO₃H (**Base de données PubChem, 2020**)

- Quatre alcaloïdes de guanidine bicycliques et trois pentacycliques (1-7) ont été isolés à partir d'une éponge *Monanchora n. sp.* de Polynésie française, ainsi que les alcaloïdes connus monalidine A, les énantiomères 9-11 des crambescines de produits naturels connus, et les crambescidines connues 12-15. Tous les composés ont montré une efficacité anti-proliférative et cytotoxique contre les cellules cancéreuses KB, HCT116, HL60, MRC5 et B16F10, avec des valeurs de IC₅₀ allant de 4 nM à 10 µM (**El-Demerdash et al., 2016**).

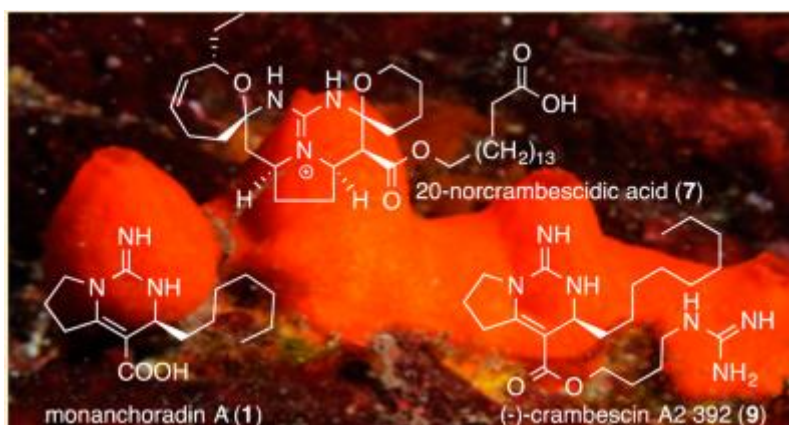


Figure 20 : Structures chimiques des alcaloïdes : acide 20-norcrambescidique (7) ; monanchoradine A (1) et (-)-crambescine A2 392 (9) (**El-Demerdash et al., 2016**)

-Neopetrosiamine A, un alcaloïde biologiquement actif de l'éponge marine *Neopetrosia proxima* a montré une forte activité inhibitrice contre le cancer de la peau (mélanome) MALME-3M, la leucémie CCRF-CEM et le cancer du sein MCF7, avec des valeurs de CI50 de 1,5, 2,0 et 3,5 μM respectivement (Wei *et al.*, 2010).

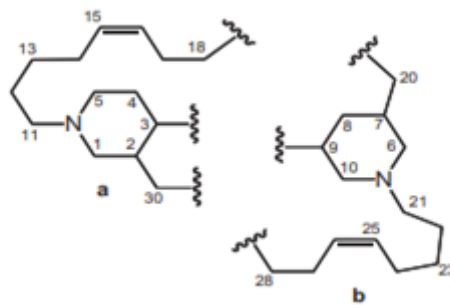


Figure 21 : Structures partielles a et b de l'alcaloïde Neopetrosiamines A (Wei *et al.*, 2010)

-L'Orbicularamide A, un peptide cyclique provenant d'une éponge marine *Theonella sp.* est cytotoxique contre les cellules de leucémie murine P388 (ED50 = 0,34 $\mu\text{g/mL}$), mais aussi contre différentes lignées cellulaires du mélanome (Fusetani *et al.*, 1991).

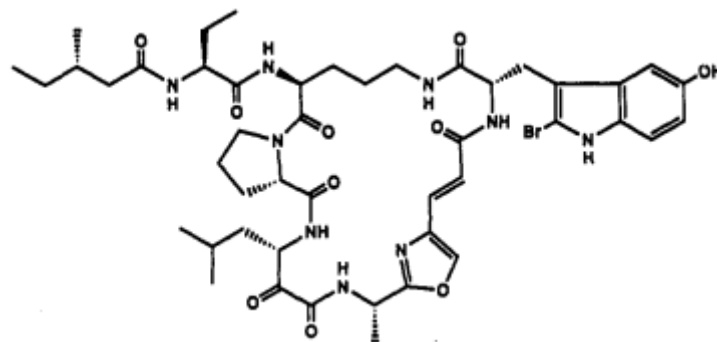


Figure 22 : Structure chimique du peptide cyclique Orbicularamide A (Fusetani *et al.*, 1991)

-La koshikamide B, un peptide cytotoxique provenant d'une éponge marine *Theonella sp.*, qui présente une cytotoxicité contre les cellules P388 de la leucémie murine et la lignée cellulaire HCT-116 de la tumeur du côlon humain (Araki *et al.*, 2008).

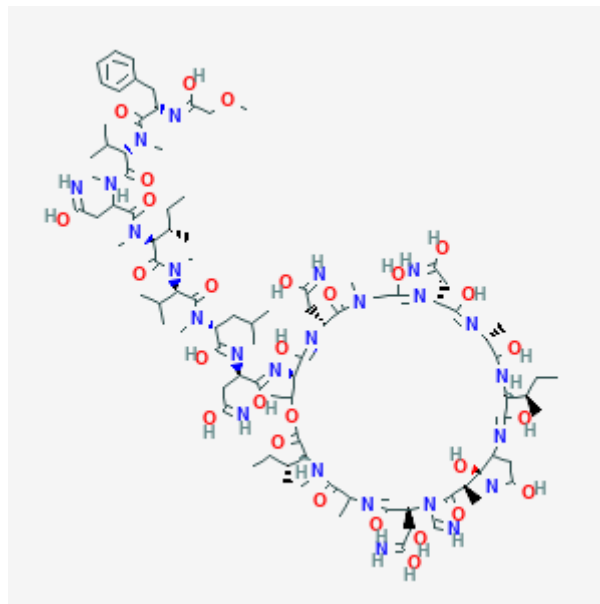


Figure 23 : Structure chimique du peptide Koshikamide B (Base de données Pub Chem, 2020)

- Les microcionamides A et B, sont deux nouveaux peptides linéaires cyclisés par l'intermédiaire d'une fraction de cystéine et isolés de l'éponge *Clathria (Thalysias) abietina*, ont montré une cytotoxicité significative contre les lignées cellulaires MCF-7 et SKBR3 du cancer du sein, ainsi qu'une activité inhibitrice contre *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Davis *et al.*, 2004).

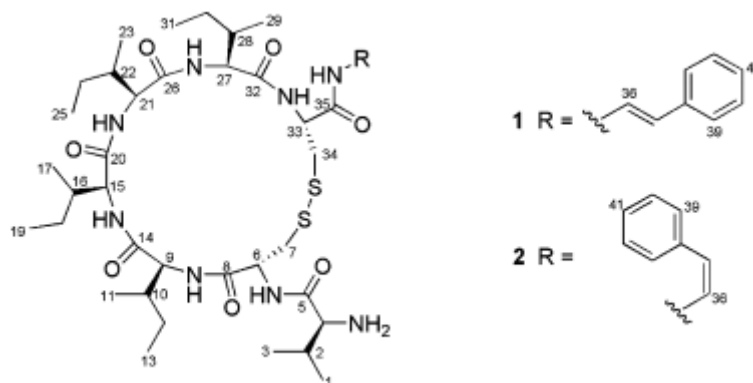


Figure 24 : Structures chimiques des peptides Microcionamides A (1) et B (2) (Davis *et al.*, 2004)

-Peloruside A, est un agent stabilisant les microtubules, isolé de l'éponge *Mycale henscheli* qui semble présenter des propriétés anticancéreuses prometteuses. Les

premiers essais précliniques étudièrent les effets de la Peluroside A sur la croissance de cellules cancéreuses du poumon à 5 et 10 mg/kg. La Peluroside A induit une inhibition de croissance des tumeurs de **84** et **95%** respectivement contre **50** et **18%** respectivement pour le paclitaxel (8 mg/kg) et docetaxel (6.3 mg/kg) (**Meyer et al., 2015**).

B. Antimalariques/ Antipaludiques :

- La chloroquine, est le traitement le moins cher et le plus sûr de tous les autres médicaments antimalariques, L'haliclona cyclamine A a été isolée de l'éponge marine *Haliclona sp* et présente une activité antipaludique *in vitro* contre les souches sensibles à la chloroquine (3D7 ; IC50 0-7 µM) et les souches résistantes à la chloroquine de *Plasmodium falciparum* (FcB1) (IC50 0-11 µM) (**Abdelmohsen et al., 2016**).
- Les alcaloïdes : bispyrroloiminoquinone, la tsitsikammamine C, et des makaluvamines J, G et L, isolés à partir de l'éponge marine australienne *Zyzya sp* ont présenté de puissantes activités antipaludiques contre les souches de *Plasmodium falciparum* sensibles à la chloroquine (3D7) et chloroquino-résistantes (**Abdelmohsen et al., 2016**).
- De nouveaux alcaloïdes dérivés de la thiazine, les thiaplakortones A-D, ont été isolés de l'éponge marine australienne *Plakortislita* ont montré des activités antipaludiques frappantes contre les souches de *P falciparum* sensibles à la chloroquine (3D7) et résistantes (Dd2) (IC50 <651 nM). La thiaplakortone A s'est avérée être le composé le plus actif contre les souches de *P falciparum* sensibles à la chloroquine (3D7 ; IC50 51 nM) et résistantes à la chloroquine (Dd2 ; IC50 6-6 nM) (**Abdelmohsen et al., 2016**).

C. Antibactériens :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités anti bactériennes :

Tableau II : Quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités anti bactériennes

Espèce d'éponge	Biomolécules	Classe	Activité antibactérienne contre	Source
<i>Neopetrosia proxima</i>	Neopetrosiamine A	Alcaloïde	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> et <i>Plasmodium falciparum</i>	(Wei <i>et al.</i> , 2010).
<i>Brachiaster sp</i>	Heteronemin	Sesterterpène	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(Wonganu chitmeta <i>et al.</i> , 2004)
<i>Diacarnus megaspinorhabdosa</i>	aaptamine	alcaloïde	Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)	(Rajivgandhi <i>et al.</i> , 2019)

D. Antiviraux :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités antivirales :

Tableau III : Quelques biomolécules extraites des éponges et leurs activités antivirales

Espèce d'éponge	Métabolites	Classe	Antivirale contre	Source
<i>Styliss acarteri</i>	Oroidin	Alcaloïde	Virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)	(O'Rourke <i>et al.</i> , 2016)
<i>Aaptos aaptos</i>	4-Methylaaptamine	Alcaloïde	Virus Herpès Simplex (HSV-1)	(Souza <i>et al.</i> , 2007)
<i>Homophymia sp.</i>	Homophymine A	Cyclodepsipeptide	VIH-1	(Zampella <i>et al.</i> , 2008)

1.2. Métabolites actifs issus des micro-organismes associés aux éponges :

A. Antibactériens :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités antibactériennes :

Tableau IV : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités anti bactériennes

Espèce d'éponge	Micro-organisme associé	Biomolécules	Activité antibactérienne contre	Source
<i>Halichondria panicea</i>	Actinobacteria <i>Streptomyces sp.</i> HB202	Mayamycin	<i>S. aureus</i>	(Schneemann <i>et al.</i> , 2010)
<i>Melophus sp</i>	Ascomycota <i>Penicillium sp.</i> FF001	Citrinin	<i>S. aureus</i>	(Subramani <i>et al.</i> , 2013)
<i>Haliclona simulans</i>	Firmicutes : <i>Bacillus subtilis</i> MMA7	Subtilomycin	<i>S. aureus</i> résistant à la métilicine	(Phelan <i>et al.</i> , 2013)

Espèce d'éponge	Micro-organisme associé	Biomolécules	Activité antibactérienne contre	Source
<i>Melophus sp.</i>	Ascomycota : <i>Penicillium sp.</i> FF001	Citrinin	SARM	(Subramani et al., 2013)
<i>Aplysina aerophoba</i>	Firmicutes : <i>Bacillus subtilis</i> A202	Iturin	<i>S. aureus</i> multi-résistante aux médicaments	(Pabel et al., 2003)
<i>Diacarnusmegaspini norhabdosa</i>	Non identifié	Alcaloïde : aaptamine	Bactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE)	(Rajivgandhi et al., 2019)
<i>Callyspongia sp</i>	<i>Brevibacterium sp</i>	Phénazines : 6-hydroxyméthyl-1-phenazine-carboxamide et 1,6-phenazinediméthanol	- <i>Enterococcus hirae</i> - <i>Micrococcus luteus</i> .	(Choi et al., 2009)
<i>Dendrilla nigra</i>	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> MAD08 (actinomycète)	-(Z)-9-octadécenamide -9,12-octadécadiénoïque acide méthyle ester	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Micrococcus luteus</i> - <i>Rhodococcus rhodochrous</i> - <i>Streptomyces</i> - <i>Vibrio cholerae</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>E. coli</i>	(Selvin et al., 2009)

Espèce d'éponge	Micro-organisme associé	Biomolécules	Activité antibactérienne contre	Source
<i>Xestospongia testudinaria</i>	Ascomycota : <i>Aspergillus sp.</i>	(-)-Sydonicacid (Z)-5-(Hydroxymethyl)-2-(61-methylhept-21-en-21-yl) phenol Aspergiterpenoid A Sydonol	<i>Escherichia coli</i>	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>Suberea mollis</i>	<i>Pseudovibrio sp</i>	Amifloxacin Carbenicillin Rescinnamine Chlorcyclizine Tioconazole Azaspiracids	Bactéries pathogènes pour l'homme.	(Bibi <i>et al.</i> , 2020)

B. Antiviraux :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités antivirales :

Tableau V : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux éponges et leurs activités antivirales

Espèce d'éponge	Micro-organisme associé	Biomolécules	Activité antivirale contre	Source
<i>Amphimedon sp</i>	<i>Truncatella angustata</i>	Cyclohexanolesisoprénylés sous forme de troncatéols A-N	Virus de la grippe A (H1N1)	(Zhao <i>et al.</i> , 2015)
<i>Callyspongia sp</i>	<i>Epicoccum sp</i>	Pyronépolyène C-glucosides	Virus de la grippe A (H1N1) et inhibition du NF-kappa B	(Peng <i>et al.</i> , 2012)
<i>Ircinia fasciculata</i>	Ascomycota : <i>Penicillium chrysogenum</i>	Sorbicillactone A	VIH-1	(Bringmann <i>et al.</i> , 2003)
<i>Petromica citrina</i>	<i>Bacillus sp</i>	Non identifié	Virus de la diarrhée virale	(Bastos <i>et al.</i> , 2013)

			bovine	
--	--	--	--------	--

2. Les algues :

2.1. Métabolites issus des algues :

Les algues sont abondantes dans le milieu marin et jouent un rôle important dans leur environnement, ils sont dépourvus de moyen de défense contre les prédateurs ce qui explique la production de composés ou de métabolites qui servent à leur protection et aussi de source de nourriture (**Chatter Riahi et al., 2011**). Parmi ces métabolites on cite : les polyphénols, (**King et Young, 1999**), les caroténoïdes, les polysaccharides et les stérols (**Abdul et al., 2020**), mais aussi les protéines, les lipides, les minéraux, les vitamines (A, B1, B9, B12, C, D et E) et les acides gras polyinsaturés (**Dhargalkar et al., 2005**). Dont la plupart sont dotés d'activités biologiques remarquables telles que : l'activité anti inflammatoire, antioxydante et antimicrobienne et anti-cancéreuse.

Les métabolites secondaires des algues varient entre les espèces ainsi qu'en fonction de la flore microbienne associée à ces algues (**Guezennec et Debitus, 2005**).

Les algues étaient alors considérées comme une ressource potentielle et exploitable dans le domaine pharmaceutique et thérapeutique ; les métabolites secondaires des macroalgues (les caroténoïdes, les composés phénoliques, les tanins, les flavonoïdes, les vitamines, etc) ont des propriétés antioxydantes importantes dans le domaine pharmacologique (**Chouikhi., 2013**). Selon **Sylvain, (2018)**, les recherches et les études sur les méthodes d'utilisation de la biodiversité marine dans le domaine de la santé humaine ont commencé dans les années 1970.

Les chercheurs ont découvert diverses substances extraites des algues qui ont des activités biologiques variées, nous en citons quelques exemples :

A. Anticancéreux :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites d'algues marines et leurs activités anticancéreuses :

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

Tableau VI : Quelques biomolécules extraites des algues et leurs activités anticancéreuses

Espèce	Biomolécule	Activité anticancéreuse contre	Source
Algue brune <i>Laminaria religiosa</i>	Les fucoxanthines	Cancer du côlon	(Zehlila, 2017)
Algue brune <i>Bifurcaria bifurcata</i>	Extrait non identifié	Cancer des poumons	(Pasquet, 2011)
Algue rouge <i>Chondriaatro purpurea</i>	Chondriamide A	Cancer du côlon	(Pasquet, 2011)
Algue rouge <i>Portiera hornemannii</i>	L'halomon	Une forte action cytotoxique sur différentes lignées cellulaires cancéreuses	(Kornprobst, 2005).
Algue rouge <i>Corallina pilulifera</i>	Extrait éthanolique	Cancer du col de l'utérus, Induit l'apoptose sur les cellules HeLa (adénocarcinome cervical humain)	(Pasquet, 2011)
Algue brune <i>Cystoseiratamariscifolia</i> , et <i>Dictyotadichotoma</i>	Extrait non identifié	Activités cytotoxiques sur trois lignées cellulaires cancéreuses (lymphome ; leucémie)	(Pasquet, 2011)
Algue rouge <i>Palmariapalmata</i> Les algues brunes <i>Laminaria setchellii</i> , <i>Macrocystis integrifolia</i> , <i>Nereocystis luetkeana</i>	Non identifiée	Activités antiprolifératives sur la lignée d'adénocarcinome cervical humaine HeLa	(Pasquet, 2011)

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

Espèce	Biomolécule	Activité anticancéreuse contre	Source
Algue verte <i>Caulerpa cernosa</i> var. <i>cylindracea</i>	Extrait non identifié	Effets antiprolifératifs et apoptotiques sur les lignées de neuroblastome SH SY5Y et Kelly	(Pasquet, 2011)
Algue brune <i>Ecklonia cava</i>	Un hydrolat obtenu enzymatiquement	Activité antiproliférative sur : Des lignées murines de cancer du côlon CT-26, Sur la lignée de leucémie humaine THP-1 et U937	(Pasquet, 2011)
Algue rouge <i>Laurencia obtusa</i>	Perforenol B	Activité antiprolifératives sur différentes lignées cellulaires cancéreuses	(Pasquet, 2011)
Algue verte <i>Bryopsis</i> spp.	Kahalalide F	Antitumorales	(Pasquet, 2011)
Algue verte <i>Capsosiphon fulvescens</i>	Polysaccharide	Induit l'apoptose sur les cellules AGS de cancer gastrique	(Pasquet, 2011)
Algue rouge <i>Laurencia viridis</i>	Le triterpènesqualénoïde marin dehydrothysiferol	Activités cytotoxiques sur différentes lignées cellulaires cancéreuses (P-388, A549, MEL28 et HT29) et les lignées du cancer du sein	(Pasquet, 2011)

Algue rouge <i>Lophocladiasp</i>	La lophocladine B (alcaloïde)	Cytotoxique pour les lignées cellulaires cancéreuses du sein (MDA-MB-435) et du poumon (NCI-H460)	(Pasquet, 2011)
-------------------------------------	-------------------------------	---	-----------------

B. Antimicrobiens :

Ci-après un tableau résumant quelques biomolécules extraites d'algues marines et leurs activités antimicrobiennes :

Tableau VII : Quelques biomolécules extraites des algues et leurs activités antimicrobiennes

Espèce	Biomolécule	Application	La source
Algues rouges <i>Kappaphycus striatum</i> , <i>Chondrus crispus</i> , <i>Gigartin apistillata</i>	Les carraghénanes	Antivirales contre la grippe B, l'Herpès simplex, et le VIH	(Yasuhara-Bell et Lu, 2010)
Algues vertes <i>Caulerpara cemos</i> et <i>Ulva lactuca</i>	Non identifiée	Antibactérienne contre les bactéries Gram négatif <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> et <i>Enterobacter aerogenes</i> Et les bactéries Gram positif <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Bacillus cereus</i> et une activité antifongique.	(Chouikhi, 2013)

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

Espèce	Biomolécule	Application	La source
Algue rouge <i>Digenea simplex</i> appelée kainiso	Acide kainique	Antiparasitaire contre les ascaris	(Sylvain, 2018)
Algue verte <i>Anadyo menestellata</i> et <i>A. mellziesii</i>	Non identifiée	Antibactérienne	(Campello, 1991)
Algues brunes <i>Laminaria saccharina</i> et <i>Macrocystis integrifolia</i>	Acides gras insaturés	Antimicrobienne	(Campello, 1991)
Algue verte <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	Acides gras	Antibactérienne	(Campello, 1991)
Algue verte <i>Cauler paracemosa</i>	Chlorobisindole 458	Antifongique	(Blunt <i>et al.</i> , 2014)
Algue rouge <i>Falkenbergia folanosa</i>	Non identifiée	Antibactériennes et/ou Antifongiques	(Lloret, 2010)
Algues rouges <i>Asparagopsis istaxiformis</i> et <i>A. armata</i>	Non identifiée	Activité antiprotozoaire remarquable contre <i>Leishmania</i>	(Lloret, 2010)

Les algues rouges	La carragélose, un dérivé de la carraghénane	Antivirale contre les virus du rhume, pour améliorer l'état de la muqueuse nasale sèche et irritée	(Corbin, 2016)
-------------------	--	--	----------------

C. Anti-inflammatoire :

-Les phlorotannins individuels isolés des algues brunes *Ecklonia sp.* Et *Eisenia sp.* présentent une forte activité anti-inflammatoire par l'inhibition de : la production de NO induite par le LPS les niveaux de protéines iNOS et COX-2 ; la génération de ROS induite par la t-BHP dans les cellules de macrophages murins RAW 264.7 (Jung *et al.*, 2013).

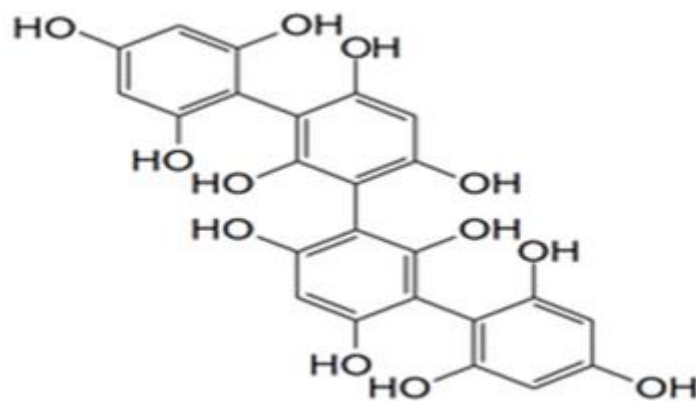


Figure 25 : Structure d'un polymère de phloroglucinol (Nakamura *et al.*, 1996)

- Le sargachromanol G extrait d'algue brune *Sargassum si liquastrum*, possède les propriétés anti inflammatoires (Yoon *et al.*, 2012).

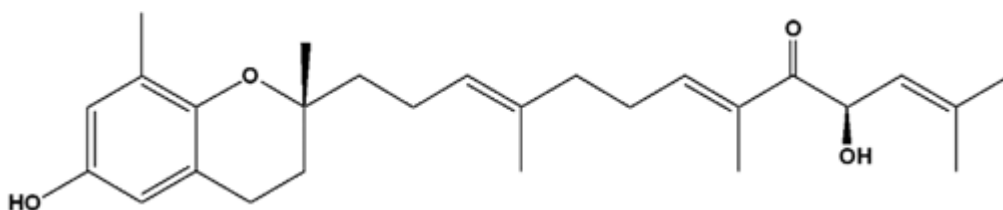


Figure 26 : Structure chimique du sargachromanol G (SG) (Yoon *et al.*, 2012)

-Les extraits d'algue rouge *Bryothamnion triquetrum* exercent des activités anti-inflammatoires (**Blunt et al., 2014**).

-La biomolécule (3-O-b-glucoopyranosyl clerostero 13-0-b-D-glucoopyranosy-lstigmasta-5,25-diene) extraite à partir d'algue verte *Ulva lactuca* possède une activité anti-inflammatoire (**Awad, 2000**).

D. Métabolites issus de quelques microalgues et cyanobactéries :

-La spiruline de la cyanobactérie *Arthrospira platensis* considérée comme un agent de digestibilité (**Guezennec et Debitus, 2005**).

- Les protéines, vitamines, et polysaccharides actifs de la microalgue *Chlorella* stimulent l'activité du système immunitaire, et possèdent des effets anti-tumoraux (**Liu et al., 2016**).

-L'adénosine du diatomée *Phaeodactylum tricornutum* est considéré comme un agent antiarythmique qui traite la tachycardie et la caulerpine (**Liu et al., 2016**).

-Les EPS de microalgue *Porphyridium cruentum* ont des activités antivirales, antibactériennes et antitumorales (**Liu et al., 2016**).

-Les EPS de microalgue rouge *Porphyridium sp* ont des propriétés Hypocholestérolémiques (**Liu et al., 2016**).

-Les EPS de la cyanobactérie *Anabaena spiroides* sont des anticoagulants, antibactériens et antioxydants (**Liu et al., 2016**).

-Les EPS de la dinoflagellée verte *Nostoc flagelliforme* sont responsables de l'activité antivirale, antibactérienne, et antioxydante (**Liu et al., 2016**).

-Les honaucines A-C 407-409 isolés de la cyanobactérie *Leptolyngbya crossbyana* présentent une activité anti-inflammatoire en inhibent la production et l'expression de NO de plusieurs cytokines pro-inflammatoires dans les cellules RAW264.7 (**Blunt et al., 2014**).

-Les dérivés polykétidiques insaturés la lactone extraits de la cyanobactérie *Oscillatoria sp* ont une activité antileishmanienne et une forte activité anti-inflammatoire (**Blunt et al., 2014**).

2.2. Métabolites issus des microorganismes associés aux algues :

D'autre part, les métabolites provenant de micro-organismes associés aux algues sont moins étudiés selon ce que nous avons trouvé dans la littérature par rapport aux éponges qui présentent un large éventail de molécules d'intérêt biotechnologique, quelques exemples sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau VIII : Quelques biomolécules extraites des micro-organismes associés aux algues et leurs activités biologiques

Espèce	Micro-organismes associés	Molécule	Application	La source
Algue rouge Porphyra yezoensis	Champignons <i>Cladosporium sp.</i>	Acide phénylacétique	Antimicrobien contre diverses bactéries et champignons	(Ding et al., 2008)
Algue rouge Porphyra yezoensis	Champignons <i>Cladosporium sp.</i>	Acide L- βphényllactique	Puissant fongicide	(Ding et al., 2008)
Algue verte Cauler pataxifolia	Actinomycetes	Alcaloïdes	Antibactérienn e contre les uropathogènes	(Rajivgandhie t al., 2018)
Algue rouge Laurencia	Champignons <i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicitides A et B	Activité cytotoxique modérée contre la lignée cellulaire du carcinome hépatique	(Kaaria, 2018)
Algue rouge Amphiroaanceps	Bactérie <i>Serratia sp</i>	Extrait non identifié	Propriétés antibactérienne s et antifongiques	(Kaaria, 2018)
Espèce	Micro-organismes associés	Molécule	Application	La source

Algue rouge <i>Asparago psisarmata</i>	Bactéries <i>Vibrio</i> et <i>staphylococcus</i>	Extrait non identifié	Activité antimicrobienne contre les bactéries Gram positive	(Horta <i>et al.</i> , 2019)
Les algues vertes, rouges et brune-doré	<i>Streptomyces Sp cyaneofuscatus M-27</i> et <i>S. carnosus M-40</i>	-Cosmomycin de <i>cyaneofuscatus M-27</i> -Lobophorin B de <i>S. carnosus M-40</i>	-Cosmomycin responsable de l'activité anti tumoral et anti bactérie gram positive -Lobophorin B responsable de l'activité anti-inflammatoire et anti tuberculosis	(Braña <i>et al.</i> , 2015)
Algue verte <i>Halimeda sp</i>	Bactérie <i>Pseudoalteromonas Sp</i>	Korormicin	Antibactérien contre les Gram négative	(Pal Singh <i>et al.</i> , 2014)
Algue verte <i>Halimeda copiosa</i>	<i>Aspergillus sp.</i> CNC139	Plinabuline	Anticancéreux	(Karouan <i>et al.</i> , 2019)

3. Coraux :

Les coraux font partie des invertébrés marins possédant la plus grande diversité de métabolites secondaires, qui sont pour la plupart produits par des bactéries symbiotiques. Les nombreux micro-organismes vivant en symbiose avec les coraux constituent un immense champ de possibilités pour la pharmacopée. Selon Gault (2009), le potentiel est "supérieur, en termes de chimie médicinale, à la forêt amazonienne".

Des molécules d'origine corallienne sont actuellement testées comme médicaments antiviraux pour le sida ou comme agents antibactériens. L'utilisation de ces composés bioactifs dans le domaine médicale est en accroissement selon le développement de la recherche en matière de biotechnologies marines (Lebane, 2015).

3.1 Métabolites actifs issus des coraux :

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

Les coraux sont considérés comme étant une ressource marine potentielle dans plusieurs domaines, les métabolites issus de ces derniers sont regroupés selon leurs activités biologiques dans les tableaux ci-dessous :

1. Anti inflammatoire :

Tableau IX : Quelques biomolécules extraites des coraux et leurs activités anti-inflammatoires

Espèce	Molécule	Intérêt	Références
<i>Pseudo pterogorgiae lisabethae</i> Corail mou	Méthoptérosine	Anti inflammatoire	(Mérour, 2004)
<i>Formosan S. gibberosa</i> Corail mou	Sterol de type Cholestanique	Induit une inhibition significative contre la régulation à la hausse des protéines pro-inflammatoires iNOS et COX-2 des cellules macrophages stimulées par le LPS.	(Ahmed et al., 2006).
	Sterol de type Gibbéroépoxysterol	Anti-inflammatoires Réduit les niveaux des protéines iNOS et COX-2	
<i>Lobophytum</i> Corail mou	Nouveaux Cembranolides	Anti-inflammatoires, inhibent l'expression des octocoraux iNOS et COX (Coelenterata), ils ont été reconnus comme une riche source d'hydroxystérols et de leurs analogues polyoxygénés.	(Cheng et al., 2009).
Espèce	Molécule	Intérêt	Références
<i>Sinulariaflexibilis</i>	Sinularine	Activité anti-inflammatoire, par	(Salvemini et al., 1996)

Corail mou		l'inhibition de manière significative la régulation à la hausse des protéines pro-inflammatoires, en particulier l'oxyde nitrique synthase (iNOS) et la cyclooxygénase-2 (COX-2) inductibles, dans les cellules de macrophages murins stimulées par les lipopolysaccharides (LPS).	
<i>Tubastraea faulkneri</i> Corail dur	Aplysinopsines	Potentiel d'influencer les activités de la monoaminoxydase (MAO) et de l'oxyde nitrique synthase (NOS). elles modulent aussi les récepteurs de la sérotonine	(Koh et Sweatman, 2010)

2. Anticancéreux :

Quelques exemples de biomolécules extraites des coraux ayant des activités anticancéreuses sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau X : Quelques biomolécules extraites des coraux et leurs activités anticancéreuses

Espèce	Biomolécule	Intérêt	Références
<i>Palythoa</i> Corail mou	Palytoxine	Anticancéreux, toxine sert à défendre le corail contre les prédateurs et tuer ses proies	(Valenti, 2010)
<i>Sinularia flexibilis</i> Corail mou	Sinularine	Activité anticancéreuse contre la lignée cellulaire humaine du carcinome épidermoïde (KB) et la lignée cellulaire murine P388 de la leucémie lymphocytaire (PS).	(Weinheimer et al., 1977).
<i>Lobophytum</i> Corail mou	Nouveaux Cembranolides	Activités cytotoxiques in vitro à l'égard de plusieurs lignées de cellules cancéreuses	(Cheng et al., 2009).

3. Antimicrobiens :

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

Quelques exemples de biomolécules extraites des coraux ayant des activités antimicrobiennes sont mentionnés dans le tableau ci-dessous :

Tableau XI : Les activités antimicrobiennes de quelques biomolécules extraites des coraux

Espèce	Biomolécule	Activité	Références
<i>Tubastraea faulkneri</i> Corail dur	Aplysinopsines halogénée	Antimicrobienne contre sept espèces de micro-organismes (<i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>V. harveyi</i> , <i>V. parahaemolyticus</i> , <i>Photobacterium damsela</i> , <i>Alteromonas rubra</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , et <i>Synechococcus sp</i>).	(Koh et Sweatman, 2010)
Type de corail anonyme	Composés alcaloïdes : 6-bromo-1',8-dihydroaplysinopsin	Antimicrobienne	(Pauletti et al., 2010)
	6-bromo-1'-hydroxy-1',8-dihydroaplysinopsin	Antimicrobienne	
	6-bromo-1'-ethoxy-1',8-dihydroxyaplysinopsin	Antimicrobienne	
	Dimer of 6-bromo-2'-de-N-méthylaplysinopsin	Antimicrobienne	

4. Les ascidies :

Les ascidies représentent les organismes les moins étudiés par rapport aux algues, éponges et coraux, néanmoins elles fournissent plusieurs molécules isolées, On retrouve dans leurs métabolites secondaires, beaucoup d'alcaloïdes possédant des activités antitumorales ou antivirales (les ascidies sont les seuls animaux chez qui on n'a pas retrouvé de tumeurs) (Clément, 2008).

4.1. Métabolites actifs issus des ascidies :

On trouve fréquemment une grande diversité d'alcaloïdes indoliques chez les invertébrés marins, ils ont été considérés comme des composés phares pour la découverte de nouveaux médicaments en chimie médicinale. L'activité biologique des alcaloïdes indole marins est clairement un produit de la fonctionnalité et des éléments uniques impliqués dans la biosynthèse des produits naturels marins.

Parmi les alcaloïdes indoliques halogénés marins des ascidies, on retrouve :

-Les méridianines : Ce sont des alcaloïdes marins qui ont été isolés de l'Ascidie *Aplidiummeridianum*, Sept méridianines A-G (4-10) ont été découvertes jusqu'à présent. Elles ont été décrites comme de puissants inhibiteurs de diverses protéines kinases, elles présentent une activité antitumorale. Les méridianines B et E sont les plus puissantes et, pour cette raison, la méridianine E a été sélectionnée pour des études de sélectivité supplémentaires sur 25 kinases hautement purifiées (**Pauletti et al., 2010**)

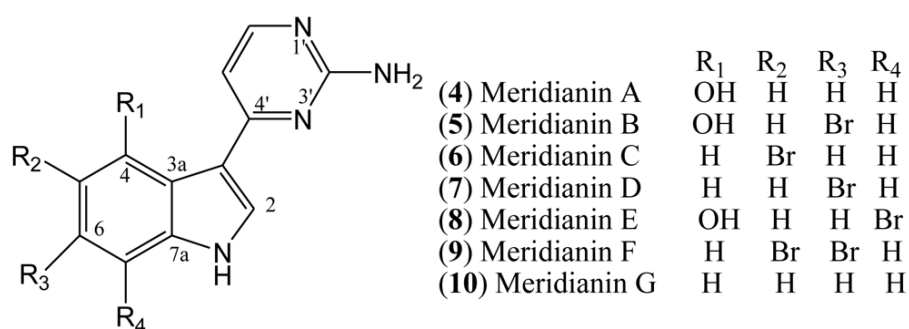


Figure 27 : Structure chimique des meridianines 4-10 (**Pauletti et al., 2010**)

-Aplicyanins : Une nouvelle famille d'alcaloïdes indole a récemment été isolée de l'ascidie *Aplidium cyaneum* par **Reyes et ses collègues (2010)**.

Les aplicyanines partagent une structure commune de 3-(pyrimid-4-yl) indole avec les méridianines A-G (4-10), Les aplicyanines sont cytotoxiques pour les lignées cellulaires tumorales humaines MDA-MB-231 (adénocarcinome du sein), A549 (carcinome du poumon) et HT-29 (carcinome colorectal). Elles présentent également une activité antimitotique. Enfin, étant donné la forte cytotoxicité typique des dérivés du bromoindole, la présence d'une

fraction bromoindole dans certaines aplicyanines justifie leur recherche en tant que médicaments anticancéreux.

Les six variantes d'aplicyanines isolées ont été évaluées pour leur cytotoxicité par rapport à un panel de trois lignées cellulaires tumorales humaines, le côlon (HT-29), le poumon (A-549) et le sein (MDA-MB-231). L'activité antimittotique de ces variants a également été évaluée. Une activité cytotoxique dans la gamme submicromolaire ainsi que des propriétés antimittotiques ont été trouvées pour l'aplicyanine B, D, et F, avec des valeurs de CI50 dans la gamme basse à sous- μM . En revanche, l'aplicyanine A et C se sont révélées inactives aux plus fortes concentrations testées, tandis que l'aplicyanine E présentait de faibles propriétés cytotoxiques. Ces résultats indiquent un rôle clé de la présence du groupe acétyle dans l'activité biologique de la famille des aplicyanines (**Pauletti *et al.*, 2010**).

Un résumé de ces activités biologiques des alcaloïdes : méridianines et aplicyanins est présenté dans le tableau ci-dessous :

Tableau XII : Résumé des activités biologiques des alcaloïdes : méridianines et aplicyanins

Composé		Activité biologique
Meridianins	Meridianin B Meridianin C Meridianin D Meridianin E	Inhibition des protéines kinases, Cytotoxicité
	Meridianin F	Inhibition des protéines kinases
Aplicyanin	Aplicyanin A	Non actif
	Aplicyanin B	Activité cytotoxique et antimittotique
	Aplicyanin C	Non actif
	Aplicyanin D	Activité cytotoxique et antimittotique
	Aplicyanin E	Activité cytotoxique
	Aplicyanin F	Activité cytotoxique et antimittotique

(Pauletti *et al.*, 2010)

-**Leptoclinidamines** : Trois nouveaux alcaloïdes indoliques, à savoir :

Les leptoclinidamines A-C ont été récemment isolés de l'ascidie australienne *Leptoclinides durus*, ces composés ont été testés pour leur bioactivité contre les souches sensibles et résistantes à la chloroquine du parasite du paludisme *Plasmodium falciparum*, pour leur activité trypanosomale contre *Trypanosoma brucei*, et pour leur cytotoxicité contre la lignée cellulaire cancéreuse HeLa et les cellules HEK 293 non cancéreuses (Pauletti *et al.*, 2010).

Les leptoclinidamine B isolées pour leurs activités cytotoxiques contre deux lignées de cellules cancéreuses humaines (Yamazaki *et al.*, 2012).

Les leptoclinidamines D-F isolés pour leurs activités cytotoxiques contre les lignées de cellules cancéreuses de la prostate et du sein (Pauletti *et al.*, 2010).

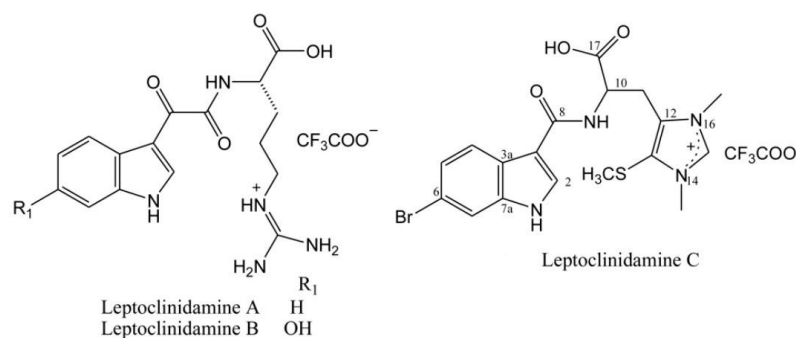


Figure 28 : Structures des leptoclinidamines A, B, C (Pauletti, 2010)

De nombreux peptides et biomolécules ont été isolés à partir d'ascidies avec des activités biologiques diverses : antimicrobiennes, cytotoxiques, antitumorales. Notamment les patellamides, l'eusynstylamide, les botryllamides A-D (1-4) ou encore :

Tableau XIII : Quelques peptides et biomolécules extraites des ascidies et leurs activités biologiques

Espèce	Biomolécule	Intérêt	Références
<p>Ascidie</p> <p><i>Styela clava</i></p>	La styéline D	<p>Peptide antimicrobien isolé des cellules sanguines de l'ascidie</p> <p>Peptide cytotoxique et hémolytique pour les cellules eucaryotes.</p>	(Beaumont et al., 2009)
<p>Ascidie</p> <p><i>Lissoclinuma plousobranch</i></p>	Les lissoclinamides (Lissoclinamides 4 et 5)	Peptide cyclique isolé de la rotule ascidienne, ont montré des propriétés antinéoplasiques pertinentes ainsi que d'autres propriétés pharmacologiques contre les lignées cellulaires de fibroblastes et de carcinomes de la vessie humains et les lymphocytes normaux.	
<p>Ascidie</p> <p><i>Lissoclinuma plousobranch</i></p>	Lissoclinamide 7	Le plus puissant parmi les peptides cités contenant deux cycles de thiazoline, qui rivalise avec la Didemnine B en matière de cytotoxicité in vitro.	
<p>Ascidie</p> <p>Anonyme</p>	Les mollamides	Peptides présentant une forte cytotoxicité, mais son mécanisme exact n'a pas été bien documenté.	
<p>Ascidie</p> <p><i>Cionain testinalis</i></p>	P. tunicata	<p>Composé antibactérien</p> <p>Protéine de masse moléculaire élevée (4190 kDa) constituée de 2 sous-unités avec un mode d'action qui n'a pas été étudié, mais les chercheurs ont proposé qu'elle ait des effets bactériostatiques.</p>	
<p>Ascidie</p> <p><i>Ecteinascidia</i></p>	Yondelis	Alcaloïde plus connue sous le nom de ET743 ayant obtenu le statut de médicament orphelin	(Guezennec et Debitus, 2005)

<i>turbinata</i>		pour le traitement de sarcomes	
Ascidie <i>Aplidium albicans</i>	Aplidine	Produit antitumoral (inhibiteur synthèse protéines) Large spectre tumeurs solides	(Guezennec et Debitus, 2005)
Ascidie <i>Lissoclinum bistratum</i>	Cyclozoline	Nouvel hexapeptide cyclique, cause une accumulation de cellules leucémiques et l'inhibition de la cytokinésie.	(Beaumont et al., 2009)
Ascidie didemne <i>Diplosoma virens</i>	Virénamides A,	Activités cytotoxiques : contre la lignée cellulaire P388(CI50 de 2,5 µg/mL) et contre les cellules A549 et HT29 (10 µg/mL).	(Beaumont, et al., 2009)
	Virénamides B et C	Activités cytotoxiques contre les cellules P388, A549 et HT29(CI50 de 2,5 µg/mL).	
Espèce	Biomolécule	Intérêt	Références
Ascidie <i>Stomoza murrayi</i>	l'indole-3-carbaldéhyde	Effets sur la division cellulaire, inhibe la réplication de l'ADN et de la synthèse des protéines.	(Moubax et al., 2009)
Ascidie <i>Leptoclinides durus</i>	Duramidines A-D, Leptoclinidines A et B, Durabetaines A et B, Les leptoclinidamines D-F	Alcaloïdes à activité antimicrobienne contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> . Activité cytotoxique contre les lignées de cellules cancéreuses de la prostate et du sein	(Pauletti et al., 2010)

4.2. Métabolites actifs issus des micro-organismes associés aux ascidies :

Les informations sur l'épibiose bactérienne des ascidies sont assez limitées. Il existe peu de métabolites actifs extraits à partir des micro-organismes associés aux ascidies, on cite : le 6-bromindole-3-carbaldéhyde qui est un métabolite secondaire produit par la bactérie

CHIMIODIVERSITÉ DE QUELQUES ORGANISMES MARINS D'INTÉRÊT

épibiotique : *Acinetobacter sp* associée a l'ascidie *Stomozoa murrayi*, présentant des propriétés antibactériennes modérées (Olguin-Uribeet *al.*,1997).

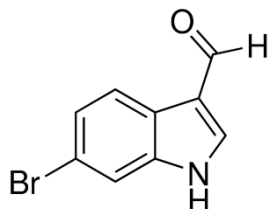


Figure 29 : Structure du métabolite 6-bromindole-3-carbaldéhyde
(Source : Base de données Bioorganic & medicinal chemistry, 2014)

Conclusion :

Cet aperçu des principales biomolécules extraites à partir des éponges marines, d'algues, de coraux et d'ascidies ainsi qu'à partir de leurs micro-organismes associés que nous avons fourni dans ce chapitre nous montre le potentiel énorme que nous réserve cette richesse marine.

L'investissement dans ce domaine peut ouvrir de nouvelles voies pour lutter contre diverses maladies. Notamment la résistance aux antibiotiques, qui est une nouvelle menace mondiale qui réduit les possibilités de prévention et de traitement des maladies infectieuses causées par des virus, des bactéries, des parasites.

Explorer ces nouvelles sources de molécules actives et trouver une alternative pour lutter contre ces maladies sera donc d'un intérêt humanitaire mondial.



CHAPITRE III

CHAPITRE III : LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Il existe un certain nombre d'approches pour l'extraction et la purification de nouvelles molécules actives à partir d'invertébrés marins et des microorganismes qu'ils contiennent. Comme nous n'avons pas pu parvenir à réaliser notre partie expérimentale à cause de l'évolution de la situation épidémiologique du Coronavirus COVID-19, nous avons donc établi, dans ce chapitre, une synthèse générale des travaux réalisés auparavant sur la mise en évidence des micro-organismes associés aux invertébrés marins décrits précédemment (principalement les éponges marines), et les méthodes de criblage des métabolites secondaires.

I. Principales méthodes de la mise en évidence des microorganismes associés aux espèces marines et de criblage de molécules d'intérêt :

I.1 Historique des travaux de recherche sur les invertébrés marins d'intérêt et leurs micro-organismes associés :

Les premiers travaux de recherche sur ce sujet datent des années 1950 avec la découverte de dérivés de nucléosides inhabituels dans l'éponge *Tethya crypta* par Bergmann et Feeney (**Bergmann et Feeney, 1950**). Cependant, l'utilisation des micro-organismes associés aux invertébrés marins comme sources de métabolites bioactifs a commencé sérieusement à la fin des années 1970. Avec des travaux basés essentiellement sur l'étude et la compréhension de ces associations, en utilisant à la fois des méthodes dépendantes et indépendantes de la culture microbienne :

I.1.1. Culture des microorganismes produisant des métabolites :

Peu d'articles étaient consacrés à l'étude chimique des bactéries associées aux invertébrés. Les études sur ces associations étaient difficiles car seule une petite fraction des espèces pouvait être réellement cultivée à partir d'échantillons naturels (**Amman et al., 1991; Schmidt et al., 1991**).

En effet, seule une petite fraction de la communauté microbienne totale associée aux éponges se prêtait à la culture sur des milieux de laboratoire (**Hentschel et al., 2003**). **Webster et Hill, (2001)** ont conclu que la communauté bactérienne hétérotrophe cultivable ne représentait que **0,1 à 0,23 %** de la communauté microbienne totale de *R. odorabile*. Ces chiffres se situent dans la même fourchette que les estimations de **Friedrich et al., (2001)** qui ont déterminé que **0,15 %** de la communauté microbienne totale de *A. aeropoba* était cultivable.

I.1.2 Améliorations de la culture des bactéries associées aux éponges :

Avec les difficultés rencontrées auparavant pour la culture bactérienne, le développement de nouveaux milieux et de nouvelles techniques de culture est devenue chose primordiale afin d'optimiser la croissance de certaines bactéries ou encore d'isoler des bactéries fastidieuses à cultiver.

Toutefois, la composition du milieu de culture gouverne la capacité et la quantité de métabolites secondaires produit par le micro-organisme en question. Pour cela divers auteurs ont récemment fait état d'une amélioration de la culture des bactéries associées aux éponges par :

- Utilisation d'un milieu de culture supplémenté avec des protéines de soja, et pour la même étude, des tissus animaux digérés par voie peptique, un extrait de levure comme source de carbone et d'azote basique et d'autres oligo-éléments comme le sodium, l'ammonium, le magnésium, le fer et le strontium ont été fournis pour la production microbienne comme dans l'eau de mer naturelle. Avec un pH de **7,5**, une salinité de **35 ppt** à **28° C/250 tr/min** pendant **9 jours** (**Gopi et al., 2016**).
- Procédure d'acclimatation : soumettre l'inoculum à une augmentation progressive de la température de **2°** par jour à partir de la température de l'eau de mer au moment de l'échantillonnage (**14°**) et jusqu'à **20° C**, ainsi qu'à une augmentation concomitante de la concentration en nutriments apportés au milieu. Cette technique a permis d'augmenter la culturabilité des micro-organismes associés à l'éponge *C. crambé*, 64 nouveaux isolats ont été obtenus dont deux nouvelles espèces mais la bêta-protéobactérie majoritaire de cette espèce n'a pas été isolée par cette procédure (**Croué, 2014**).

- Utilisation de différents milieux de culture sélectifs mimant la composition et les conditions *in vivo* retrouvées au sein du mésohyle de l'éponge (Croué, 2014).
- Modification de la communauté microbienne symbiotique par l'application d'un stress environnemental durant la culture *ex situ* de l'éponge, ce stress peut être une baisse du pH de l'eau environnante. L'auteur de cette expérience (Croué, 2014) a pu mettre en évidence, après culture *in situ*, une variabilité intraspécifique et intracoloniaire dans les proportions des alcaloïdes guanidiniques présents, cependant elle n'est pas liée au stress pH appliqué mais probablement due au stress lié aux conditions de vie *in situ*.

Cette difficulté à isoler les bactéries associées aux éponges est expliquée par plusieurs paramètres. En effet, selon Taylor *et al.*, (2007), nombreux de ces associés bactériens peuvent être des symbiotes obligatoires en raison de leur évolution avec l'éponge sur des centaines de millions d'années et seront ainsi difficiles à obtenir en culture pure, en raison de leurs dépendances nutritionnelles ou autres. En outre, il se peut que ceux qui peuvent être isolés ne produisent plus nécessairement le composé, car ils peuvent nécessiter des indices ou des intermédiaires métaboliques encore inconnus de l'éponge hôte. Il se peut aussi qu'un métabolite secondaire ayant une activité anti-inflammatoire soit présent pendant la culture (Croué, 2014).

I.1.3 Méthodes indépendantes de la culture :

I.1.3.1 Analyses microscopiques :

Les communautés microbiennes des éponges n'étaient identifiées dans les années 1970 que par microscopie électronique, qui a permis de révéler plusieurs types cellulaires notamment : les cyanobactéries, dans les tissus spongieux (Vacelet, 1971), et plus tard 4 à 5 différentes populations de cellules bactériennes encore plus denses dans les tissus mésohyles spongieux, représentant 38% de la biomasse d'une éponge Méditerranéenne *Verongia sp* (Vacelet et Donadey, 1977).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Par la suite, la microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée pour signaler la présence de cyanobactéries unicellulaires et de cyanobactéries filamenteuses non photosynthétiques dans les tissus de *Theonellaswinhoei* (Magnino *et al.*, 1999).

Dans la fin des années 1990 et le début des années 2000, des méthodes de génétique moléculaire ont été appliquées en addition à la culture microbienne et aux analyses microscopiques, afin d'identifier les bactéries associées aux éponges et d'analyser leur diversité, notamment :

I.1.3.2 L'hybridation de fluorescence *in situ* (FISH) :

Cette technique permet la détection et la visualisation des cellules procaryotes dans leur environnement naturel indépendamment de leur aptitude à la culture (Zwirgmaier, 2005) en utilisant des sondes oligonucléotidiques ciblant l'ARNr 16S. Ce qui a permis d'évaluer l'identité phylogénétique, la morphologie, le nombre et la disposition spatiale des microorganismes dans les tissus spongieux (Hugenholtz *et al.*, 2001).

La méthode FISH consiste à appliquer des sondes oligonucléotidiques à des cellules microbiennes entières, perméabilisées. Les sondes pénètrent dans les cellules et s'hybrident spécifiquement à leur séquence cible complémentaire dans les ribosomes. Si aucune séquence cible n'est présente dans les ribosomes des cellules, les sondes sont incapables de s'hybrider et la sonde non liée est éliminée par une étape de lavage ultérieure. Par conséquent, seules les cellules spécifiquement ciblées conservent les sondes dans des conditions de rigueur appropriées dans les étapes d'hybridation et de lavage. Les sondes sont généralement marquées à l'extrémité 5' avec par un colorant fluorochrome, comme la sulfoindocyanine rouge (Cy3) ou la fluorescéine verte (Cy5) et les cellules contenant des sondes hybridées peuvent être directement observées au microscope à épifluorescence grâce à l'amplification naturelle du signal fluorescent par un grand nombre de ribosomes dans une cellule cible donnée (Hugenholtz *et al.*, 2001).

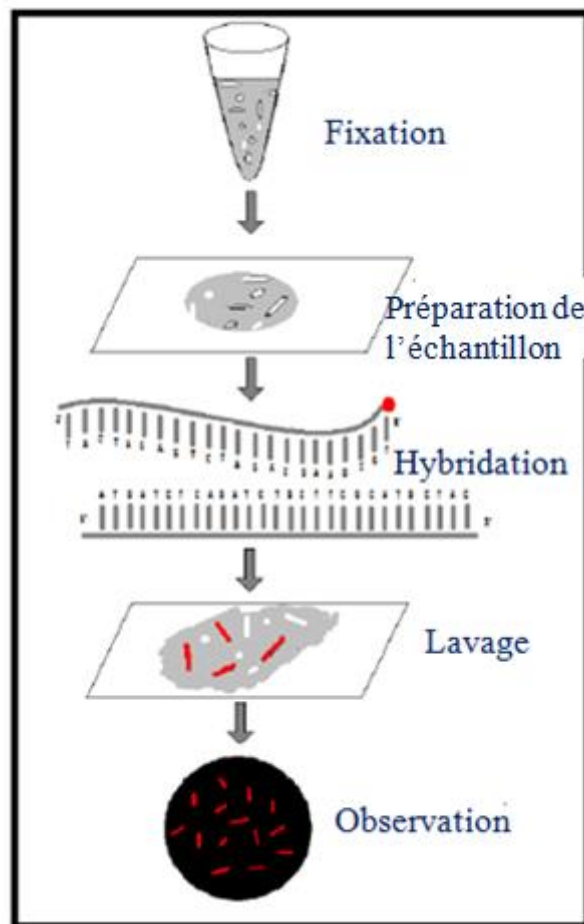


Figure 30 : Schéma explicatif du principe de la méthode d'hybridation par fluorescence *in situ*

(Source : Web)

Plusieurs études ont appliqué FISH pour étudier la diversité microbienne des éponges. Les premières étaient réalisées par **Schumann-Kindel et ses collaborateurs (1997)** sur des éponges méditerranéennes *Chondrosiarenia formis* et *Petrosiaficia formis* et ont révélé que la majorité des bactéries appartiennent aux Gamma protéobactéries. Les delta protéobactéries, plus précisément les bactéries réductrices de sulfate, étaient également dispersées dans les tissus des deux éponges (**Hentschel, 2003**). **Webster et al. (2001)** ont aussi indiqué par l'application de ces sondes que les gamma-protéobactéries étaient particulièrement dominantes autour des chambres des choanocytes des éponges. Cette technique a permis aussi d'identifier les cyanobactéries, les actinobactéries, les bactériodontes, les planctomycètes ainsi que les protéobactéries dans les éponges (**Dobson, 2015**).

I.1.3.3 La construction de bibliothèques d'ARNr 16S :

Des approches basées sur la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) impliquant l'amplification des molécules d'ARN ribosomique 16S dont leur produits sont clonés dans des vecteurs, tels que le vecteur pGEM -T -easy, et exprimés dans *E. coli*. Après la préparation du plasmide des clones individuels, les gènes de l'ARNr 16S sont réamplifiés et séquencés. Des arbres phylogénétiques sont construits par la suite à l'aide de plusieurs programmes informatiques (**Hentschel *et al.*, 2003**).

Le séquençage des bibliothèques de clones d'ARNr 16S a initialement conduit à l'identification des embranchement bactériens suivant : Acidobactéries, Chloroflexi, Actinobactéries, Protéobactéries (Alpha-, Gamma-, Delta-), Nitrospira, Cyanobactéries, Bactériodètes, Gemmatimonadetes ainsi qu'un nouveau phylum bactérien candidat, les Poribactéries (**Hentschel *et al.*, 2006**).

Par la suite, le séquençage des bandes d'électrophorèse sur gel à gradient de dénaturation (DGGE) dérivées d'éponges a ajouté les embranchements Aquificae, Dictyoglomi et Deferribacteres, et l'embranchement candidat TM7 à la liste des taxons trouvés en association avec les éponges (**Hardoimet *et al.*, 2009**).

I.1.3.4 Pyroséquençage :

Le pyroséquençage est une technique polyvalente qui permet de faire un screening rapide et fiable à haut débit et l'identification précise des micro-organismes et des mutations du génome microbien, et qui peut être utilisée pour étudier divers aspects des associations entre les bactéries et les éponges, y compris les structures des communautés bactériennes, les variations saisonnières de la composition des communautés, la transmission verticale des symbiotes, et les communautés bactériennes variables et spécifiques à une espèce d'une gamme d'espèces d'éponges (**Dobson, 2015**). De plus, la méthode a démontré la capacité de déterminer des structures secondaires difficiles et d'effectuer la détection de mutations (**Fakruddini *et al.*, 2012**).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Le pyroséquençage consiste à séquencer l'ADN en synthétisant le brin complémentaire une seule base à la fois, tout en déterminant le nucléotide spécifique incorporé pendant la réaction de synthèse. La réaction se produit sur une matrice d'ADN simple brin immobilisée où les quatre désoxyribonucléotides (dNTP) sont ajoutés séquentiellement et les dNTP non incorporés sont dégradés enzymatiquement par l'apyrase avant l'ajout du dNTP suivant à la réaction de synthèse. La détection de la base spécifique incorporée dans la matrice est contrôlée par la génération de signaux chimiluminescents suite à la conversion du pyrophosphate PPi (libéré lors de l'incorporation du nucléotide correspondant) en ATP sous l'action de l'ATP sulfurylase. L'ATP apporte l'énergie nécessaire à la réaction de conversion de la luciférine par la luciférase, ce qui produit des signaux chimiluminescents révélant le nucléotide incorporé et donc la séquence d'ADN de la matrice est déterminée (Cumings *et al.*, 2013).

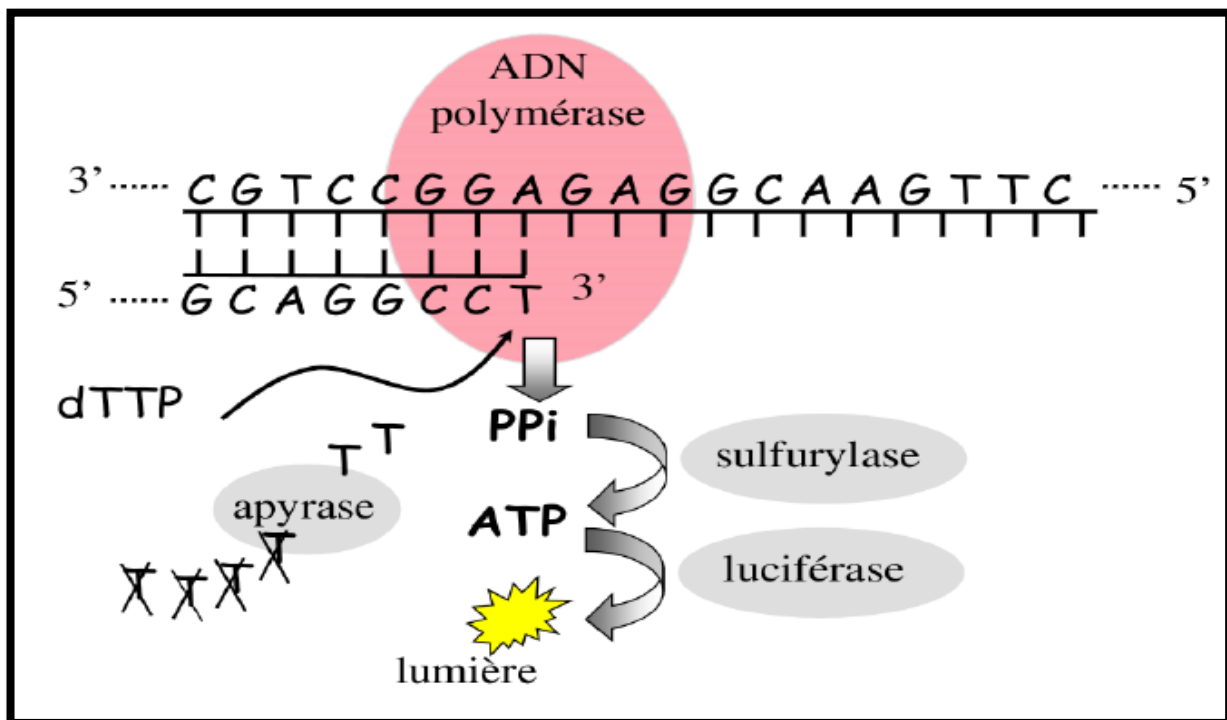


Figure 31 : Schéma explicatif du principe du pyroséquençage.

(Source : Web)

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Ces études de pyroséquençage ont (jusqu'à 2015) été portées sur 15 espèces d'éponges et ont permis d'identifier **35** groupes de bactéries ou groupes candidats qui ont été trouvés en étroite association avec des éponges. Les taxons identifiés dans les éponges pour la première fois par pyroséquençage comprennent BRC1, Chlamydiae, Fibrobacteres, Fusobacteria, Tenericutes et WS3, Chlorobi, Chrysiogenetes, OD1, Proteobacteria et Thermodesulfobacteria, OP10, OS-K et Thermotogae, Elusimicrobia, et Synergistetes (**Dobson, 2015**).

I.1.3.5 La métagénomique :

Depuis une vingtaine d'années, le domaine de la métagénomique s'est révélé être un moyen fructueux pour analyser des fragments du génome provenant d'une communauté microbienne complexe, et pour produire à grande échelle et de manière durable des métabolites bioactifs, y compris ceux produits par des micro-organismes non cultivables au laboratoire (**Taylor et al., 2007**). En outre, la métagénomique est particulièrement intéressante pour la découverte de produits naturels car l'information génétique codant les activités d'intérêt est généralement regroupée sur les génomes bactériens, ce qui permet de cloner une voie entière sur un individu (**Kennedy et al., 2010**).

La stratégie de base de la métagénomique fonctionnelle consiste à extraire l'ADN de l'ensemble de la communauté microbienne de l'échantillon (dans notre cas les invertébrés marins d'intérêt), et le clonage du pool résultant (appelé "métagénome") dans des vecteurs appropriés (BAC ou fosmides). Ces vecteurs sont ensuite propagés dans des souches hôtes de substitution, telles que *E. coli* ou des souches spécialisées de surexpression. Avec la génération de vastes bibliothèques composées de dizaines de milliers de clones. Une fois que les bibliothèques sont construites, elles peuvent être soumises à des protocoles de dépistage fonctionnels ou basés sur des homologues (**Hentschel et al., 2003**).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

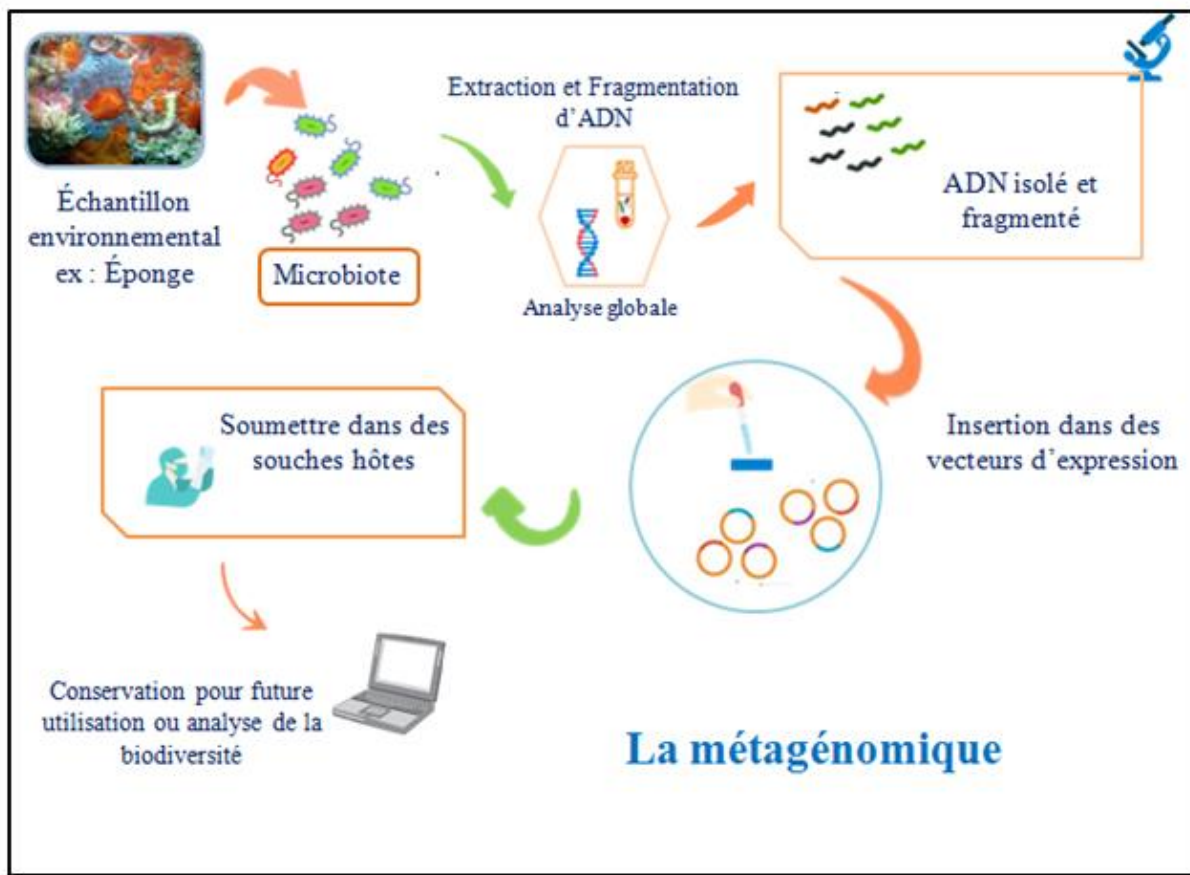


Figure 32 : Schéma récapitulatif des principales étapes de la métagénomique en illustrant l'exemple de l'extraction d'ADN à partir des micro-organismes associés aux éponges

(Apport personnel)

Cette méthode moléculaire est prometteuse pour l'expression hétérologue d'opérons codant pour des métabolites secondaires qui ont été traditionnellement difficiles à cloner en raison de leur grande taille. Selon **Taylor *et al.*, (2007)**, les études de la métagénomique des éponges, ont été principalement basées sur des séquences. Notamment les gènes de la polyketide synthase (PKS) et du peptide synthetase non ribosomale. Les PKS sont responsables de la synthèse des polycétides bactériens, un groupe diversifié de produits naturels importants sur le plan pharmacologique, qui comprennent les antibiotiques érythromycine et tétracycline ainsi que des agents antitumoraux, immunosuppresseurs et hypocholestérolémiants. Les PKS de type I sont organisés de manière modulaire, se prêtant à la biosynthèse combinatoire de nouveaux polyketides aux propriétés pharmaceutiques potentiellement utiles.

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Thurber *et al.* (2009), ont produit des métagénomés *spyrosé*quencés à partir des communautés d'holobionte d'une espèce de coraux qui a été exposée à quatre facteurs de stress (température, charge en nutriments, charge en COD et pH réduit). Cette étude a permis de conclure que la communauté microbienne des coraux stressés a présenté une augmentation des gènes associés à la virulence, à la résistance au stress, au métabolisme du soufre et de l'azote, à la motilité et à la chimiotaxie, à l'utilisation des acides gras et des lipides et au métabolisme secondaire.

I.1.3.6. Approche métabolomique :

Afin de mieux exploiter le potentiel biosynthétique des microorganismes et d'accéder à leurs voies biochimiques et mécanismes biologiques, les scientifiques ont eu recours à une nouvelle technique de pointe qui est la métabolomique. Apparue au début du troisième millénaire en complément de la génomique, la transcriptomique et la protéomique, la métabolomique est définie par certains auteurs comme l'analyse complète, qualitative et quantitative du plus grand nombre possible de métabolites d'un système biologique par des stratégies analytiques à haut débit (**Ernst *et al.*, 2014**).

L'ensemble des métabolites d'un système biologique est appelé "métabolome". Pour étudier le métabolome, deux principales stratégies peuvent être utilisées : l'analyse ciblée et le profilage métabolique :

- L'approche ciblée est limitée à l'analyse quantitative d'une classe de molécules caractéristiques d'une voie métabolique spécifique ou d'intersections entre différentes voies métaboliques ciblées avant l'analyse. Cette approche est très utile pour l'étude des effets primaires liés à une modification génétique, par exemple, et doit comprendre une étape d'identification et de quantification des métabolites dans l'échantillon (**Villas-Bôas *et al.*, 2005**).
- Le profilage métabolique, quant à lui, implique une analyse rapide, souvent non quantitative, d'un grand nombre de métabolites différents, avec pour but d'identifier un profil métabolique spécifique caractérisant un échantillon ou un organisme donné. Dans cette approche on distingue le fingerprinting, d'une part, et le footprinting, d'autre part :
 - a. L'empreinte métabolique de type fingerprint couvre la détection d'un grand nombre de métabolites intracellulaires par une technique analytique sélectionnée ou par une

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

combinaison de différentes techniques dans une situation définie. Elle nécessite des méthodes rapides d'arrêt de métabolisme (« quenching ») et une étape d'extraction et de séparation des métabolites d'intérêt de ceux du milieu de culture (**Villas-Bôas *et al.*, 2005**). Dans les études basées sur la spectrométrie de masse, les empreintes de métabolites sont décrites par des valeurs m/z et les intensités correspondantes des ions détectés. Si une étape de séparation est effectuée, les temps de rétention sont également utilisés pour indexer les métabolites. Ainsi, les valeurs m/z , les temps de rétention et les intensités représentent l'empreinte métabolique de l'échantillon analysé et sont exportées pour la classification de l'échantillon à l'aide d'une analyse de données multivariée (**Dettmer *et al.*, 2007**).

b. L'empreinte métabolique de type footprint se focalise sur le profil des métabolites extracellulaires présents dans un milieu de culture épuisé, c'est à dire les métabolites sécrétés par les cellules dans le milieu dans lequel elles se trouvent, et les composants du milieu transformés biochimiquement par l'organisme (**Villas-Bôas *et al.*, 2005**).

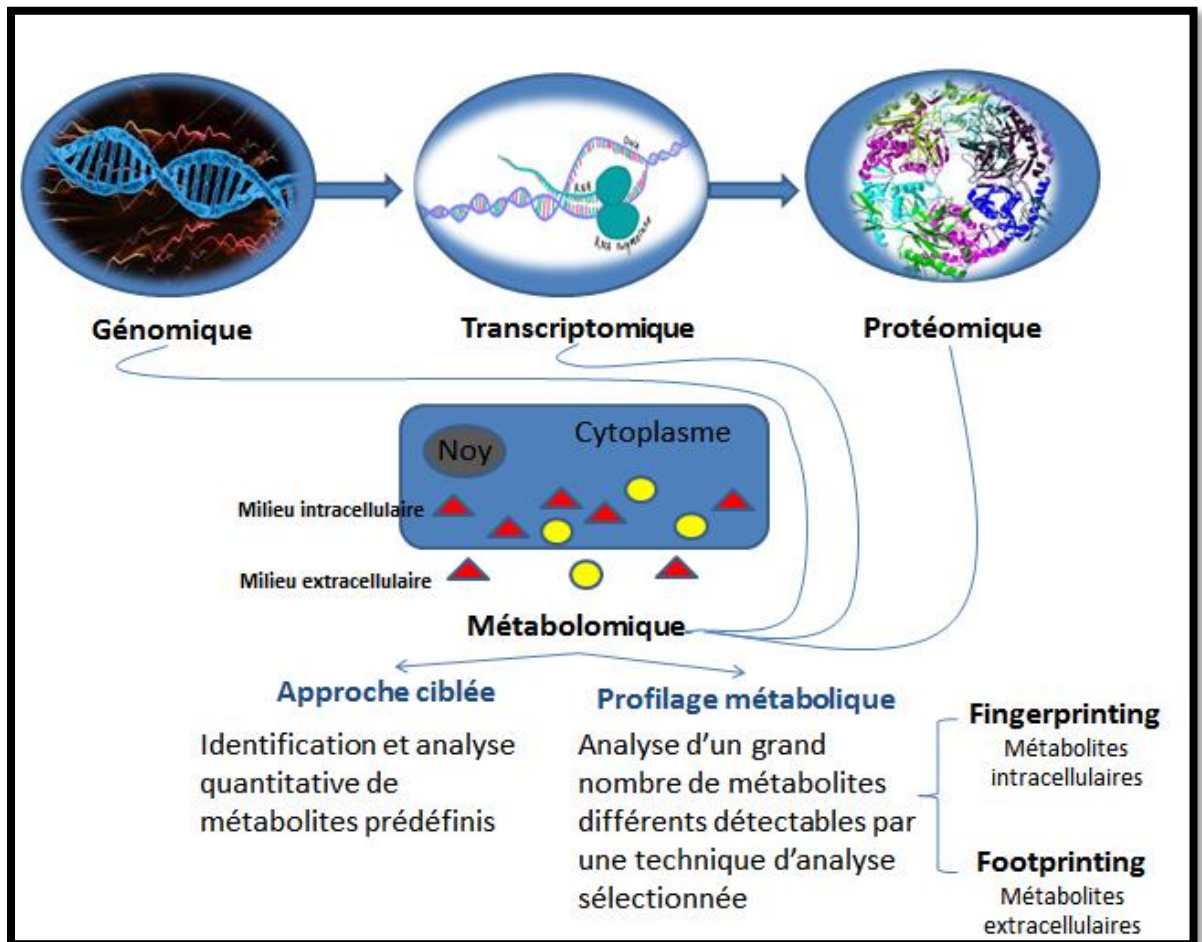


Figure 33 : Schéma récapitulatif de l'approche métabolomique et ses principales méthodes
(Apport personnel)

Les techniques analytiques pouvant être envisagées pour réaliser des études métabolomiques sont multiples. Il s'agit le plus souvent de techniques chromatographiques couplées aux techniques spectroscopiques (LC-MS et GC-MS) et de techniques de l'élucidation de la structure chimique des métabolites secondaires (RMN, FT-IR) (**figure 34**) qui seront abordées dans la partie II.

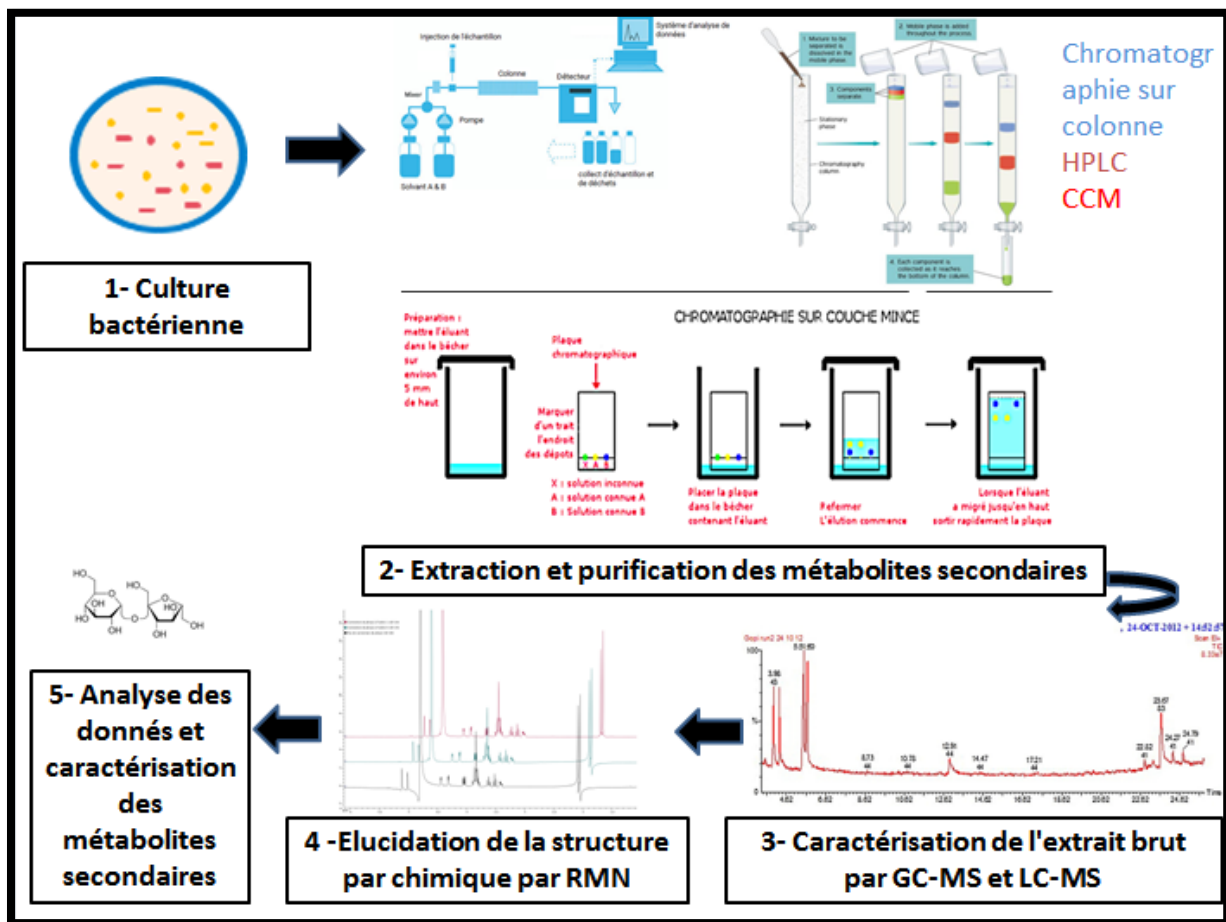


Figure 34 : Représentation des techniques analytiques pouvant être envisagées pour réaliser des études métabolomiques (**Apport personnel**)

II. Méthodes d'extraction et d'identification des métabolites secondaires à partir des micro-organismes associés aux éponges :

Après avoir consulté de nombreuses publications scientifiques sur les méthodes d'extraction et de purification des métabolites secondaires extraits à partir d'invertébrés marins nous avons établi un protocole expérimental selon les recherches les plus récentes sur ce sujet et qui ont permis d'obtenir de meilleurs résultats. Plusieurs étapes sont décrites :

1. Collecte et identification des invertébrés marins :

La classe d'éponges marines la plus abondante dans le littoral Algérien est la classe Demospongiae notamment l'ordre des *Dictyoceratida*, qui s'est révélé être le producteur

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

le plus prolifique de nouveaux composés parmi tous les ordres d'éponges étudiés selon **Mehbub et al., (2014)**. Des espèces de *Dictyoceratida* sont présentes dans le littoral de la wilaya d'Alger d'un ordre inférieur ou égal à **1000** espèces, et dans le littoral de la wilaya d'El Tarf d'un ordre inférieur ou égal à **100** espèces (**données fournies par la base de données European Marine Observation and Data Network EMOD net, 2020**).

Des espèces de coraux sont également réparties dans le centre et l'Est du littoral Algérien, on retrouve les ordres : *Alcyonacea*, *Caryophyllia*, *Caryophylliidae*, *Hexacorallia*, *Octocorallia*, *Scleractinia* d'un record allant de **10** jusqu'à **1000** espèces (**EMOD net, 2020**).

La collecte est effectuée par plongée sous-marine et méthodes de plongée sous-marine.

L'identification des espèces collectées est effectuée par des spécialistes dans ce domaine.

2. Séparation des cellules et localisation des métabolites :

Les approches susmentionnées (culture microbienne et métagénomique) peuvent, en principe, être entreprises sans que l'on sache au préalable le producteur principal des métabolites (l'invertébré marin ou ses microorganismes associés) (**Taylor et al., 2007**). Toutefois, il serait plus rationnel d'établir d'abord quel(s) type(s) de cellule est (sont) responsable(s) de la production de métabolites, car cela permet d'établir un protocole ciblé pour les efforts futurs et donc avoir de meilleurs résultats.

Pour identifier l'organisme producteur des métabolites, des techniques de séparation cellulaire et de localisation ont été entreprises par certains chercheurs :

La cytométrie en flux utilisée par **Unson et Faulkner (1993)** qui ont démontré pour la première fois que les métabolites secondaires attribués à une éponge sont localisés dans les cellules de symbiotes procaryotes. Ainsi que la centrifugation (**Faulkner et al., 1993**) et la centrifugation en gradient de densité (**Garson et al., 1998**).

Des récentes avancées, telles que la spectrométrie de masse MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) et la spectrométrie de masse d'ions secondaires (SIMS) permettent aussi de caractériser la distribution spatiale ainsi que l'abondance relative des produits naturels *in situ*, directement à la surface de fines sections de tissus et donc déterminer la localisation des métabolites secondaires au sein d'associations invertébré-microorganisme (**Simmons et al., 2007**). **Croué, (2014)**, a montré dans ces travaux de thèse l'efficacité de ces

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

techniques qui ont permis de visualiser et de caractériser un nouvel alcaloïde dans le tissu de l'éponge *C.crambe*, ce qui a été une étape nécessaire pour la poursuite de ses travaux. Cependant elle affirme que: « la difficulté principale à surmonter reste la préparation des échantillons, tant au niveau des techniques de coupes que d'inclusion, afin d'éviter la délocalisation des métabolites par entraînement mécanique ou diffusion ».

3. Isolement et purification des bactéries symbiotiques :

La première étape consiste à rincer l'échantillon d'éponge trois fois avec l'eau de mer stérilisée pour éliminer les débris et les bactéries non fixées, suivie d'un lavage rapide de la surface de l'éponge à l'éthanol **70%** puis l'immersion dans l'eau de mer stérilisée et en dernier son aspiration. Ensuite, 1g d'éponge est découpé avec un scalpel stérile et transféré directement dans un milieu de dissociation (**2,7% NaCl, 0,008 KCl, 0,01% Na_2SO_4 , pH8**) pendant **20** minutes. Une homogénéisation est effectuée après cette étape puis l'homogénat est réparti sur le milieu 2216 Zobell marine agar avec **50%** eau de mer en utilisant une série de dilutions successives de 10^{-5} (**Gopi et al., 2012**). Chaque dilution seraensemencée sur la gélose marine MA.

Après une incubation à **28°C** pendant **24** heures, une étude macroscopique des colonies sera réalisée en observant : la taille, la couleur, la forme et l'opacité, les colonies ayant le même aspect comme la pigmentation et la morphologie seront isolées (**Taourirt et Kemmad, 2019**). Les colonies isolées seront transplantées successivement sur un milieu solide pour obtenir des cultures pures et éliminer les agents pathogènes. Ces cultures pures doivent être conservées dans un bouillon marin à **-80°C** avec l'ajout de **30%** (v/v) de glycérol pour des études ultérieures (**Phan Thi Hoai Trinh et al., 2016**).

4. Screening préliminaire de l'activité antibactérienne des bactéries marines isolées par méthode de diffusion sur disque :

La méthode de diffusion sur disque est une technique qualitative qui consiste à déterminer la sensibilité des microorganismes à une substance antimicrobienne. Cette méthode est basée sur le pouvoir migratoire d'extraits bactériens à l'intérieur d'une boîte de Petri dans un milieu nutritif solide de Mueller Hinton (**Sahnoun et Chenine, 2017**).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Gopi et ses coéquipiers (2012), ont utilisé 5 bactéries pathogènes pour l'homme : *Escherichia coli* (*E.coli*), *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Salmonella typhi* (*S. typhi*), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) et *Streptococcus sp* qui ont été cultivées dans **50 ml** du bouillon nutritif à **37°** et maintenues dans la gélose nutritive inclinée à **4°**. La culture des souches bactériennes a été étalée sur un milieu Mueller Hinton agar (MHA). Des disques stériles ont été placés sur la gélose et ont été imprégnés par l'extrait bactérien isolé de l'éponge. L'antibiotique chloramphénicol a été utilisé comme contrôle positif pour déterminer la sensibilité des souches bactériennes. Après incubation pendant une nuit à **37°C**, l'activité antibactérienne a été évaluée par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour des disques. Cette méthode est la plus simple et la plus utilisée, **Cita et son équipe (2017)** l'ont aussi appliqué pour le criblage de l'activité antibactérienne des bactéries marines isolées de l'éponge *Xestospongia testudinaria*.

Les souches ayant une activité antibactérienne seront sélectionnées pour l'extraction de leurs métabolites secondaires afin de les purifier et de les identifier. Cependant, certains chercheurs comme **Gopi et al., (2012)** ; **Gopi et al., (2016)** ; **Cita et al., (2017)** et **Bibi et al., (2020)** ont poussé les recherches plus loin en identifiant par séquençage l'ARNr 16s de la souche bactérienne possédant la plus grande inhibition contre l'agent pathogène. De plus, **Gopi et al., (2016)** ont déterminé les caractéristiques physiologiques et biochimiques de la bactérie *Bacillus sp.* (SEB32) qui avait présenté une large gamme d'activités antibactériennes et a inhibé la croissance de tous les pathogènes de poissons testés et a montré une zone d'inhibition maximale par rapport aux autres.

5. Production extracellulaire et optimisation du système de solvant pour l'extraction des métabolites secondaires :

Après avoir identifié les bactéries produisant les métabolites secondaires et celles présentant une forte activité biologique, une culture de ces bactéries doit être réalisée afin de stimuler la synthèse extracellulaire des métabolites secondaires suivie d'une centrifugation et de l'extraction. **Gopi et al., (2016)** ont établi une culture de la souche bactérienne potentielle SEB32, préparée dans environ 50 ml de bouillon marin Zobell avec un pH de **7,5** et une salinité de **35 ppm** (parties par million) dans un agitateur (**30° C/150 tr/min**) pendant **18** heures. L'inoculum a été transféré dans 500 ml de bouillon marinZobell contenu dans un

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

flacon erlenmeyer de **1 l** et cultivé sous agitation (**250 tpm**) pendant **5-9** jours à **28 C**. Les cellules ont été séparées par centrifugation (**4° C/ 8671g**).

La méthode d'extraction souvent utilisée est l'extraction par solvant liquide-liquide après fermentation sur milieu liquide ou par filtration après fermentation sur milieu solide.

5.1. Après fermentation sur milieu liquide :

Le principe de cette extraction est de transférer une substance entre deux phases liquides non miscibles en fonction de sa solubilité dans le solvant.

Phan Trinh et al., (2016), ont réalisé la culture des bactéries actives d'intérêt dans **300 ml** de bouillon marin dans un erlenmeyer de **500 ml**. Le milieu a été incubé pendant **24 heures** sur un agitateur rotatif à **150 tours/minute**. Après l'incubation, le bouillon a été centrifugé à **8000** tours/minute pendant **20 minutes** pour éliminer les cellules. Le surnageant contenant les métabolites est recueilli et mélangé avec un solvant tel que l'acétate d'éthyle (EtOAc) dans une ampoule à décanter, les deux liquides sont séparés et les métabolites migrent vers le solvant organique qui est éliminé et évaporé pour obtenir l'extrait brut des métabolites. La même méthode a été adoptée par **Gopi et al., (2016)** sauf qu'il a utilisé divers systèmes de solvants comme le n-hexane, le dichlorométhane, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol et le DMSO afin d'optimiser le système du solvant.

5.2. Après fermentation sur milieu solide :

Les souches bactériennes actives ont été prélevées sur les cultures pures et ensemencées sur un milieu solide tel que le MA, la culture a ensuite été incubée dans une étuve à **25-30°C** pendant quelques jours selon la souche choisie. Après incubation, l'extraction est effectuée de la manière suivante : un volume de solvant éthanol à **90°** ou d'acétate d'éthyle est versé dans le milieu de culture (MA), ce mélange est laissé à température ambiante pendant environ 2 heures, puis le mélange est filtré avec un steriflip ou du papier Wattman, les extraits obtenus sont séchés et évaporés pour éliminer le solvant organique, puis les résidus secs sont conservés dans un endroit frais à **4°C** jusqu'à leur utilisation (**Rakotovao, 2015**).

6. Vérification de l'activité antibactérienne:

Pour vérifier la bioactivité des métabolites secondaires extraits **Gopi *et al.*, (2016)** ont opté pour la méthode de diffusion sur disque (**25 mg/disque**) en utilisant des disques antibiotiques standard (**30 mg**) de Ceftazidime (CAZ) et de Céfotaxime (CTX) contre les pathogènes des poissons dans les mêmes conditions que celles mentionnées ci-dessus.

7. Purification et criblage chimique des métabolites bruts :

Il existe plusieurs techniques de métabolomique séparative telles que la chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ou la chromatographie en phase gazeuse qui sont associées à des méthodes de détection telles que la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectrométrie de masse (MS) ou l'infrarouge.

Ces techniques peuvent être combinées pour obtenir des résultats qualitatifs et quantitatifs idéaux, comme la technique de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse à haute résolution, qui consiste à donner des paramètres physico-chimiques tels que la masse moléculaire exacte, le profil de fragmentation ou le spectre UV des composés détectés. Chaque composé a ses propres caractéristiques qui sont décrites dans des bases de données bioinformatiques, elles permettent donc son identification. Parmi celles-ci on cite : Dictionary of Natural Product, Chem Spider et Marin Lit (**Navarri, 2016**).

7.1. Séparation et purification des métabolites :

Après l'extraction des biomolécules à partir du surnageant de la culture de la souche étudiée en utilisant le solvant organique adéquat, la phase organique obtenue est concentrée puis soumise à plusieurs étapes chromatographiques :

7.1.1 Purification des métabolites bruts par chromatographie sur colonne :

La chromatographie sur colonne est une méthode de séparation des constituants d'un mélange par migration dans un dispositif à deux phases : la phase stationnaire : support solide, la phase mobile : le solvant.

- **La chromatographie sur colonne de gel de silice** : provoquée par l'écoulement continu d'un éluant passant dans la colonne par gravité ou sous l'effet d'une faible pression. Les composés sont entraînés par l'éluant à des vitesses différentes en fonction de leurs affinités avec la silice et avec l'éluant. Afin de séparer une aliquote de trois grammes d'extrait concentré de la bactérie potentielle SEB32, **Gopi et al., (2016)**, ont utilisé la chromatographie sur colonne de gel de silice. Le gel de silice activé (**230-400** mesh, MERCK) a été placé sur une colonne de verre (**450 mm 40 mm**) avec une hauteur maximale de **30 cm** en utilisant le méthanol et le solvant acétate d'éthyle (**30:70**), **3 g** d'extrait ont été chargés sur le dessus du gel de silice. Les fractions s'étaient éluées successivement avec **50 ml** de méthanol et d'acétate d'éthyle (**30 : 70**).
- **Chromatographie liquide à haute performance (HPLC)** :

C'est une technique de séparation analytique très précise, dont les performances en termes de sélectivité et de résolution, sont liées à l'utilisation de support de granulométrie très fine et de l'application d'une pression élevée. Elle se distingue des systèmes classiques par une augmentation de la vitesse d'échange entre phase solide et liquide.

Shaala et al., (2019), ont purifié l'extrait d'acétate d'éthyle du bouillon de fermentation de l'actinomycète: *Streptomyces sp* associée aux éponges par l'HPLC, la séparation était sur gel de silice et Sephadex LH-20 afin d'obtenir des fractions à analyser par la suite par les méthodes d'élucidation structurale.

Généralement, pour aboutir à des biomolécules pures, il est indispensable d'utiliser toutes ces différentes techniques chromatographiques. A chaque étape il faut tester l'activité biologique de la solution en question et également procéder à des tests chimiques par le biais de la chromatographie sur couche mince CCM.

7.1.2 Chromatographie sur couche mince (CCM) :

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode qui permet de vérifier la présence et l'état de pureté des produits élués. Elle repose principalement sur des phénomènes d'adsorptions, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants (choisis en fonction de la polarité des molécules contenues dans l'échantillon), qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après le dépôt de l'échantillon sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Lorsque les composants de l'échantillon à analyser sont colorés, leur séparation est relativement facile sur la plaque. Dans le cas contraire, nous devons rendre les tâches visibles par révélation (**Smaoui, 2010**).

Afin de vérifier la pureté des métabolites secondaires, **Gopi et al., (2016)**, ont utilisé la CCM, ils ont chargé une aliquote de fractions concentrées sur une plaque CCM de gel de silice. Ces plaques ont été soumises à un système de solvant à base d'hexane (chloroforme **(80:20)**, chloroforme : acétate d'éthyle **(90:10)**, méthanol : acétate d'éthyle **(30:70)** et acétate d'éthyle : méthanol **(90:10)**) pour la sélection du système de solvant approprié, ils ont choisi l'acétate d'éthyle qui convient au fractionnement ponctuel. Les fractions visibles ont été obtenus et les points ont été visualisés et localisés en soumettant les plaques à des fumées d'iode. Les fractions qui ont le même nombre de points que celui des valeurs de référence, sur la plaque CCM, ont été mises en commun et déterminées comme des composés similaires.

7.2 Caractérisation de la structure chimique des biomolécules :

Après la purification et l'obtention de molécules pures, la caractérisation et l'élucidation de la structure chimique sont réalisées par l'application de plusieurs techniques spectroscopiques telles que la spectroscopie de masse, la RMN et l'IR-FT. Ces techniques sont complémentaires et les résultats obtenus sont combinés pour une meilleure élucidation de la structure. La présentation de ces techniques ainsi que les résultats obtenus de quelques travaux antérieurs sont présentés dans ce qui suit :

7.2.1 Caractérisation de l'extrait brut par chromatographie en phase gazeuse et spectroscopie de masse (GC-MS) :

La GC-MS est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Cette méthode de séparation et de quantification des composés volatils nécessite une technologie à haut débit pour analyser un grand volume d'échantillon et identifier précisément les pics par le temps de rétention et le spectre de masse standard. Pour la séparation des composés sur la colonne GC, il est nécessaires d'activer une réaction de dérivation pour créer des composés volatils et les rendre aptes à l'analyse, les composés non volatils ne seront pas dérivés et détectés par GC-MS. Cette approche permet l'identification directe de plusieurs composés volatils tels que les acides organiques, les acides aminés, les sucres, les alcools de sucre, les acides gras, etc (**Zhang *et al.*, 2012**).

Après purification par CCM et chromatographie sur colonne, **Gopi et ses collaborateurs, (2016)** ont soumis l'extrait de méthanol des métabolites purifiés à la détection de molécules actives par GC-MS. L'extrait a été analysé à l'aide d'un appareil chromatographique équipé d'une colonne capillaire Elite-5 (5% Phenyl 95% dimethyl polysiloxane) (30 m 250 mm) et d'un détecteur de turbomasse. L'hélium était le gaz vecteur à un débit de 1 ml/min. L'injecteur fonctionnait à 290° C et la température du four était programmée comme suit : 70° C pendant 6 min, puis augmentée progressivement jusqu'à 280° C pendant 10 min. Les composants ont été identifiés en comparant leurs spectres de masse (**figure 30**) avec la bibliothèque du NIST 2005.

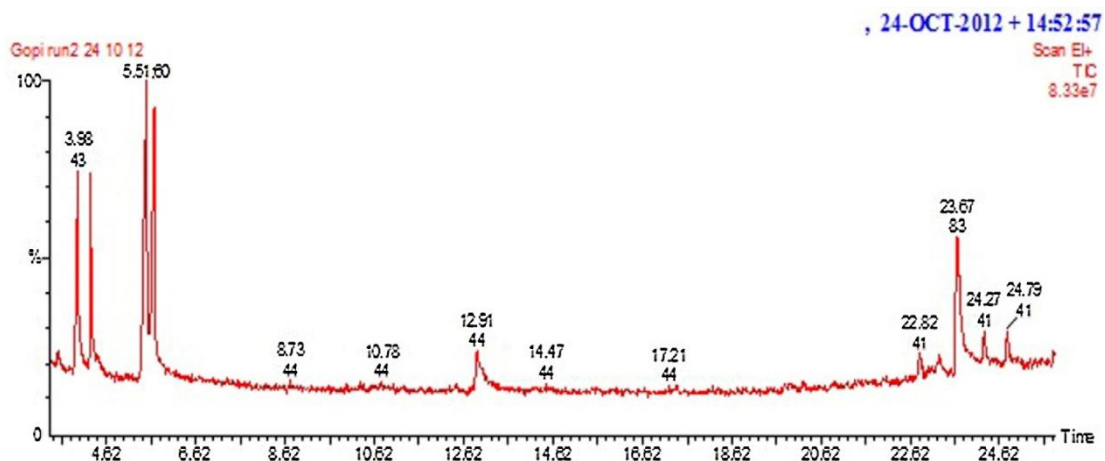


Figure 35 : Molécule partiellement purifiée analysée par chromatogramme en phase gazeuse - analyse du spectre de masse du SEB32. Chromatogramme (axe x = temps de rétention ; axe y = % intensité/ % abondance). La molécule potentielle de *Bacillus sp.* (CASMBLAK32) a été trouvée au Temps de rétention : **23,67**, Zone de pic : **4442024**, % surface maximale : **21.1465**, le nom de la molécule est Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- identifiée en utilisant la bibliothèque du NIST 2005 (Gopi *et al.*, 2016)

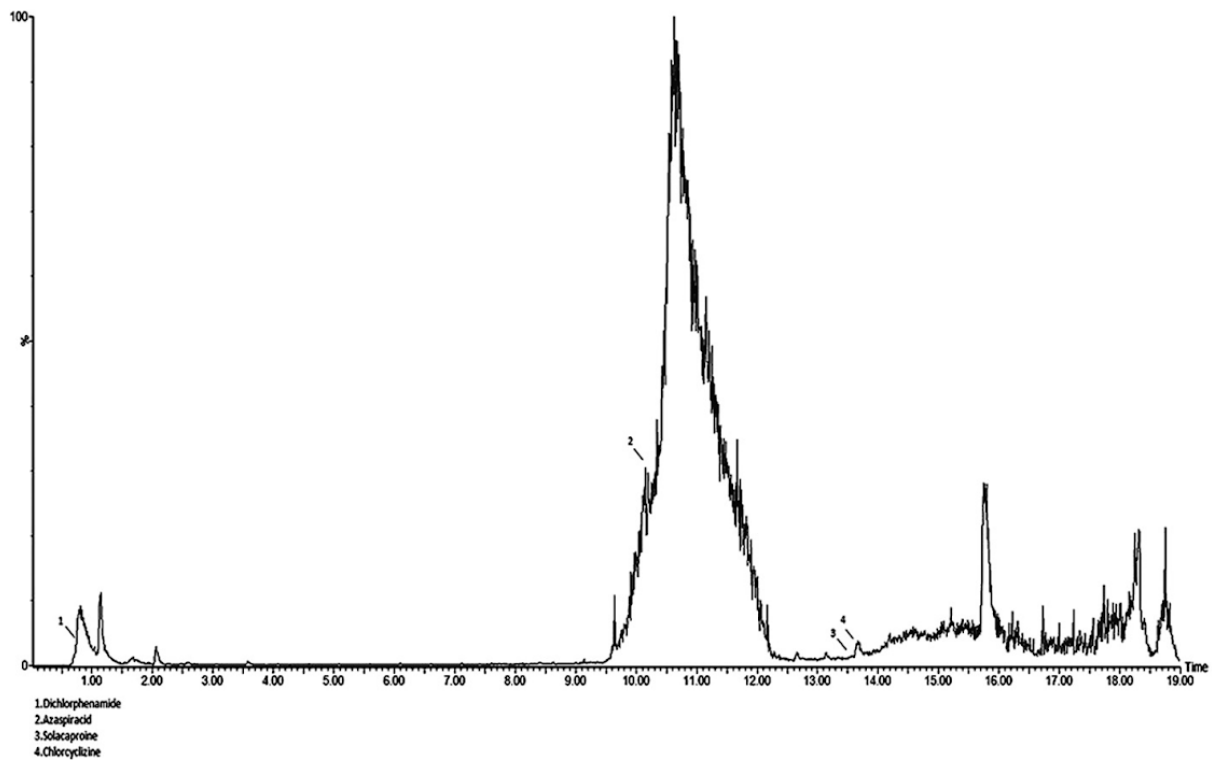
7.2.2 Caractérisation de l'extrait brut par chromatographie en phase liquide et spectroscopie de masse (LC-MS) :

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est une méthode d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase liquide et de la spectrométrie de masse afin d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances. Récemment, des techniques LC-MS ont été développées en appliquant une approche d'ionisation douce, pour rendre la MS plus résistante pour un usage quotidien. La LC-SM donne des informations sur les valeurs de masse/charge, les temps de rétention et d'autres paramètres (Zhang *et al.*, 2012).

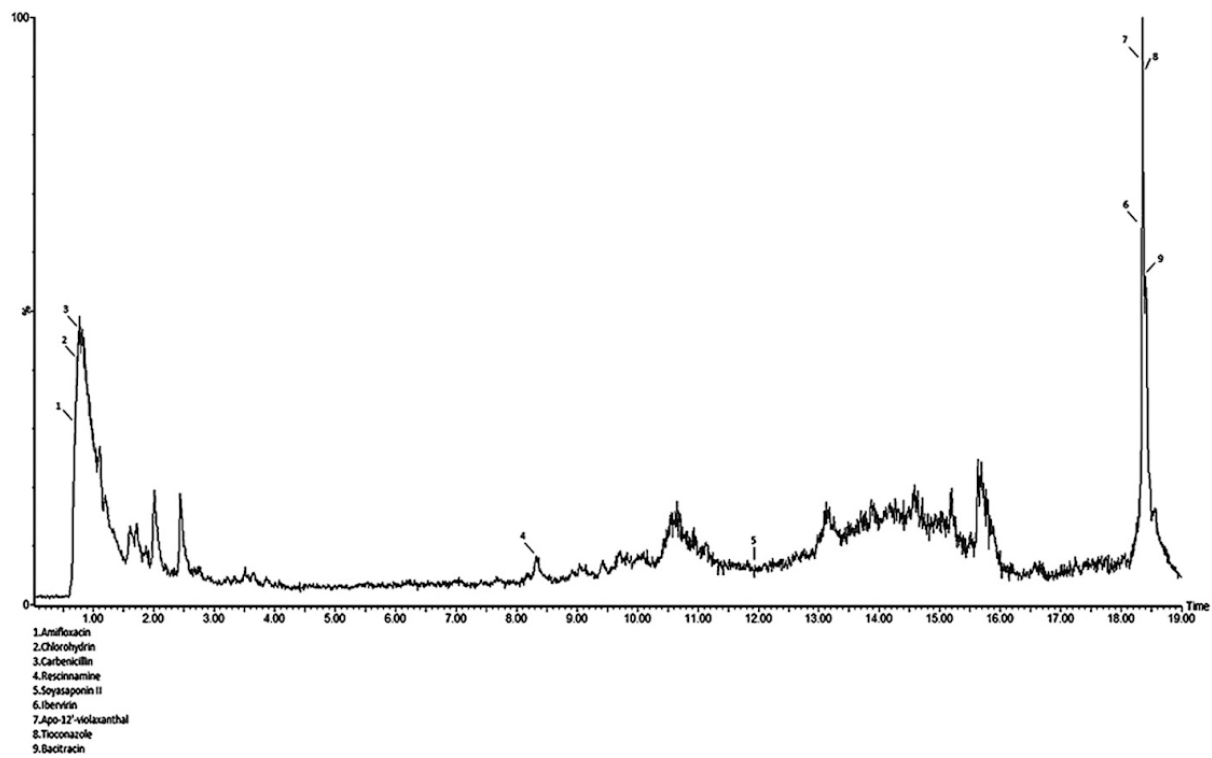
Bibi et son équipe, (2020), ont soumis le surnageant extrait de la souche *Vibrio sp* à une analyse LC-MS. Les échantillons ont été analysés sur le spectromètre de masse Agilent 6540B TOF/Q-TOF intégré à la source UPLC Agilent 1290 et à l'ESI Dual AJS dans les conditions décrites récemment. Les données brutes obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel d'analyse qualitative Agilent Mass Hunter B.06.00. Les métabolites ont été identifiés par une base de données interne (**figure 36**).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

(a)



(b)



LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Figure 36 : Métabolites secondaires bioactifs dans un extrait de culture de la souche *Vibriosp.* EA348 détecté par analyse LC/MS. (a) Analyse LC/MS en mode positif et (b) analyse LC/MS en mode négatif (**Bibi et al., 2020**)

7.2.3 Analyse spectrale FT-IR :

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) est utilisée pour déterminer les fonctions et les groupes chimiques présents dans une molécule (**Othmani, 2014**).

Gopi et al, (2016), ont analysé les molécules par spectroscopie infrarouge, 9 groupes fonctionnels ont été détectés sur la base de la littérature précédente et du protocole standard, ils ont été caractérisés comme suit : alcools, phénols, alcynes, acide.

7.2.4 Elucidation de la structure par RMN :

La RMN est une technique d'analyse spectroscopique et d'élucidation structurale, basée sur la propriété magnétique des noyaux qui ont un spin nucléaire non nul et la capacité de s'orienter spécifiquement dans un champ magnétique, elle permet de déterminer la séquence des atomes de carbone et d'hydrogène dans une molécule (**Othmani, 2014**). Son rôle est d'identifier et de quantifier un large éventail de composés organiques dans un extrait naturel brut de l'ordre du micromolaire sans qu'il soit nécessaire de procéder à une séparation chromatographique. La méthode est non sélective, elle peut détecter tous les composés de faible poids moléculaire et fournit des informations structurelles caractéristiques des composés (**Zhang et al., 2012**).

La combinaison de trois paramètres : le déplacement chimique (l'environnement chimique dans lequel se trouve l'échantillon), le couplage spin-spin (le nombre et la nature des noyaux voisins qui donne des informations sur la connectivité) et l'intensité du pic (concentration en protons) fournit des données structurelles importantes sur tous les composés, ainsi que la quantification des composés par l'intensité du signal protonique proportionnelle à celle des concentrations molaires. Toutes ces informations seront obtenues après la préparation des échantillons à l'aide de protocoles standard (**Wolfendera et al., 2014**).

LES MÉTHODES DE LA MISE EN ÉVIDENCE DES MICROORGANISMES ASSOCIÉS AUX ESPÈCES MARINES ET MÉTHODES DE CRIBLAGE DE MOLÉCULES D'INTÉRÊT

Gopi et al., (2016), ont conclu à partir des résultats de RMN UV, FT-IR, et de spectrométrie de masse que la molécule analysée était un pyrrol, sa structure a été identifiée comme étant la Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, les métabolites hexahydrate et la formule moléculaire de (C₇H₁₀N₂O₂). Le poids moléculaire des métabolites a été estimé à **154 g/mol**. De même que **Shaala et al., (2019)**, ont utilisé la RMN et la SM pour déterminer la structure de six composés (la dicétopipérazine, actinozine A, cyclo (2-OH-d-Pro-l-Leu), deux nouveaux nucléosides, l'acide thymidine-3-mercaptocarbamique et la thymidine-3-thioamine, ainsi que le cyclo(d-Pro-l-Phe) et le cyclo(l-Pro-l-Phe)) extraits d'actinomycètes et de *Streptomyces sp* associés à des éponges marines.

Conclusion :

La synthèse des différentes approches expérimentales qui ont été utilisées pour étudier les associations bactéries-invertébrés marins et les méthodes de l'extraction et de purification de leurs métabolites secondaires nous a permis de conclure que :

- Une grande diversité bactérienne a été constatée à la fois par culture et par analyses génétiques moléculaires.
- Des études de culture pure combinées à des analyses de génétique moléculaire sont les mieux adaptées pour identifier les bactéries spécifiquement associées aux éponges et pour précéder la détermination des fonctions possibles dans les associations bactéries-éponges. Ainsi que pour améliorer les conditions de culture.
- La construction de bibliothèques de métagénomique semble prometteuse car elle donne accès au potentiel génétique de microorganismes non cultivables.
- Des études à approches multiples et différentes plateformes d'analyses sont plutôt nécessaires pour accéder au métabolome des bactéries symbiotiques et pour caractériser les métabolites secondaires extraits.



CONCLUSION

Conclusion générale :

Ce travail nous a permis d'apprécier les niveaux exceptionnels de biodiversité dans les écosystèmes marins. En effet, les métabolites secondaires extraits à partir des micro-organismes associés aux éponges marines, aux coraux, aux ascidies et aux algues marines sont avérés être d'importantes sources de nouvelles biomolécules naturelles ayant un potentiel biomédical et biotechnologique remarquable, comme nous l'avons montré aux chapitre 1 et 2.

Les recherches ont démontré que les produits de plus de **90 %** des groupes de gènes de métabolites secondaires ne sont pas exprimés dans des conditions de croissance standard en laboratoire et/ou que leurs produits sont difficiles à identifier dans les métabolomes extraits. L'émergence de techniques indépendantes de la culture et de la métagénomique ont cependant permis de déterminer toute l'étendue de la diversité microbienne non cultivable et a permis l'accès aux voies biochimiques au sein de ces microorganismes non cultivables. Si les gènes de biosynthèse peuvent être identifiés, clonés et exprimés avec succès dans un autre micro-organisme (cultivable), comme *E. coli*, cela pourrait garantir un approvisionnement illimité d'un métabolite spécifique.

Par ailleurs, la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie gazeuse ou à la chromatographie liquide (respectivement GC-MS ou LC-MS), et la résonance magnétique nucléaire (RMN) se sont révélées les techniques les plus fiable afin d'identifier de nouveaux produits naturels issues des microorganismes associés aux invertébrés marins et aux algues marines au cours des dernières années. La métabolomique représente donc un outil puissant pour étudier la réponse aux stimuli chimiques et biologiques de la souche productrice de métabolites secondaires.

Cette étude nous a montré la nécessité d'investir dans ces technologies de pointe afin de mieux exploiter le potentiel énorme que nous réservent les milieux marins. Pour ces raisons, l'état Algérien devrait encourager la recherche scientifique dans ce domaine qui reste minime et mettre à la disposition des chercheurs les moyens matériels pour leur permettre de travailler dans de meilleures conditions et d'aboutir à des résultats probants

CONCLUSION

En derniers, nous soulignons qu'il est aussi primordial de développer des standards élevés de protection des écosystèmes marins incluant des mesures de protection des espèces en danger, la maintenance ou la restauration des populations endémiques à un niveau viable, la protection des habitats, des aires de reproduction et de la diversité biologique. Les interruptions de la symbiose dues au changements climatiques ou au stress environnemental auront une incidence sur la santé de ces organismes marins, leur taux de croissance et leur capacité à se défendre contre la prédation, et donc perte d'une grande richesse.

CONCLUSION



ABSTRACT

Abstract

The study of the biochemistry of marine organisms and the search for new natural bioactive substances of marine origin is a little explored field of research in Algeria. In fact, the biochemical and genetic diversity of the oceans is much greater than that of emerged areas. Biodiversity in general, refers to the variety of elements that make up life, it includes both the different species and forms of life (animal, plant, entomological and other) and their variability, i.e. their evolutionary dynamics in their ecosystems. This extensive diversification of living species is also the result of a very long evolutionary history, which is constrained by a whole complex of physico-chemical variables, biological relationships, genetic modifications, symbioses and adaptations that frame each organism.

Compared to terrestrial life, marine life has undergone a much more advanced evolution, which is explained by the appearance of life in the oceans nearly 3.8 billion years ago, whereas in continental life would be estimated at only **400** million years (**Le Gal, 2004**). This leaves us to say that the landscape of the planet's biodiversity was forged in the oceans, with only a few examples successfully making their way to the terrestrial universe and then diversifying.

Estimates of the total number of eukaryotic species range from 3.6 million to over 100 million species. These species are grouped in thirty-one phyla, twelve of which are exclusively marine (Molluscs, Echinoderms, Chordates, Arthropods, Cnidarians, etc.), compared to nineteen in the continental domain (of which only one is exclusively terrestrial in origin).

This strong biodiversity is accompanied by exceptional chemical diversity. During the last thirty years, numerous studies have been carried out on marine invertebrates (sponges, ascidians, bryozoans, cnidarians...), their associated microorganisms, as well as on marine algae, leading to the characterization of a large number of new natural products that can exceed fifteen thousand.

In fact, sessile marine invertebrates such as sponges, corals, gorgonians, sea squirts, as well as aquatic plants: algae, have developed chemical defense mechanisms to protect themselves

from predation, colonization, and competition for space, involving substances called "secondary metabolites" these latter are not essential to life, that is to say they are not directly involved in the growth, development or normal reproduction of organisms. Their particularity is their toxicity to predators and the unpleasant taste they give to certain predators, thus protecting the producing organism from predation. They attribute to the ocean a wealth of allelochemical substances of all kinds, from the simplest, such as hydrochloric acid or sulphuric acid, to the most complex, such as certain alkaloids, pseudopeptides or other macrolides (Pichon, 2016).

The chemical composition of seawater contributes to this chemodiversity. Indeed, marine organisms possess in addition to the basic elements (carbon, oxygen, hydrogen and nitrogen), other important elements (% > **10ppm**) such as chlorine, sulphur and bromine, but also slightly less abundant elements such as boron, silicon, iodine and arsenic which are mostly absent or rarely present in the metabolites of freshwater or terrestrial organisms (Pichon, 2016). This has aroused the interest of many research teams and major pharmaceutical groups around the world. In about 40 years, more than **18,000** new molecules isolated from the marine environment have been characterized.

Therefore, after much research and pre-acquisition, we have found that the most studied species and those that constitute the most important marine sources of specialized metabolites are: marine sponges in the first place, cnidarians including corals, marine algae, ascidians, as well as their associated microorganisms such as cyanobacteria, fungi and actinomycetes, which are increasingly studied (Corbin, 2016). For this reason, our choice of study was based on these four marine organisms for which we have done a detailed study of their biology, biodiversity and chemo-diversity in chapter 1.

In fact, some sponges and other marine organisms have the capacity to harbor in their tissues microorganisms that can represent up to 40% to 50% of their biomass. These respond to strategies of defense and protection against a hostile chemical or biological environment, competition for space or seduction for reproduction (Guezennec *et al.*, 2010), by producing unique secondary metabolites (Banaigs *and* Kornprobst, 2007) that constitute new molecular structures previously unknown in microorganisms of terrestrial origin, as affirmed by studies carried out at the Scripps Institution of Oceanography in the United States. Among

these secondary metabolites are: tannins, alkaloids, terpene peptides, sterols and polyphenols (Crue, 2016). Most of them have antimicrobial (antibacterial, antifungal, antiprotozoal), antitumor and/or antiviral activities summarized in chapter 2.

In chapter 3 we have established a general synthesis of the work previously carried out on the identification of microorganisms associated with the marine invertebrates described above (mainly marine sponges), and the screening methods for secondary metabolites.

The first research work on this subject dates back to the 1950s with the discovery of unusual nucleoside derivatives in the Tethyacrypta sponge by Bergmann and Feeney. However, the use of microorganisms associated with marine invertebrates as sources of bioactive metabolites began in earnest in the late 1970s. With work based essentially on the study and understanding of these associations, using both culture-dependent and culture-independent methods:

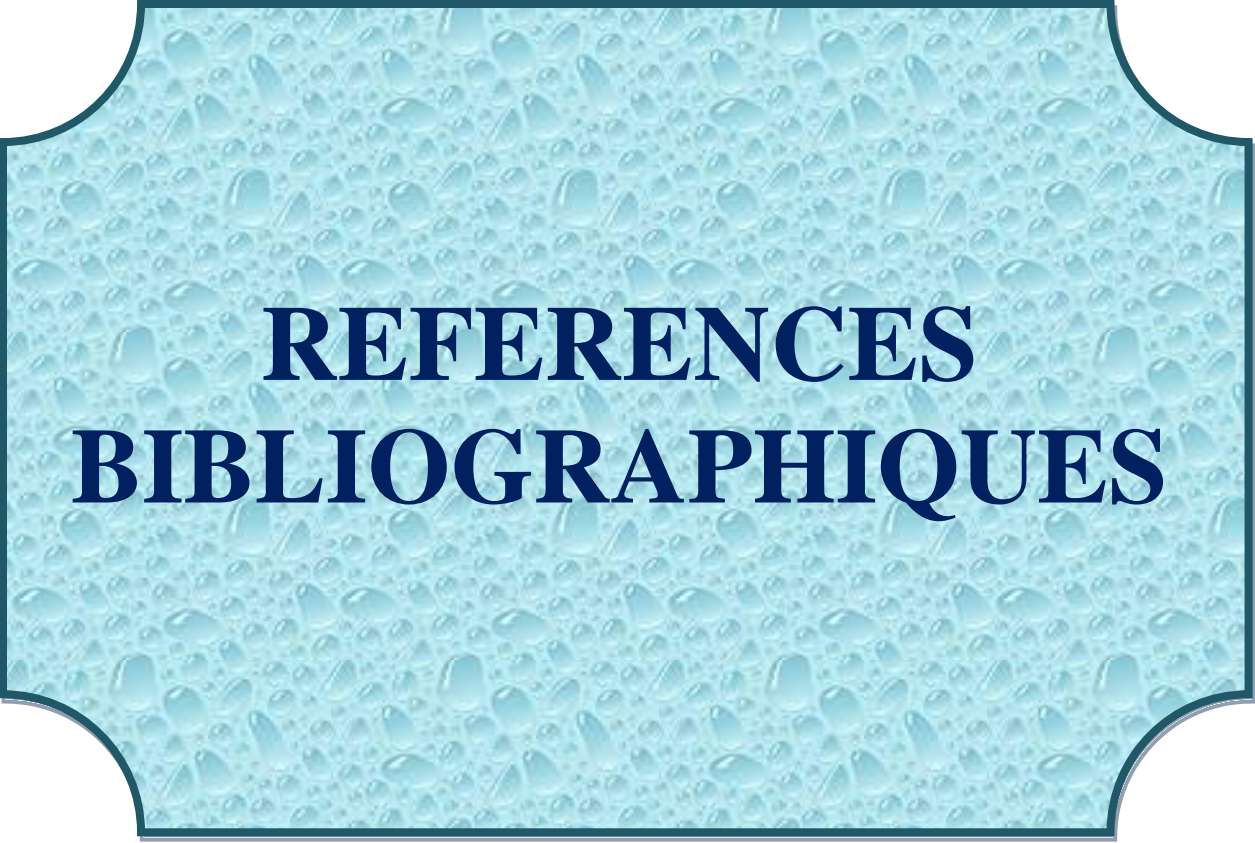
Few articles were devoted to the chemical study of bacteria associated with invertebrates. Studies on these associations were difficult because only a small fraction of the species could actually be cultured from natural samples. Hence the need to combine them with other approaches such as : microscopic analyses, fluorescence in situ hybridization (FISH), sequencing of 16S rRNA clone libraries, pyrosequencing, metagenomics to analyze genome fragments from a complex microbial community, and to produce bioactive metabolites on a large scale and in a sustainable way, as well as the metabolomic approach for the complete, qualitative and quantitative analysis of as many metabolites of a biological system as possible, using high-throughput analytical strategies such as spectroscopic chromatographic techniques (GC-MS, LC-MS) and techniques for the elucidation of the chemical structure of metabolites (NMR, FT-IR).

For a conclusion, the emergence of techniques independent of culture and metagenomics have, however, made it possible to determine the full extent of non-culturable microbial diversity and has allowed access to biochemical pathways within these non-culturable microorganisms. If biosynthetic genes can be identified, cloned and successfully expressed in another (culturable) microorganism, such as *E. coli*, this could guarantee an unlimited supply of a specific metabolite.

In addition, mass spectrometry coupled with gas chromatography or liquid chromatography (GC-MS or LC-MS respectively), and nuclear magnetic resonance (NMR) have proven to be

the most reliable techniques to identify new natural products from microorganisms associated with marine invertebrates and seaweed in recent years. Metabolomics therefore represents a powerful tool for studying the response to chemical and biological stimuli of the secondary metabolite producing strain.

This study has shown us the need to invest in these cutting-edge technologies in order to better exploit the enormous potential of the marine environment. For these reasons, the Algerian state should encourage scientific research in this field which remains minimal and make available to researchers the material means to enable them to work in better conditions and achieve convincing results.



**REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

Références Bibliographiques:

A

Abad, M.; Bedoya, L.; Bermejo, P.(2011).Marine compounds and their antimicrobial activities. In Science Against Microbial Pathogens : Communicating Current Research and Technological Advances; Formatex Research Center: Badajoz, Spain, 1293-1306.

Abdelmohsen U. R., Balasubramanian S., Oelschlaeger T. A. Grkovic T., Pham N. B., Quinn R. J., Hentschel U. (2017). Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2): 30–41.

Abdul Hannan Md , Abdullah Al Mamun Sohag , Raju Dash , Nazmul Haque Md. , Mohibbullah Md., Oktaviani DF, Tahmeed Hossain Md.,Ho Jin Choi , Il Soo Moon .(2020).Phytosterols of marine algae: insights into the potential health benefits and molecular pharmacology, *Phytomedicine*.Phytomedicine 69, 153201.p(19).

Aliouat, C.M. (2008-2009). Cours de biologie animale de Première année de pharmacie.

Ammann R, Springer N, Ludwig W, Goërtz HD, Schleifer KH .(1991).Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* 351:161–164

Anjum K., Abbas S. Q., Shah S. A. A., Akhter N., Batool S., Ul Hassan S. S. (2016). Marine sponges as a drug treasure. *Biomolecules & therapeutics*, 24: 347–362.

Araki, T.; Matsunaga, S.; Nakao, Y.; Furihata, K.; West, L.; Faulkner, D.J.; Fusetani, N. (2008).Koshikamide B, a cytotoxic peptide lactone from a marine sponge *Theonella* sp. *J. Org. Chem.*, 73, 7889–7894.

Awad N E,(2000).Biologically active steroid from the green alga *Ulva lactuca*.*Phytother Res*;14(8):641-3.

B

Bagnères A-G, Hossaert-Mckey M.,. (2017). *Ecologie chimique*.Ed : Hermes Science Publishing Ltd.(240).

Baker, P.W. Kennedy J, Dobson A.D.W., Marchesi J.R. (2008).Phylogenetic diversity and antimicrobial activities of fungi associated with *Haliclona simulans* isolated from Irish Coastal Waters, *Mar. Biotechnol.* 11, 540–547.

Beaumont A., Cassier P. (2009).*Biologie animale : Des Protozoaires aux Métazoaires épithélienneuriens*. Ed : Dunod (3eme).Tome 1 : (470).

Banaigs B et Kornprobst J-M. (2007).La biodiversité marine et le médicament : espoirs, réalités et contraintes ; l'actualité chimique .*Journal de la société chimique de France*.7-13 .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bergmann, W.; Feeney, R.J.(1951).Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges I. J. Org. Chem. 16, 981–987.

Bergmann, W.; Feeney, R.J.(1950). The isolation of a new thymine pentoside from sponges 1. J. Am. Chem. Soc. 72, 2809–2810.

Bewley, C.A., Holland, N.D. & Faulkner, D.J.(1996).Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* 52, 716–722 .<https://doi.org/10.1007/BF01925581>

Bhowmick S, Mazumdar A, Moulick A, Vojtech A.,(2019).Algal metabolites: An inevitable substitute for antibiotics. *Biotechnology Advances*.p04 (55).

Bibi F ;Yasir M; Al-Sofyani ^A; ImranNaseer ^M; Azhar E I.,(2020).Antimicrobial activity of bacteria from marine sponge *Suberea mollis* and bioactive metabolites of *Vibrio* sp. EA348.Saudi Journal of BiologicalSciencesVolume 27, Issue 4, Pages 1139-1147.

Blunt J.W., Brent R. Copp,Robert A. Keyzers,Murray H. G. Munro, and Michele R. Prinsep et Michel R. Prinsep.,(2014).Marine naturalproducts.Previousreview: Nat. Prod. Rep.,30, 237–323.

Blunt, J.W.; Copp, B.R.; Keyzers, R.A.; Munro, M.H.G.; Prinsep, M.R.(2012). Marine natural products. Nat. Prod. Rep., 29.

Boeuf G et Kornprobst J-M,(2016). Marine biodiversity and chemodiversity.

Bonnefis J, Pathe M.,(2019).Guide de découverte de la vie sous-marine à faible profondeur, Le monde sous-marin du plongeur biologiste en Méditerranée.Ed :Gap 2eme.(336).

Borchiellini, C., Manuel, M., Alivon, E., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., & Le Parco, Y. (2001). Sponge paraphyly and the origin of Metazoa J. Evolutionary biology.Vol 14, Issue1. P 171-179.

Boudouresque C.F.(1995). "Impact de l'homme et conservation du milieu marin en Méditerranée". Cours DEUG B2 (module "Sciences et techniques de l'environnement") de l'Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), Faculté des Sciences de Luminy.

Bougaran G ; Saint-Jean Bruno., (2014).Microalgues : de petits végétaux aux grandes promesses.Biofutur (0294-3506) (Elsevier France-editions Scientifiques Médicales Elsevier) , N. 360 , P. 28-31.

BOUGIVAL.(2014).Les Coraux, Embranchement des Cnidaires Cristal Ammonite, Club de minéralogie et de paléontologie., Bourse des minéraux et fossiles, vol 6.(78)

Bovio E.(2019). Marine fungi from sponges: biodiversity, chemodiversity and biotechnological applications. Other. Université Côte d'Azur; Universitàdeglistudi (Turin, Italie).(278).

Boyen C, Pascal Jaouen. (2015).Les Biotechnologies Marines dans le Grand Ouest. (61).

Braña A F ; Fiedler H-P; Nava H; González V; Sarmiento-Vizcaíno A; Axayacatl Molina ;José L. Acuña;Luis A. García;Gloria Blanco.,(2015).Two *Streptomyces* Species Producing

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Antibiotic, Antitumor, and Anti-Inflammatory Compounds Are Widespread Among Intertidal Macroalgae and Deep-Sea Coral Reef Invertebrates from the Central Cantabrian Sea. *Microb Ecol* 69:512–524.

Bringmann, G.; Lang, G.; Muhlbacher, J.; Schaumann, K.; Steffens, S.; Rytik, P.G.; Hentschel, U.; Morschhauser, J.; Müller, W.E.G. (2003). Sorbicillactone A: A structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 37, 231–253.

Brown B. E ; Bythell J. C. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar Ecol Prog Ser.* School of Biology, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 7RU, Vol. 296: 291–309.

Burlot A S., (2016). Valorisation des métabolites d'algues proliférantes par voie enzymatique : applications dans les domaines de la nutrition et santé animale, végétale et humaine, de la cosmétique et de l'environnement. *Biotechnologies.* these de doctorat. Université de Bretagne Sud. P(465).

Butterfield N J., (2000). *Bangiomorpha pubescens* n. gen., n. sp.: implications for the evolution of sex, multicellularity, and the Mesoproterozoic/Neoproterozoic radiation of eukaryotes », *Paleobiology.* 26 (3):386-404.

C

Cadoret J.-P et Bernard O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues : promesses et défis. *Journal de la Société de Biologie*, 202 (3), 201-211.

Calon T, Sandra Sinno-Tellier, Luc de Har, Bloch J. (2019). Palytoxin exposure induced by soft corals in aquariums: cases report of French poison centers network from 2000 to 2017. *Toxicologie Analytique et Clinique* . Vol 31, Issue 1, Pages 64-76.

Campello F, (1991) .Substances et rôle antibactérien de la phycosphère marine . Approche bibliographique. IFREMER - Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer. (16) .

Carroll AR ; Avery V M., (2009). Leptoclinidamines A-C, indole alkaloids from the Australian ascidian *Leptoclinides durus*. *Journal of Natural Products* , 72(4):696-699.

Cerrano C. , B. Calcinai, E. Cucchiari, C. Di Camillo, M. Nigro, F. Regoli, A. Sarà, S. Schiaparelli, C. Totti, G. Bavestrello. (2004). 'Are diatoms a food source for Antarctic sponges?' *Chem, Ecol.* 20(3), 57–64

Chatter rahi R, tarhouni S ; Kharrat R. (2011). Criblage de l'effet anti-inflammatoire et analgésique des algues marines de la mer méditerranéenne. *Unité de toxines alimentaires*, Inst. Pasteur tunis. 88-2011 (1-4), pp.19-28.

Chbani A; Mawlawi H ; Etahiri S. (2011). Activité antibactérienne des extraits d'une algue brune *Padinapavonica* de la côte méditerranéenne au Liban. *Phytothérapie* 9, 283–286.

Cheikh Abdellahi I, Mahfoudh O Taleb Sidi et hametdiawdiadhieu. (2014). Evaluation de l'état de la biodiversité marine dans la région du CCLME. *Canary Current Large Marine Ecosystem Project.* (147).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Chia-Wei Li, Jun-Yuan Chen ;Tzu-En Hua. (1998) .Precambrian Sponges with Cellular Structures Science.Vol. 279, Issue 5352, pp. 879-882.
- Chouikhi A., (2013). Les applications potentielles des macroalgues marines et les activités pharmacologiques de leurs métabolites. Proc. Int.Congr.Popul. Ani. Commu. VI. p1-40.
- Cole, J.J., (1982). Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. Annu. Rev.Ecol. Syst. 13, 291–314.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Ben Rais Lasram, F., Aguzzi, J., Voultsiadou, E. (2010). The Biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, Patterns, and Threats.5(8):e11842.
- Corbin M,(2016). Formation de liaisons carbone-azote : application à la synthèse de benzazoles et de produits naturels marins bioactifs. Thèse de doctorat. Université PARIS-Saclay (248).
- CourtialL, AllemandD,Furla P. (2020), Coraux : les ingénieurs des océans sont menacés, Encyclopédie de l'Environnement, [en ligne ISSN 2555-0950] url : <https://www.encyclopedie-environnement.org/vivant/coraux-ingenieurs-océans-menaces/>.
- Croué J. (2014) Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe : diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques. Biologie végétale. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI,. Français. NNT : 2014PA066244.
- Croue J.(2016). Éponges marines et micro-organismes associés : sources de métabolites bioactifs, THèse de doctorat en pharmacie.Université de POITIERS.Faculté de Médecine et de Pharmacie(77).
- Cummings, P.J., Ahmed, R., Durocher, J.A., Jessen, A., Vardi, T., Obom, K.M.(2013).Pyrosequencing for Microbial Identification and Characterization. J. Vis. Exp. (78), e50405, doi:10.3791/50405 .

D

- Davis, R.A.; Mangalindan, G.C.; Bojo, Z.P.; Antemano, R.R.; Rodriguez, N.O.; Concepcion, G.P.; Samson, S.C.; de Guzman, D.; Cruz, L.J.; Tasdemir, D.; Harper, M.K.; Feng, X.; Carter, G.T.; Ireland, C.M.(2004).Microcionamides A and B, Bioactive Peptides from the Philippine Sponge Clathria (Thalysias) abietina. J. Org. Chem. 69, 4170–4176.
- Dayton, P. K. (1989). Interdecadal variation in an Antarctic sponge and its predators from oceanographic climate shifts. Science 245:1484–1486.
- Daly M, Mercer R. Brugler, Cartwright P, Allen G. Collins, Michael N. Dawson, Daphne G. Fautin, Scott C, Catherine S. Mcfadden, Dennis M. Opresko, Estefania Rodriguez, Sandra L. Romano& Joel L. Stake.,(2007). The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus.Zootaxa : 127-182.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Degnan, BM; Hawkins, CJ; Lavin, MF; McCaffrey, EJ; Parry, DL; van den Brenk, AL; Watters, DJ.(1989).New cyclic peptides with cytotoxic activity from the ascidian *Lissoclinum patella*. *J. Med. Chem*, 32, 1349–1354.

Desbruyères D.(2010). Les trésors des abysses.Ed :Quae(1).P 21(184).

Dettmer K, Aronov PA, Hammock BD.(2017).Mass spectrometry-based metabolomics.*Mass Spectrom Rev*. 26(1):51-78. doi:10.1002/mas.20108

Dhargalkar V K ;Pereira N. (2005). Seaweed: promising plant of the millennium.*Science and culture*, 71:60-66.

Ding L ; Song Qin ; Fuchao Li ;Xiaoyuan Chi ;Hartmut Laatsch.,(2008).Isolation, Antimicrobial Activity, and Metabolites of Fungus *Cladosporium* sp. Associated with Red Alga *Porphyra yezoensis*.*CurrMicrobiol* 56:229–235.

Djemai W., (2019).valorisation des microalgues par extraction et séparation des molécules bioactives. Thèse pour l'obtention du diplôme de doctorat en chimie physique et analytique.université Abou-BekerBelkaid.Faculté des sciences-Tlemcen.p04(114).

Djilali S ; Kherouni N.,(2016).etude comparative de l'activité antimicrobienne des extraits éthanolique et méthanolique d'algues marines ;mémoire de fin de cycle en vue de l'obtention du diplôme master.UniversitéA.Mira.Faculté des sciences de la nature et de la vie-béjaia-algérie.p03(72).

Donald, LA; Ireland, CM.(1992).Patellamide E: A new cyclic peptide from the ascidian *Lissoclinum patella*., 55, 376–379.

Dunn CW Sally P.Leys Steven H.D.Haddock .(2015) The hidden biology of sponges and ctenophores *Trend in Ecology and Evolution* .Volume 30, Issue 5, Pages 282-291.

E

Egan S, Harder T, Burke C, Steinberg P, Kjelleberg S et Thomas T (2013) The seaweed holobiont: understanding seaweed–bacteria interactions. *FEMS Microbiology Reviews* 37 (3): 462-476.

El Gamal Ali A.,(2010).Biological importance of marine algae.Dept. of Pharmacognosy, College of Pharmacy, King Saud University, *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 1–25.

El-Demerdash A, CelineMoriou, Marie-Therése Martin, Alice de Souza Rodrigues-Stien, Sylvain Petek et al.(2016). Cytotoxic Guanidine Alkaloids Polynesian *Monanchora* n. sp. Sponge., *French.Journal of Natural Products*.79(8).p9.

Ernst M., Silva D.B., Silva R.R., Vencio R.Z.N., Lopes N.P.(2014). Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing, *Natural Product Reports*,31(6):784-806.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Erwin P M; M. Carmen Pineda ;Nicole Webster ; Xavier Turon ;Susanna López- Legentil.,(2013)., Small core communities and high variability in bacteria associated with the introduced ascidian *Styela plicata*.Bacterial diversity in *Styela plicata*.Springer science.*Symbiosis*. volume 59, p35–46(12).

EunJu Choi, HakCheolKwon,Jungyeob Ham ;Hyun Ok Yang., (2009). 6-Hydroxymethyl-1-phenazine-carboxamide and 1,6-phenazine dimethanolfrom a marine bacterium, *Brevibacterium*sp. KMD 003, associated with marine purple vase sponge.The Journal of Antibiotics?volume 62, p621–624.

F

Fakruddin MD., Chowdhury A., Nur Hossain MD. , Bin Mannan KS, Mazumdar RM (2012).Pyrosequencing-principles and applications.International Journal Of Life Science and Pharma Research .Vol 2,Issue 2.(12).

Fu, X; Do, T; Schmitz, FJ; Andrusevich, V; Engel, MH.(1998).New cyclic peptides from the ascidian *Lissoclinum patella*. 61, 1547–1551.

Fu, X; Su, J; Zeng, L.(2000). Prepatellamide A, a new cyclic peptide from the ascidian *Lissoclinum patella*. Sci. China Ser., 43, 643–648.

Fusetani, N.; Sugawara, T.; Matsunaga, S.; Hirota, H.(1991). Orbiculamide A: A novel cytotoxic cyclic peptide from a marine sponge *Theonella* sp. J. Am. Chem. Soc. 113, 7811–7812.

G

Garon-Lardière, S., (2004). Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge *Asparagopsisarmata*(Bonnemaisoniales). Thèse de doctorat, Chimie, Université de Bretagne Occidentale, 226 p.

Garson MJ, Flowers AE, Webb RI, Charan RD, McCaffrey EJ.(1998).A sponge/dinoflagellate association in the haplosclerid sponge *Haliclona* sp.: cellular origin of cytotoxic alkaloids by percoll density gradient fractionation. Cell Tissue Res.293(2):365-373. doi:10.1007/s004410051128.

George C., (2017). Restauration des récifs coralliens dégradés par des perturbations locales ; développement d'un outil d'analyses de projets de réintroduction de coraux hermatypique. Canada,p 68.

Gernert, C., F. O. Glockner, G. Krohne, and U. Hentschel.(2005). Microbial diversity of the freshwater sponge *Spongilla lacustris*.Microb. Ecol. 50:206–212.

Gerwick, W. H. T. Luke Simmons, R. Cameron Coates, Benjamin R. Clark, Niclas Engene, David Gonzalez, Eduardo Esquenazi, Pieter C. Dorrestein, and William H .(2008). Biosynthetic origin of natural products isolated from marine microorganism–invertebrate assemblages. 105 (12) 4587-4594.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Gevaert F., (2001). Importance des facteurs de l'environnement et du phénomène de photoinhibition sur la production des grandes algues marines, Thèse de doctorat en Science.Univ. Sci. Technol. Lille, France. 150pp.

Gaubert R., (2016). Elaboration d'un guide de plongée sur les animaux dangereux en mer rouge pour le plongeur. France, P258.

Gopi M ;Ajith Kumar Thippamalai Thangappanpillaib; Balagurunathan Ramasamyd.,(2016).Antimicrobial activities of secondary metabolites and phylogenetic study of sponge endosymbiotic bacteria, *Bacillus* sp. at Agatti Island, Lakshadweep Archipelago.Biotechnology Reports 11:44–52.

Gouletquer, P., Gros, P., Boeuf, G., & Weber, J. (2014). Biodiversity in the Marine Environment .Vol. 52 (1) ;p(111).

Guezennec J, Debitus C.,(2005).les ressources marines de la Polynésie française : application en matière de biotechnologie. IRD éditions.p(39).

Guillaume P.,(2010).Caractérisation biochimique d'exo polymères d'origine algale du bassin de Marennes- Oléron et étude des propriétés physico-chimiques de surface de micro-organismes impliquées dans leur adhésion. Thèse de doctorat, biochimie. Université de La Rochelle, Sciences agricoles Français. 321p.NNT :LAROS 314.

H

Hardoim C.C.P., Costa R., Araújo F.V., Peixoto R.,Lins U.,Rosado A.S. , van Elsas J.D.(2009).Diversity of bacteria in the marine sponge *Aplysina fulva* in Brazilian coastal waters, *Appl. Environ.Microbiol.* 75(10), 3331–3343.

Harrington C. , Del Casale A., Kennedy J, Neve H, Picton B.E, Mooij M., O'Gara F,Kulakov Larkin L.A, M.J. , Dobson A.D. (2012).Evidence of bacteriophage-mediated horizontal transfer of bacterial 16s rRNA genes in the viral metagenome of the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*, *Microbiology* 158(11), 2789–2795.

Hawkins, CJ; Lavin, MF; Marshall, KA; van den Brenk, AL; Watters, DJ.(1990).Structure-activity relationships of the lissoclinamides: Cytotoxic cyclic peptides from the ascidian *Lissoclinum patella*. *J. Med.*, 33, 1634–1638.

Hay, M.E.(2009). Marine chemical ecology: chemical signals and cues structuremarine populations, communities, and ecosystems. *Ann Rev Mar Sci.* 1, 193–212.

Hedges, S. B., J. E. Blair, M. L. Venturi, and J. L. Shoe.(2004). A molecular timescale of eukaryote evolution and the rise of complex multicellular life.*BMC Evol. Biol.* 4:2.1471-2148.

Hentschel U, J. Piel, S.M. Degnan, M.W. Taylor.(2012).Genomic insights into the marine sponge microbiome, *Nat. Rev. Microbiol.* 10(9), 641–654.

Hentschel U, Kayley M. Usher & Michael W. Taylor.(2006).Marine sponges as microbial fermenters .*FEMS Microbiol Ecol*, 55(2),167–177 doi:10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hentschel U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, M. Horn.(2003).
Microbial Diversity of Marine Sponges .Prog Mol Subcell Biol ;37:59-88.

Hill, R. T. (2004). Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for Natural Products Discovery.

Hiroyuki Yamazaki;Defny S. Wewengkang, Teruaki Nishikawa, Henki Rotinsulu, Remy E. P. Mangindaan, and Michio Namikoshi(2012).Two new tryptamine derivatives,and (-)-leptoclidamine B, from an Indonesian ascidian *Leptoclinides dubius*.Mar Drugs.10(2): 349–357.

Hoffmann F, Ole Larsen , Hans Tore Rapp & Ronald Osinga (2005) Oxygen dynamics in choanosomal sponge explants, Marine Biology Research, vol 1:2, 160-163, DOI: 10.1080/17451000510019006

Hollants J, Leliaert F, De Clerck O et Willems A .(2012). What we can learn from sushi: a review on seaweed-bacterial associations. FEMS Microbiology Ecology ; 83(1).p1-16.

Hooper John N. A. et Rob W. M. Van Soest.(2002).Systema Porifera A Guide to the Classification of Sponges.Kluwer Academic Plenum Press.1754 p.

Hooper, J. N. A., and R. W. M. van Soest. 2002. Systema Porifera: a guide to the classification of sponges. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY. Wood, R. (1995). The changing biology of reef-building. Palaios 10:517–529.

Horta A; Alves C; Pinteus S; Lopes C; Fino N; Silva J; Ribeiro J;Rodrigues D; Francisco J; Rodrigues A;Rui Pedrosa.,(2019). identification of *Asparagopsis armata*-associated bacteria and characterization of their bioactive potential. MicrobiologyOpen ;8(9).

Hubert Bonnefond, Charlotte Combe, Jean-Paul Cadoret, Antoine Sciandra, Olivier Bernard. (2019).Potentiel des microalgues. Stéphanie Baumberger. Chimie verte et industries agroalimentaires - Vers une bioéconomie durable, Lavoisier, A paraître p (21).

I

Indraningrat A. A. G., Smidt H., Sipkema D. (2016). Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds.Marine drugs, 14: 87–153.

J

Jugant S, Anne, Josette.(2012).Importance Des Récifs Coralliens Pour Les Poissons Récifaux : Exemple Des Demoiselles (Pomacentridae), Dans L'archipel Des Maldives, France,Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire,Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse – ENVT, p 19-25(142).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Jung H A, Seong Eun Jin , Bo Ra Ahn , Chan Mi Lee , Jae Sue Choi ,(2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology* 59 ,199–206.

Joyard J.,(2019).Qu'est-ce que la biodiversité.Encyclopédie de l'environnement.

K

KahloucheL;Meziane L.,(2017).Etude de quelques métabolites secondaires des souches du genre *Aspergillus* ayant une activité biologique.Mémoire de Master 2.Université des Frères MentouriConstantine.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.p 19-20(78).

Karouane F et Yahiaoui H.,(2019). Evaluation de l'activité antibactérienne et antifongique des extraits métaboliques des champignons isolés en pisciculture.Mémoire de master en Bioressources marines. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.p(75).

Karuppiah, V.; Li, Y.; Sun, W.; Feng, G.; Li, Z.(2015).Functional gene-based discovery of phenazines from the actinobacteria associated with marine sponges in the South China Sea. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*99(14):5939-5950.

Kennedy J , Burkhardt Flemer , Stephen A. Jackso , David P. H. Lejon , John P. Morrissey , Fergal O'Gara and Alan D. W. Dobson.(2010).Marine Metagenomics: New Tools for the Study and Exploitation of Marine Microbial Metabolism .*Mar Drugs*, 8, 608-628; doi:10.3390/md8030608

Khelloufi N.,(2014).Isolement de bactéries productrices d'enzymes d'intérêt agricole, à partir d'algues marines.Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de Magister en microbiologie appliqué.UniversitéAbderrahmanMIRA-Bejaia.Faculté des sciences de la nature et de la vie .p 12(110).

King A, Young G., (1999).Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals.*Journal of the American dietetic association*,99 :213-218.

Kong MK et Chan KY.,(1979). A study on the bacterial flora isolated from marine algae. *Botanica Marina* 22 (2): 83-98

Konstantinou D, Gerovasileiou V, Voultziadou E, Gkelis S. (2018). Sponges Cyanobacteria associations: Global diversity overview and new data from the Eastern Mediterranean.*PLoS ONE* 13(3): e0195001. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195001>

Kornprobst J.M., (2005).Substances naturelles d'origine marine (chimiodiversité, pharmacodiversité, biotechnologies), ISBN 2-7430-0721-4 Tec. Et Doc., 1500 pp.

L

Lavie S.,(2019); pharmacologie marine,enjeux et perspectives. thèse pour l'obtention diplôme docteur en pharmacie.Université de lille2. Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques-France.p(85).

Ladrière O., (2006). Le blanchiment des coraux. Liege, France, P117.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Monniot C., (1997). Ascidiés phléboranches du conal du muzambique. *Zoosystema* 19 (4) 557-571.

Le Gal Y,(2004). « Biodiversité marine et exploitation biotechnologique des océans », *Vertigo* la revue électronique en sciences de l'environnement [En ligne], la revue électronique en sciences de l'environnement, Vol 5 N 3 . vertigo/3356 ; DOI : 10.4000/vertigo.3356

Le Goff C., (2016). Approches physiologique et moléculaire de la calcification chez le corail rouge de Méditerranée *CORALLIUM RUBRUM*. Monaco, P208.

Li, C. W., J. Y. Chen, and T. E. Hua.,(1998). Precambrian sponges with cellular structures. *Science* 279:879–882.

Liu L, Georg Pohnert and Dong Wei .,(2016). Extracellular Metabolites from Industrial Microalgae and Their Biotechnological Potential. *Mar. Drugs*, 14, 191.p(19).

Lloret J.,(2010). Human health benefits supplied by Mediterranean marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin* 60.1640–1646.

Lohr J.E., F. Chen, R.T. Hill.,(2005). Genomic analysis of bacteriophage PhiJL001: insights into its interaction with a sponge-associated alpha-proteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3), 1598–1609.

Longford SR, Tujula NA, Crocetti GR, Holmes AJ, Holmström C, Kjelleberg S et Taylor MW .,(2007) .Comparisons of diversity of bacterial communities associated with three sessile marine eukaryotes. *Aquatic microbial ecology* 48 (3): 217-229.

M

Magnino G, A. Sarà, T. Lancioni, E. Gaino.,(1999). Endobionts of the coral reef sponge *Theonella swinhoei* (Porifera, Demospongiae), *Invertebr. Biol.* 118(3), 213–220.

Maldonado M., Sánchez-Tocino L., Navarro, C. (2010). Recurrent disease outbreaks in corneous demosponges of the genus *Ircinia*: epidemic incidence and defense mechanisms. *Marine Biology*, 157: 1577–1590.

Manon P.,(2001). « Qu'est-ce que la mer Méditerranée ? » [archive], sur www.polmar.com .

Perez R., (2000). *Ces algues qui nous entourent*, Editions Ifremer ISBN 2- 9055434-75-9, 253 pp.

Margot H ,Acebal C. , Toril E, Amils R, Fernandez Puentes J.L.(2002). Consistent association of crenarchaeal archaea with sponges of the genus *Axinella*, *Mar. Biol.* 140, 739–745.

McDonald, LA; Christopher Swersey, J; Ireland, CM; Carroll, AR; Coll, JC; Bowden, BF; Fairchild, CR; Cornell, L.,(1995). Botryllamides A–D, new brominated tyrosine derivatives from styelid ascidians of the genus *Botryllus*., *Tetrahedron*., 51, 5237–5244.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mehbub MF , Lei J, Franco C ;Zhang W.(2014).Marine Sponge Derived Natural Products between 2001 and 2010: Trends and Opportunities for Discovery of Bioactives Mar. Drugs, 12, 4539-4577; doi:10.3390/md12084539

Meyer, C. J., Krauth, M., Wick, M. J., Shay, J. W., Gellert, G., De Branamder, J. K., Nortcote, P. T., & Miller, J. H. (2015). Peluroside A inhibits growth of human lung and breast tumor xenografts in an athymic nu/nu mouse model. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(11), 1816-1823.

Moreau J, Weinberg S.,(2009).Découvrir la vie sous-marine Atlantique, Manche et Mer Du Nord.

Moubax I, Nathalie Bontemps-Subielos, Bernard Banaigs, Georges Combaut *et al.*, 3 novembre.,(2009).Structure–activityrelationship for bromoindolecarbaldehydes: Effects on the seaurchinembryocell cycle.

Mer-littoral.org. (s.d.). *Mer-littoral.org*. Consulté le Mai 2017, sur <http://www.merlittoral.org/32/ascidiacea-1.php>

MüllerW.E.G., MüllerI.M., (2003).Origin of the metazoan immune system: identification of the molecules and their functions in sponges, *Integr. Comp. Biol.* 43, 281–292.

N

Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., Tanaka, R. (1996).Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fish Sciences*, 62(6): 923-6.

Navarri M.,(2016).Métabolites secondaires de champignons de sédiments marins profonds: criblages génétique et fonctionnel et caractérisation structurale de molécules antimicrobiennes.Thèse de doctorat.Université de Bretagne Occidentale.p(193).

O

O'Rourke, A., Kremb, S., Bader, T. M., Helfer, M., Schmitt-Kopplin, P., Gerwick, W. H., Brack-Werner, R. and Voolstra, C. R. (2016).Alkaloids from the sponge *Stylissa carteri* present prospective scaffolds for the inhibition of human immunodeficiency Virus 1 (HIV-1). *Mar. Drugs* 14, 28.

Olguin-Uribe ;E. Abou-Mansour, A. Boulander, H. Débard, C. Francisco ; G. Combaut.,(1997).6-Bromoindole-3-Carbaldehyde, from an *Acinetobacter* Sp. Bacterium Associated with the Ascidian *Stomozoa murrayi*.*Journal of Chemical Ecology* .vol 23, p2507–2521.

Othmani A.,(2014). Médiation chimique entre l'algue brune méditerranéenne *Taoniaatomaria* et la communauté bactérienne associée à sa surface. Thèse de doctorat. Université de Toulon.p 41(338).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ozenda P. (2000). Les végétaux, organisation et diversité biologique. Ed :Dunod. Collection science sup.516p.

P

Pascal., (2004), les récifs coralliens., Aquarium de la Porte Dorée, CRDP de Paris, p12.

Pasquet V.,(2011).recherche bioguidée de molécules anticancéreuses issues de microalgues marines. Thèse pour l'obtention du grade docteur en biochimie. Université de La Rochelle-France.202p.

Patel K.,(2010). Extraction de métabolites bioactifs d'éponges marines du Pacifique Sud. Thèse de Doctorat en Chimie.p4(266).

Pal Singh R ; Puja Kumari ;C. R. K. Reddy.,(2014). Antimicrobial compounds from seaweeds-associated bacteria and fungi. Appl Microbiol Biotechnol.p (16).

Pauletti Patrícia Mendonça; Lucas Silva Cintra, Caio Guedes Braguine, Ademar Alves da Silva Filho, Márcio Luís Andrade E Silva, Wilson Roberto Cunha, Ana Helena Januário.,(2010). Halogenated Indole Alkaloids from Marine Invertebrates. Mar drugs;8(5):1526-49.

Peng, J.X.; Jiao, J.Y.; Li, J.; Wang, W.; Gu, Q.Q.; Zhu, T.J.; Li, D.H.,(2012). Pyrone polyene C-glucosides with NF-kappa B inhibitory and anti-influenza A viral (H1N1) activities from the sponge-associated fungus *Epicoccum* sp. JJY40. Bioorg. Med. Chem. Lett. 22, 3188–3190.

Phan Thi Hoai Trinh, Ngo Thi Duy Ngoc, Phi Quyet Tien, Le Dinh Hung, Vo Thi Dieu Trang, Cao Thi Thuy Hang, Huynh Hoang Nhu Khanh, Tran Thi Thanh Van, Bui Minh Ly.,(2016). Antibacterial activity of marine bacteria associated with sponges from phu quoc island in vietnam. Tạp chí Công nghệ Sinh học 14(1): 181-190.

Pichon E., (2016). Recherche de molécules naturelles bioactives issues de la biodiversité marine de la zone sud-ouest de l'océan Indien. Biologie moléculaire. Thèse de Doctorat. Université de la Réunion. École doctorale Sciences, Technologies et Santé (Saint-Denis, La Réunion).p(249).

K

Kaaria P K.,(2018). Antimicrobial and cytotoxic activities of secondary metabolites from bacteria associated with marine algae of the kenya coast. Thèse de doctorat en microbiologie. Université de Jomo Kenyatta de technologie et agriculture. p(164).

R

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Rajivgandhi G, Govindan Ramachandran , Muthuchamy Maruthupandy,Subramaniyan Saravanakumar , Natesan Manoharan ;Rajendran Viji.,(2018).Antibacterial Effect of Endophytic Actinomycetes from Marine Algae against Multi Drug Resistant Gram Negative Bacteria. *Examines Mar BiolOceanogr.* 1(4).

Rakotovao T H.,(2015).Aspects biologiques des metabolites secondaires issus des actinomycetes isoles des eponges marines de la cote sud est de Madagascar.Mémoire de recherche en Biotechnologie-Microbiologie.Universite d'Antananarivo.Faculte des sciences.p(68).

Rashid, MA; Gustafson, KR; Cardellina, JH, II; Boyd, MR; Patellamide, F.,(1995).A new cytotoxic cyclic peptide from the colonial ascidian *Lissoclinum patella*. *J.*, 58, 594–597.

Reiswig HM .(1974).Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges *J. exp. mar. Bid. Ecu*,Vol. 14, pp. 231-249; CC: North-HoiiiaRdPublishingCompany.

Revel J.,(2015).Mediateurs chimiques dans la symbiose cnidaire-dinoflagelleScaractérisation, distribution et réponse au stress. *Journal of Chemical Ecology* volume 23, p2507–2521.

Revel J., (2015). Mediateurs chimiques dans la symbiose cnidaires-Dinoflagelles caracterisation, destribution et repose au stress. Nice, France, P 303.

Rishiram Ramanan a, Byung-Hyuk Kim a, Dae-Hyun Cho a, Hee-Mock Oh b,c, Hee-Sik Kim .(2016).Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. *BiotechnologyAdvances* 34 ;p14–29.

S

Sahnoun A; Chenine A.(2017).Contribution à l'étude de l'effet de la variation saisonnière (hiver-printemps) de l'activité antibactérienne et antioxydante de différents extraits de l'algue verte *Caulerparacemosa* de la côte Mostaganémoise.Mémoire de Master en biologie. Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem.Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie.p(71).

Salaün S, La Barre S, Santos-Goncalvez MD, Potin P, Haras D et Bazire A.,(2012). Influence of exudates of the kelp *Laminaria Digitata* on biofilm formation of associated and exogenous bacterial epiphytes. *MicrobiolEcology* 64: 359–369

Salaün S.,(2009). Interactions entre la macroalgue brune *Laminariadigitata* et ses épibiontes bactériens : études moléculaire et spectroscopiques : capacité d'adhésion et de formation de biofilm. *Biologie moléculaire*.Thèse de doctorat. Université de Bretagne Sud.p 42-43(266).

Salomon C E ; Magarvey N A, Sherman D H.,(2004).Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* 21, 105–121.

Schmidt TM, DeLong EF, Pace NR.,(1991).Analysis of a picoplankton community by 16S rRNA gene cloning and sequencing. *J Bacteriol* 173:4371–4378

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Schneemann, I.; Kajahn, I.; Ohlendorf, B.; Zinecker, H.; Erhard, A.; Nagel, K.; Wiese, J.; Imhoff, J.F.,(2010). Mayamycin, a cytotoxic polyketide from a *Streptomyces* strain isolated from the marine sponge *Halichondria panicea*. *J. Natl. Prod.* 73, 1309–1312 *Sciences*, 105(12), 4587-4594. doi:10.1073/pnas.0709851105

Séchet V ;Quilliam M ;Lassus P.,(1997). Recherche d'acide okadaïque (et de ses dérivés) chez les bactéries associées aux dinoflagellés responsables d'intoxication diarrhéique, sur les côtes françaises. IFREMER, Laboratoire Phycotoxines et Nuisances, Nantes, France.institute for Marine Biosciences, NRC, Halifax, Canada.42p.

Selvin J., Shanmughapriya S , Gandhimathi R, Seghal Kiran G,Rajeetha Ravji T, Natarajaseenivasan K ; Hema.T.A.,(2009).Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardopsis dassonvillei* MAD08.*Applied Microbiology and Biotechnology* ;vol 83, p 435–445.

Selvin J; Gandhimathi R; Seghal Kiran G; Shanmugha Priya S ; Rajeetha Ravji T; Hema T. A.,(2009).Culturable heterotrophic bacteria from the marine sponge *Dendrilla nigra*: isolation and phylogenetic diversity of actinobacteria.*Helgol Mar Res* 63:239–247.

Sergey V Dobretsov *et* Pei-Yuan Qian .,2002., Effect of bacteria associated with the free alga *Ulva reticulata* on marine micro-and macrofouling.*Biofouling*, Vol 18(3),p 217-228.

Smaoui S.,(2010).Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés.Thèse de doctorat.Université de Toulouse.p(251).

Shaala L.A; Daa T. A. Youssef ; Jihan M. Badr; Steve M. Harakeh; Grégory Genta-Jouve.,(2019).Bioactive Diketopiperazines and Nucleoside Derivatives from a Sponge-Derived *Streptomyces* Species.*Mar. Drugs*, 17, 584

Simmons, T. L., Coates, R. C., Clark, B. R., Engene, N., Gonzalez, D., Esquenazi, E., Souza, T. M., Abrantes, J. L., de A Epifanio, R., Leite Fontes, C. F. and Frugulhetti, I. C.,(2007).The alkaloid 4-methylaaptamine isolated from the sponge *Aaptos aaptos* impairs Herpes simplex virus Type 1 penetration and immediate early protein synthesis. *Planta Med.* 73, 200-205.

Smaoui S.,(2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés.Thèse de doctorat.Université de Toulouse.p(251).

Stephen A. Jackson, Jonathan Kennedy, Lekha Menon Margassery, Burkhardt Flemer, Niall O’Leary, John P. Morrissey, Fergal O’Gara, Alan D. W. Dobson .,(2015).Marine Sponges – Molecular Biology and Biotechnology. pp 219-239

Subramani, R.; Kumar, R.; Prasad, P.; Aalbersberg, W.,(2013).Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 3, 291–296.

Swersey, JC; Ireland, CM; Cornell, LM; Peterson, RW.,(1994).Eusynstyelamide, a highly modified dimer peptide from the ascidian *Eusynstyela misakiensis*.*J.*, 57, 842–845.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Sylvain P.,(2018) .Substances naturelles : des trésors cachés. In : Payri Claude (ed.), Moatti Jean-Paul (préf.). Nouvelle-Calédonie : archipel de corail. Marseille (FRA), Nouméa : IRD, Solaris, p. 205-210.

T

Taourirt B ; Kemmad I.,(2019).La recherche des microorganismes dans la côte de Bénisaf.mémoire pour l'obtention du diplôme master en sciences biologiques.Université Belhadj Bouchaib d'Ain-Témouchent.Faculté des sciences.p(70).

Taylor MW, Radax R, Steger D and Wagner M .(2007).Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological potential.Microbiology and Molecular Biology Reviews 71(2):295-347.

Taylor, SW; Craig, AG; Fischer, WH; Park, M; Lehrer, RI.Styelin D., (2000). An extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes., 275, 38417–38426.

Thurber RV, Wilner-Hall D, Rodrigues-Mueller B, Desnues C, Edwards RA, Florent A, Dinsdale E, Kelly L, Forest R.,(2009).Metagenomic analysis of stressed coral holobionts.Environ. Microbiol.11(8):2148–63.

Trabelsi L. , H. Ben Ouada , H. Bassa.,(2010).activités biologiques des métabolites excrétés par la cyanobactérie filamenteuse *Arthrospiraplatensis* . Phytothérapie ;8: 282–289.

Tremblay P.,(2009).Caractérisation de la diversité bactérienne associée à trois espèces de coraux scléactiniaires: *galaxea fascicularis*, *pavona cactus* et *turbinaria areniformis* . Université du Québec à Rimouski, Canada, vol 80.

U

Unson, M.D., Faulkner, D.J., (1993).Cyanobacterial symbiont biosynthesis of chlorinated metabolites from *Dysidea herbacea* (Porifera). *Experientia* 49, 349–353
<https://doi.org/10.1007/BF01923420>

V

Vacelet J., (1971). Etude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée chroococcale et une éponge du genre *Verongia*, *J. Microsc.* 12, 363–380.

Vacelet J, Donadey C.,(1977).Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Biol Ecol* 30:301–314.

Van Soest RWM, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, Nicole J De Voogd, Nadiezhda Santodomingo, Bart Vanhoorne, Kelly M, John N A Hooper .,(2012) .Global Diversity of Sponges (Porifera). *PLoS one* 7(4): e35105. doi:10.1371/journal.pone.0035105

Vidal-Dupiol J.,(2011). Systèmes Intégrés, Environnement, Biodiversité"Stress environnementaux chez le corail scléactiniaire *Pocilloporadamicornis* : Du modèle

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

expérimental à l'identification de marqueurs fonctionnels du stress., Ecole Pratique des Hautes Etudes.

Villas-Bôas SG, Mas S, Akesson M, Smedsgaard J, Nielsen J.,(2005).Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom Rev.* 24(5):613-646. doi:10.1002/mas.20032

Vogel S.,(1977).Current-induced flow through living sponges in nature Proc. Nati. Acad. Sci. USA Vol. 74, No. 5, pp. 2069-2071.

Vimal J .,(2007). Physiopathologie des coraux. Thèse de doctorat. Université Claude-Bernard - LYON I,p(127).

W

Webster N.S., A.P. Negri, M.M. Munro, C.N. Battershill.,(2004).Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges, *Environ. Microbiol.* 6, 288–300.

Webster, N. S., K. J. Wilson, L. L. Blackall, and R. T. Hill.,(2001). Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:434–444.

Wei, X.; Nieves, K.; Rodríguez, A.D.,(2010).Neopetrosiamine A, biologically active bis-piperidine alkaloid from the Caribbean sea sponge *Neopetrosia proxima*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 5905–5908.

Weinheimer, A.J.; Spraggins, R.L.,(1969).The occurrence of two new prostaglandin derivatives (15-epi-PGA and its acetate, methyl ester) in the Gorgonian *Plexaura homomalla* chemistry of Coelenterates. XV. *Tetrahedron Lett.* 10, 5185–5188.

Wolfendera J L;Guillaume M; Aurélien T; 1 Bertrand S.,(2014).Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts.*Journal of Chromatography A*,(29).

Y

Yarden O. (2014). Fungal association with sessile marine invertebrates. *Frontiers in microbiology*, 5: 228–234.

Yasuhara-Bell & Lu, (2010). Marine compounds and their antiviral activities. *Res.*86;231-240.

Yoon w j, Soo-Jin Heo, Sang-Chul Han, Hye-Ja Lee, Gyeong-Jin Kang , Hee-Kyoung Kang , Jin-Won Hyun , Young-Sang Koh, and Eun-Sook Yoo.,(2012). Anti-inflammatory Effect of Sargachromanol G Isolated from *Sargassum siliquastrum* in RAW 264.7 Cells. *Arch Pharm Res.* Vol 35, No 8, 1421-1430.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Z

Zampella, A.; Sepe, V.; Luciano, P.; Bellotta, F.; Monti, M.C.; D'Auria, M.V.; Jepsen, T.; Petek, S.; Adeline, M.-T.R.S.; Lapr v te, O.,(2008). Homophymine A, an anti-HIV cyclodepsipeptide from the sponge Homophymia sp. *J. Org. Chem.* 73, 5319–5327.

Zehlila A.,(2017).caractérisation structurale et fonctionnelle des métabolites de l'algues vertes *Ulvarigida* au moyen d'une approcheprotéomique.thèse en vue de l'obtention du doctorat en sciences biologiques. Université Tunis El MANAR. Faculté des sciences de TUNIS.p(227)

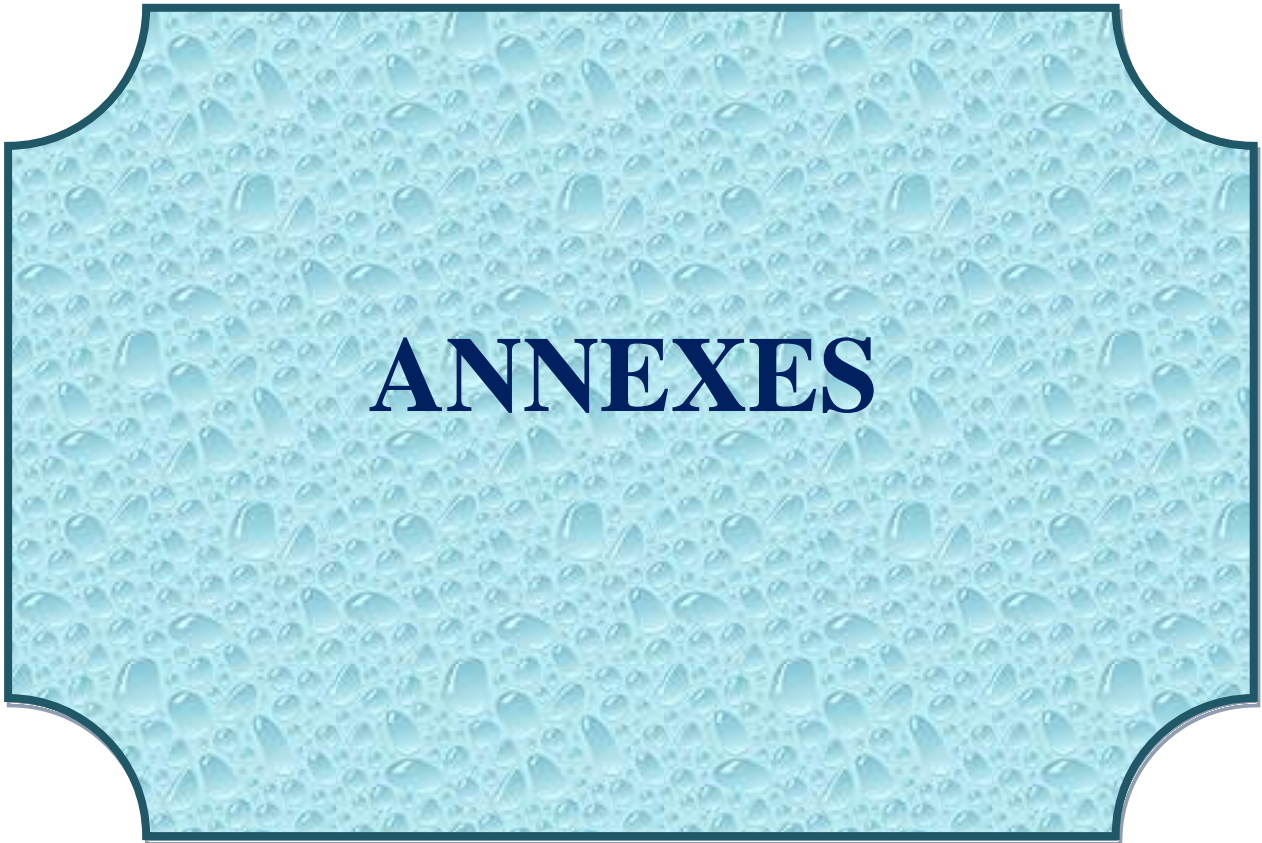
Zhang A; Hui Sun; Ping Wang; Ying Han and Xijun Wang.,(2012).Modern analytical techniques in metabolomicsanalysis.*Analyst*, 137,293–300.www.rsc.org/analyst.

Zhao, Y.; Si, L.; Liu, D.; Proksch, P.; Zhou, D.; Lin, W. (2015).Truncateols A-N, new isoprenylated cyclohexanols from the sponge-associated fungus *Truncatella angustata* with anti-H1N1 virus activities. *Tetrahedron*, 71, 2708–2718.

Zhang A; Hui Sun; Ping Wang; Ying Han and Xijun Wang.,(2012).Modern analytical techniques in metabolomics analysis.*Analyst*, 137,293–300. www.rsc.org/analyst.

Ziani L.,(2019).contributionà l'étude de l'activité antibactérienne de quatre algues marines de la cote de Bejaia.Université de Abderrahmane Mira.Faculté des sciences de la nature et de la vie-Béjaia.p03(74).

Zwirgmaier K., (2005) .Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation *FEMS Microbiology Letters* 246:151–158.



ANNEXES

ANNEXES

Annexe 01 : Milieux de culture

- Gélose marine;
- Bouillon marin;
- Gélose Mueller-Hinton ;
- Bouillon nutritif.
- Gélose nutritive.
- Zobell Marine Agar 2216.

Annexe 02 : Bouillon nutritif

- Peptone..... 10g
 - Chlorure de sodium..... 5g
 - Extrait de viande..... 10g
 - Extrait de levure..... 1.5g
- Le PH est ajusté à 7,3 puis le milieu stérilisé à 120 C pendant 20 minutes.

Annexe 03 : Gélose nutritive

- Peptone..... 10g
 - Chlorure de sodium..... 5g
 - Extrait de viande..... 10g
 - Extrait de levure..... 1.5g
 - Agar 17g
- Le PH est ajusté à 7,3 puis le milieu stérilisé à 120 C pendant 20 minutes.

Annexe 04 : Gélose Mueller-Hinton

- Composition en g/l
- Extrait de viande..... 2 g
 - Hydrolysate acide de caséine 17,5 g
 - Amidon 1.5g
 - Agar..... 17g

Après la préparation du milieu le pH de ce dernier est ajusté à 7,4 puis le milieu stérilisé à 120C° pendant 20 min.

Annexe 05 : La gélose marine et le bouillon marin

Gélose marine composition /L	Bouillon marin composition /L
Peptone 10 g	Peptone 10 g
Extrait de levure 2 g,	Extrait de levure 2 g,
MgSO4 0,2 g,	MgSO4 0,2 g,
KH2PO4 0,2 g	KH2PO4 0,2 g
Agar-agar 36 g	
pH 7,0-7,2	

Annexe 06 : Zobell Marine Agar 2216 :

Utilisation prévue : Recommandé pour la culture, l'isolement et le dénombrement des bactéries marines hétérotrophes.

Composition	Ingrédients Gms / Litre
Peptone	5.000
Extrait de levure	1.000
Citrate ferrique	0,100
Chlorure de sodium	19,450
Chlorure de magnésium	8.800
Sulfate de sodium	3,240
Chlorure de calcium	1.800

Chlorure de potassium	0,550
Bicarbonate de sodium	0,160
Bromure de potassium	0,080
Chlorure de strontium	0,034
Acide borique	0,022
Silicate de sodium	0,004
Fluorate de sodium	0,0024
Nitrate d'ammonium	0,0016
Phosphate disodique	0,008
Agar	15.000

pH final (à 25°C) 7,6±0,2

Annexe 07 : Le matériel nécessaire en laboratoire pour réaliser cette expérience

Matériel biologique : Des espèces marines sessiles (épnges- ascidies- coraux- algues).

Appareillage :

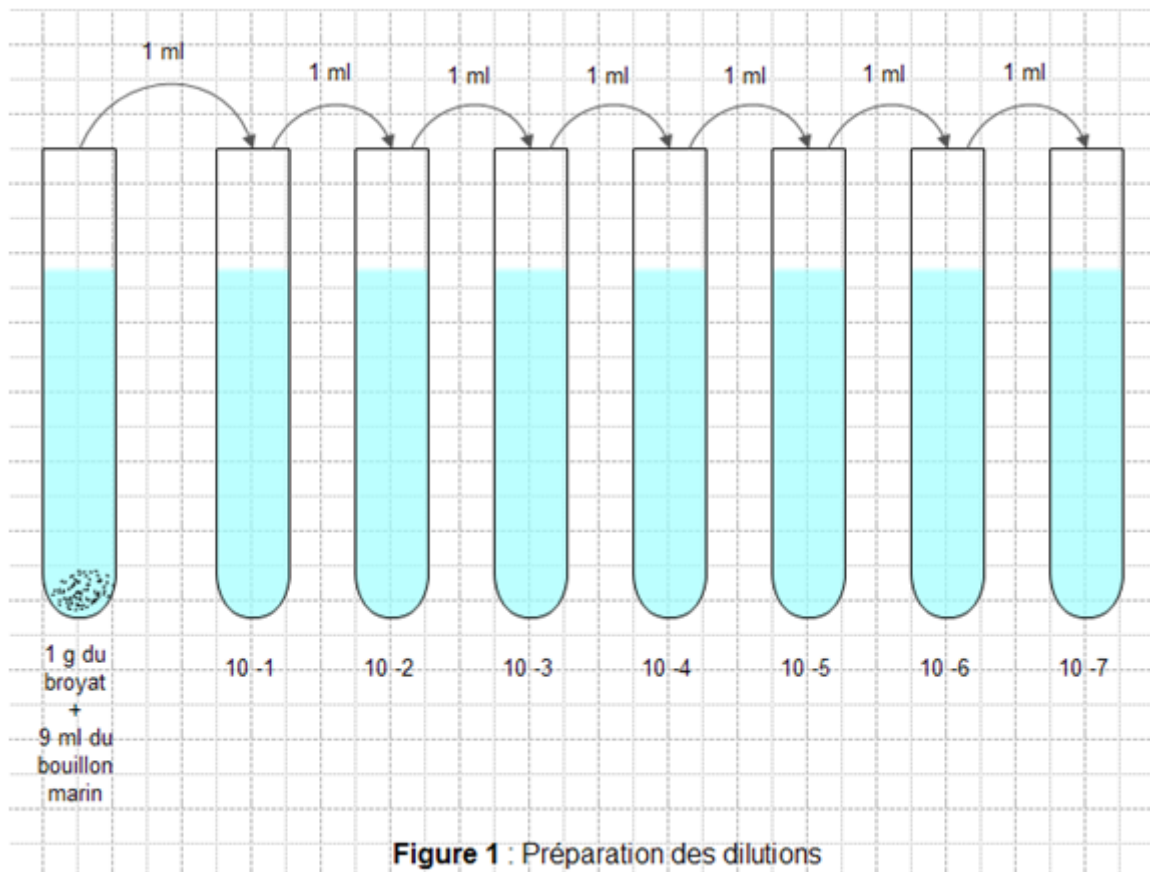
- Broyeur ;**
- Balance ;**
- Incubateur ;**
- Agitateur vortex ;**
- Centrifugeuse.**

Verrerie :

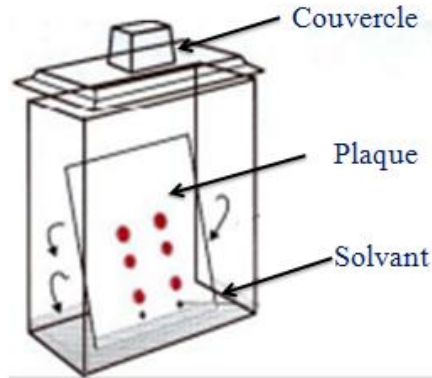
- Tubes et Microtubes ;**
- Râteau en verre ;**
- Pipettes Pasteur ;**
- Boîtes de Petri ;**

- Erlenmeyer ;
- Ecouvillon ;
- Micropipettes ;
- Entonnoir.

Annexe 08 : Preparation des dilutions



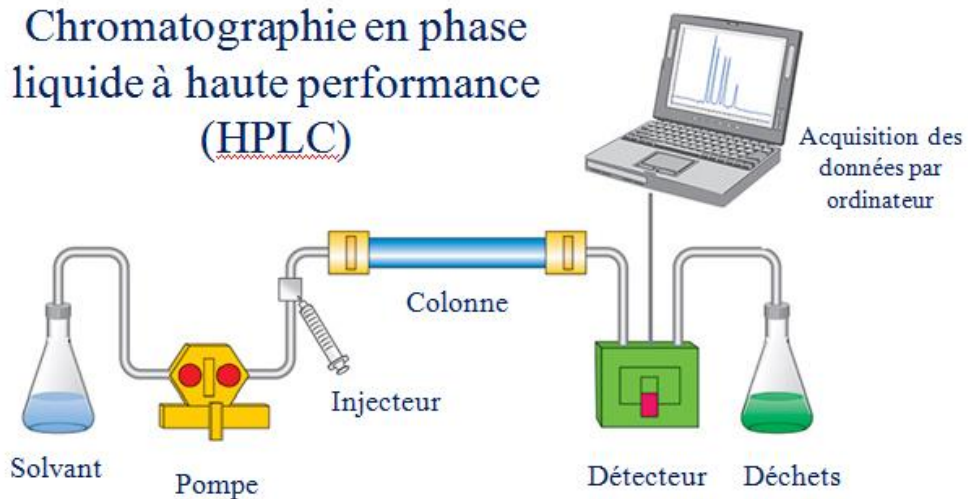
Annexe 09 : Principe de la chromatographie sur couche mince



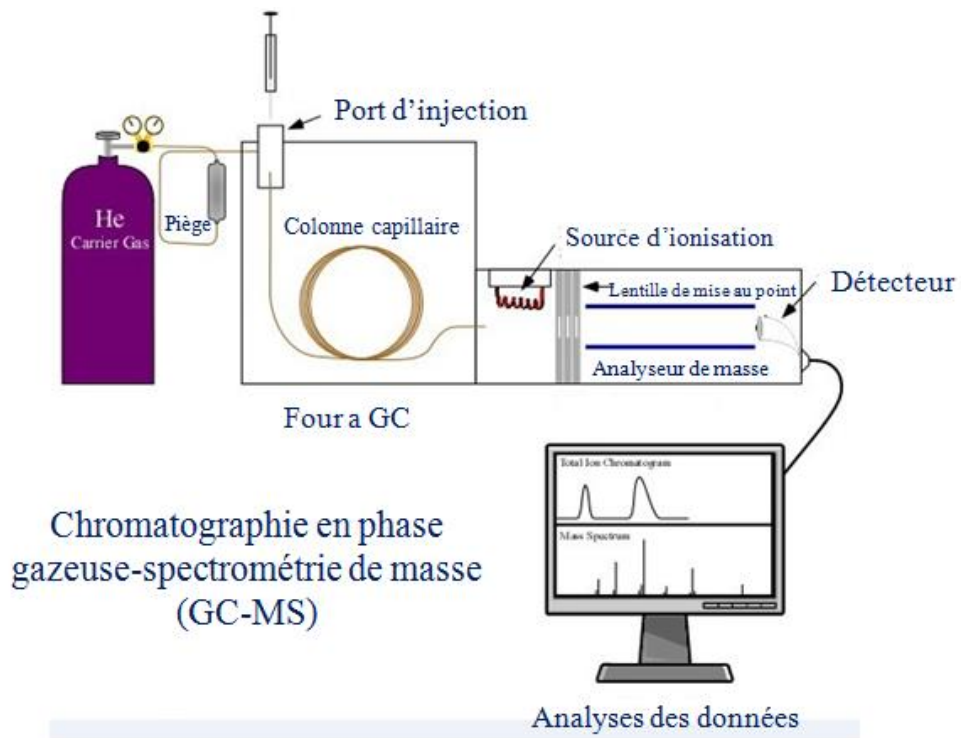
Chromatographie sur couche mince
(CCM)

Annexe 10 : Principe de la chromatographie liquide à haute performance.

Chromatographie en phase
liquide à haute performance
(HPLC)



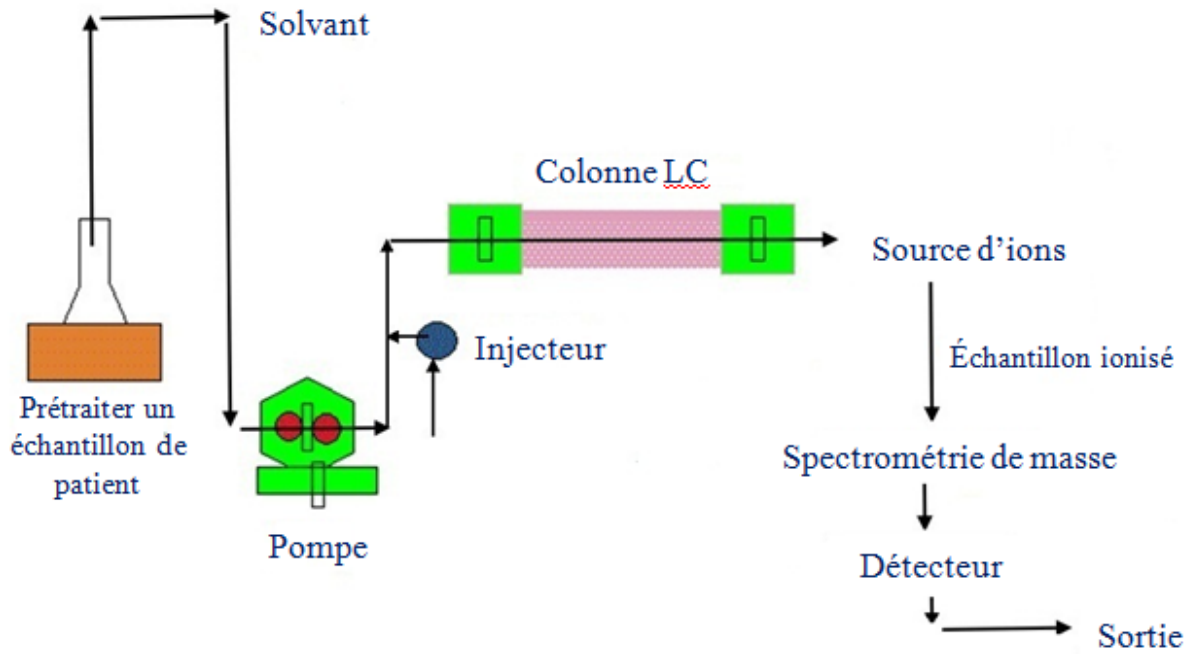
Annexe 11 : Principe de la GC-MS



Chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse (GC-MS)

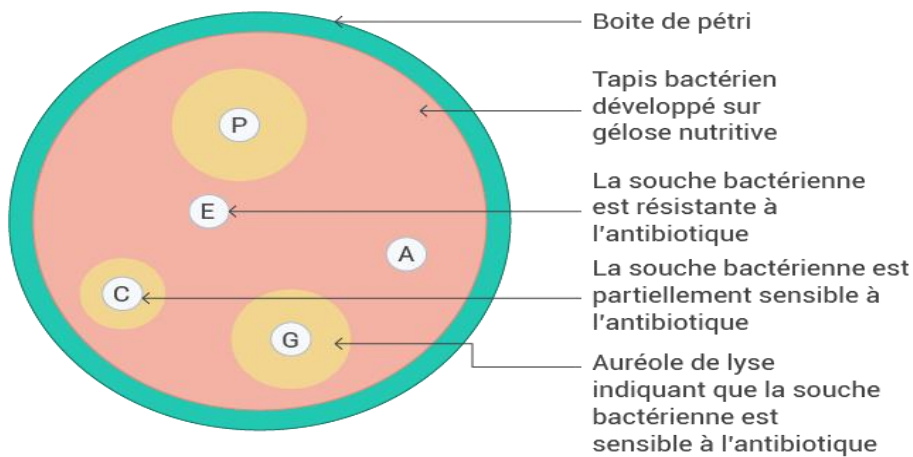
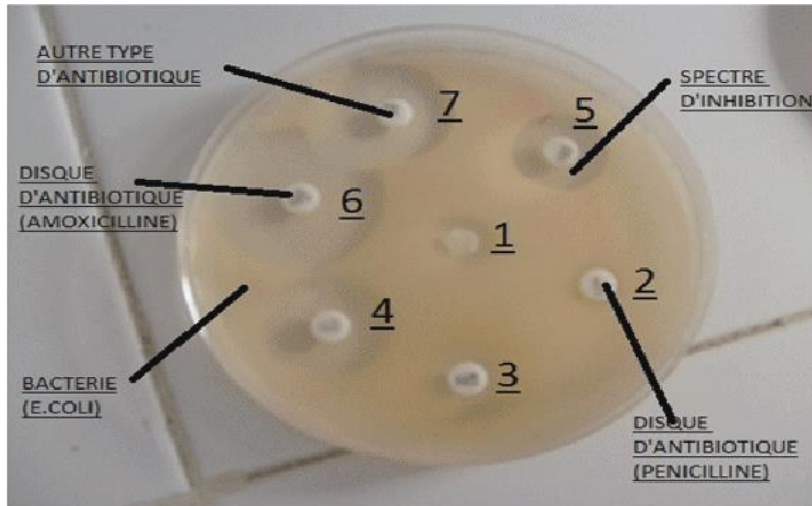
Analyses des données

Annexe 12 : Principe de la LC-MS



Chromatographie en phase liquide-spectrométrie de masse
(LC-MS)

Annexe 13 : Principe de la méthode de diffusion sur disque



(P) (E) (A) (G) (C)

Pastilles d'antibiotiques :
 amoxicilline,
 pénicilline,
 cefotaxime,
 érythromycine,
 gentamicine