

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**  
**École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral**



**Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur et de Master en Sciences de la Mer**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie  
**Filière :** Hydrobiologie Marine et Continentale  
**Option :** Biotechnologie Marine

**Thème**

**IDENTIFICATION GÉNÉTIQUE ET CARACTÉRISATION  
BIOCHIMIQUE DES ESPÈCES MARINES ANIMALES DE  
LA CÔTE ALGÉRIENNE**

**Réalisée par :** BENSALÉM Selma, OMANI Ilham

**Soutenu le 08/07/2025 devant le jury suivant :**

Mme. AISSOU-AKROUR C.	MCA	ENSSMAL	Présidente
Mme. AMAR I.	MAA	ENSSMAL	Examinatrice
M. GUEDDOU A.	MRB	CRSP	Invité
Mme. BOUKHAROUBA A.	MCA	ENSSMAL	Promotrice
M. GRIMES S.	Professeur	ENSSMAL	Co-promoteur

**2024/2025**

# *Remerciements*

*Au terme de ce travail, il nous tient à cœur de remercier toutes les personnes sans qui cette aventure n'aurait jamais pu aboutir.*

*À nos parents, nous devons bien plus que des mots. Leur amour, leur compréhension et leur présence discrète mais constante ont été un véritable socle sur lequel nous avons pu nous appuyer, jour après jour. Dans les moments de doute comme dans les petites victoires, leur soutien a toujours été là, fidèle et inconditionnel.*

*Nous adressons également nos sincères remerciements à Madame AISSOU-AKROUR Cherifa, présidente de notre jury, pour l'attention portée à notre travail, ainsi qu'à Madame AMAR Imen, examinatrice, pour ses lectures attentives, ses remarques pertinentes et sa bienveillance.*

*Nous tenons à remercier notre promotrice, Madame BOUKHAROUBA Aya, pour son accompagnement exigeant mais juste, son écoute attentive et la qualité de ses conseils. À ses côtés, nous avons appris à structurer nos idées, à affiner notre regard critique et à persévérer avec méthode. Un immense merci également à notre co-promoteur, Monsieur GRIMES Samir, pour sa disponibilité, sa bienveillance et son expertise précieuse.*

*Nous exprimons également notre gratitude à Madame BOUTEKRABET Lynda la Directrice de notre école, dont le soutien et la bienveillance ont joué un rôle important dans la réussite de ce projet.*

*Nous exprimons notre profonde gratitude au Professeur SAIDI Djamel, directeur de l'École Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), pour son soutien institutionnel. Nos remerciements vont également à Monsieur MERZOUG Mohamed, responsable de la plateforme de génomique (PLAGENOR), pour sa disponibilité et son accompagnement technique, ainsi qu'à toute son équipe pour leur précieuse collaboration tout au long de ce travail.*

*Nous exprimons notre vive reconnaissance au Dr. GUEDDOU Abdellatif pour les conseils avisés et l'expertise précieuse qu'il a généreusement partagés, en particulier lors de la finalisation de la partie génétique de ce mémoire.*

*Nous remercions également Madame GUEROUMI Houda, notre ingénieure de laboratoire (LBCM2), pour son sérieux, sa constance et son aide quotidienne.*

*Notre reconnaissance va également à Monsieur MEZOUAR Khoudir, directeur des études et de la formation continue à l'ENSSMAL, pour son engagement sans faille, sa disponibilité et son accompagnement tout au long de notre parcours.*

*Un mot tout particulier au club de plongée El Mordjane ainsi qu'au club Paradive, pour leur implication précieuse dans le bon déroulement de nos activités en mer. Nous remercions chaleureusement leurs présidents et moniteurs pour leur engagement, leur accompagnement sur le terrain et leur soutien logistique, qui ont grandement facilité nos sorties et enrichi notre expérience de terrain.*

*Enfin, nous pensons à nos amis, à nos camarades de promotion, et à toutes celles et ceux — de près ou de loin — qui nous ont aidés, encouragés, ou simplement écoutés. À toutes les personnes qui ont croisé notre route pendant cette aventure, merci.*

*Ce mémoire est le fruit d'un travail collectif, mais aussi d'un chemin personnel, riche de doutes, de découvertes et de gratitude. Nous espérons qu'il saura en refléter l'esprit*

# *Dédicace*

À mes parents,

Pour leur amour inconditionnel, leur patience silencieuse et leur présence indéfectible, même dans l'ombre. À ceux qui ont toujours cru en moi, même quand moi-même je doutais. Rien de tout cela n'aurait été possible sans leur force, leur sacrifice discret et leur confiance profonde.

À mes sœurs,

Soumia, Ikram et Ines, piliers de mon monde. Elles sont ces présences discrètes mais essentielles, qui soutiennent sans jamais s'imposer, qui apaisent sans poser de questions, et qui donnent un sens plus doux à chaque réussite. Leur affection, leur humour, leur écoute et leur lumière ont été un refuge précieux tout au long de mon chemin.

À Dalia,

Pour sa lumière dans les jours brumeux, pour sa manière unique d'être là, pleinement. Son écoute, ses mots justes, et sa bienveillance ont compté plus qu'elle ne l'imagine.

Et à celles et ceux qui, un jour, croiseront ce travail avec curiosité ou passion — que vous puissiez y trouver les premiers jalons d'un chemin à poursuivre, des idées à développer, et peut-être l'élan de prolonger ce modeste début. Que ce mémoire vous inspire à aller plus loin, là où d'autres chapitres restent encore à écrire.

Ce mémoire est autant une étape qu'un passage de relais.

Selma BENSALÉM

# *Dédicace*

À mes parents,

Pour votre amour sans faille, votre sagesse silencieuse et votre présence constante. Vous avez toujours cru en moi, même lorsque moi-même j'en doutais. Ce mémoire est le reflet de tout ce que vous m'avez transmis, et du chemin parcouru grâce à vous.

À ma sœur jumelle,

Mon reflet, mon autre moi. Même si la vie t'a arrachée trop tôt, ton souvenir m'habite chaque jour. Ton absence m'a appris la résilience, ton amour continue de me guider. Ce mémoire, je te le dédie avec tout mon cœur.

À mes sœurs et à mon frère,

HANANE, FARAH et AYMEN Merci d'avoir été là, chacun à votre manière. Vos mots, vos gestes, vos silences parfois, m'ont apporté du réconfort et de la force.

À ma famille,

Merci pour votre présence rassurante, vos encouragements et votre bienveillance. Dans les moments de doute comme dans les réussites, votre amour a été un véritable moteur.

À mes proches et à mes amis,

K.O.R.F.H.N.L.C.D.H.W.M.Y.. Pour votre présence précieuse, vos encouragements, vos sourires dans les moments difficiles. Vous avez contribué à alléger ce chemin exigeant.

Au club Orca,

Ma seconde famille. Merci pour cette aventure collective, pour les valeurs partagées, pour chaque moment de passion, de travail et de complicité. Vous m'avez aidée à grandir.

À toute personne qui lira ce mémoire,

Merci de consacrer un peu de votre temps à découvrir le fruit de ce travail, né de passion, d'efforts et de convictions profondes. J'espère que ces pages éveilleront en vous autant de curiosité et d'intérêt que j'en ai eu à les écrire.

Ilham OMANI

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b> Localisation géographique du littoral algérien (Google Earth Pro, 2025) .....	5
<b>Figure 2.</b> Carte de localisation du site d'échantillonnage d'Aïn Beniane (Alger).....	26
<b>Figure 3.</b> Carte de localisation du site d'échantillonnage de Béni Saf (Aïn Témouchent).....	26
<b>Figure 4.</b> Séchage des échantillons d' <i>Holothuria tubulosa</i> et <i>Eunicella singularis</i> dans une étuve à 50 °C .....	29
<b>Figure 5.</b> Visualisation des amplicons PCR du gène 18S rRNA d'espèces animales marines sur gel d'agarose à 1,2 %. (MT : marqueur de taille d'ADN (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Pistes : 1 – CRX ; 2 – C ; 3 – EO ; 4 – GOR A ; 5 – GOR T ; 6 – MD ; 7 – AOR) .....	45
<b>Figure 6.</b> Visualisation des amplicons PCR du gène COI d'espèces animales marines sur gel d'agarose à 1,2 %. (MT : marqueur de taille d'ADN (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Pistes : 1 – Témoin positif ; 2 – TM ; 3 – GB). .....	45
<b>Figure 7.</b> Exemple d'une séquence de mauvaise qualité visualisée sur Chromas .....	46
<b>Figure 8.</b> Arbre phylogénétique (construit avec MEGA 12) des espèces animales marines amplifiées avec le gène 18S rRNA, en utilisant "the maximum likelihood method" avec bootstrap analysis (1000 replicats). .....	49
<b>Figure 9.</b> Arbre phylogénétique de l'échantillon TM et d'espèces apparentées d'anémones de mer, construit à l'aide du logiciel MEGA11. L'arbre a été généré à partir des séquences du gène mitochondrial COI, selon la méthode du Neighbor-Joining avec une analyse de bootstrap (200 réplicats). .....	50
<b>Figure 10.</b> Schéma du protocole d'extraction et de détermination de la teneur en lipides chez les gorgones ( <i>Eunicella singularis</i> ) et les holothuries ( <i>Holothuria tubulosa</i> ) selon la méthode de Folch (1957). .....	55
<b>Figure 11.</b> Schéma du protocole d'extraction et de détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT) appliqué aux gorgones et aux holothuries, basé sur la méthode de Kjeldahl .....	56
<b>Figure 12.</b> Schéma du protocole d'extraction des saponines selon Van Dyck et al. (2008), modifié par Decroo et al. (2017) .....	58
<b>Figure 13.</b> Schéma du Protocole d'extraction des polysaccharides totaux et des pigments (Adapté de Dubois et al., 1956, avec modifications appliquées aux tissus animaux) .....	60
<b>Figure 14.</b> Spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique sec d' <i>Eunicella singularis</i> .....	65
<b>Figure 15.</b> Spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique sec d' <i>Holothuria tubulosa</i> .....	66
<b>Figure 16.</b> Spectre d'absorption avec pic principal à 420 nm et structure secondaire à 650 nm .....	69
<b>Figure 17.</b> Spectre d'absorption présentant un minimum profond à 460 nm.....	70
<b>Figure 18.</b> Spectre d'absorption avec minimum à 460 nm et pic secondaire à 520 nm.....	70
<b>Figure 19.</b> Spectre d'absorption montrant un pic intense à 380 nm et une structure à 520 nm	71
<b>Figure 20.</b> Spectre d'absorption avec pic initial à 380 nm et minimum à 460 nm.....	72
<b>Figure 21.</b> Graphe représentant l'activité antioxydante (test DPPH) des extraits de <i>Eunicella singularis</i> (Gor), <i>Chondrosia reniformis</i> (Crx) et <i>Holothuria tubulosa</i> (CM) en fonction de la concentration (µg/mL).....	74

**Figure 22.** Diagramme en bâtons représentant l'activité antioxydante (test DPPH) des extraits de *Eunicella singularis* (Gor), *Chondrosia reniformis* (Crx) et *Holothuria tubulosa* (CM), exprimée en pourcentage d'inhibition (%), à la concentration maximale testée ( $\mu\text{g/mL}$ ). ..... 74

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b> Principaux caractéristiques des groupes d'invertébrés marins étudiés en sciences marines .....	7
<b>Tableau 2.</b> Classification, propriétés fonctionnelles et perspectives d'application des molécules bioactives issues d'invertébrés .....	20
<b>Tableau 3.</b> Principaux types de bioessais utilisés pour l'évaluation de l'activité biologique des biomolécules marines .....	22
<b>Tableau 4.</b> Espèces marines échantillonnées .....	31
<b>Tableau 5.</b> Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes 18S rRNA et COI chez les espèces marines.....	40
<b>Tableau 6.</b> Composants du mélange réactionnel PCR standard pour l'identification génétique .....	40
<b>Tableau 7.</b> Quantification et pureté de l'ADN génomique extrait des espèces animales marines. ....	43
<b>Tableau 8.</b> Résultats d'identification moléculaire par BLAST des séquences analysées.....	46
<b>Tableau 9.</b> Comparaison des identifications morphologiques et moléculaires des espèces animales étudiées .....	48
<b>Tableau 10.</b> Teneur en lipides des échantillons de <i>Eunicella singularis</i> et <i>Holothuria tubulosa</i> .....	63
<b>Tableau 11.</b> Résultats analytiques de la détermination des matières azotées totales (MAT) par la méthode Kjeldahl.....	64
<b>Tableau 12.</b> Résultats des analyses de Matières Azotées Totales (MAT) par la méthode de Kjeldahl .....	64
<b>Tableau 13.</b> Rendements d'extraction des polysaccharides de <i>Eunicella singularis</i> et <i>Holothuria tubulosa</i> .....	65
<b>Tableau 14.</b> Caractérisation spectroscopique FTIR des polysaccharides d' <i>Eunicella singularis</i> .....	67
<b>Tableau 15.</b> Caractérisation spectroscopique FTIR des polysaccharides de <i>Holothuria tubulosa</i> .....	67
<b>Tableau 16.</b> Concentrations en polyphénols totaux dans les extraits des organismes marins	68
<b>Tableau 17.</b> Activité antioxydante des extraits de <i>Eunicella singularis</i> , <i>Chondrosia reniformis</i> et <i>Holothuria tubulosa</i> par le test DPPH.....	73

## **FICHE D'ESPÈCE**

<b>Fiche espèce 1.</b> <i>Holothuria tubulosa</i> Gmelin, 1791 .....	11
<b>Fiche espèce 2.</b> <i>Eunicella verrucosa</i> , (Pallas, 1766.....	12
<b>Fiche espèce 3.</b> <i>Chondrosia reniformis</i> , Nardo, 1847 .....	13
<b>Fiche espèce 4.</b> <i>Paracentrotus lividus</i> , (Lamarck, 1816).....	14
<b>Fiche espèce 5.</b> <i>Actinia equina</i> , (Linnaeus, 1758) .....	15
<b>Fiche espèce 6.</b> <i>Alcyonium acaule</i> , Marion, 1878 .....	16
<b>Fiche espèce 7.</b> <i>Eunicella singularis</i> , (Esper, 1791).....	17
<b>Fiche espèce 8.</b> <i>Alcyonium digitatum</i> , Linnaeus, 1758 .....	18

## GLOSSAIRE

**Absorbance** : Mesure de l'absorption de la lumière par une solution à une longueur d'onde donnée.

**ADN (Acide Désoxyribonucléique)** : Molécule porteuse de l'information génétique chez tous les êtres vivants. Elle contient les instructions nécessaires à la synthèse des protéines.

**ARN (Acide Ribonucléique)** : Molécule impliquée dans la synthèse des protéines, elle est transcrite à partir de l'ADN et traduite pour former des protéines.

**Amplification (PCR)** : Réaction en chaîne par polymérase permettant de multiplier rapidement une séquence d'ADN cible en millions de copies.

**Barcoding ADN** : Méthode d'identification des espèces basée sur une courte séquence standardisée de l'ADN, souvent le gène 18S ou COI.

**Séquençage génétique** : Technique permettant de déterminer l'ordre des bases (A, T, C, G) dans une molécule d'ADN.

**Électrophorèse** : Méthode de séparation des fragments d'ADN en fonction de leur taille à l'aide d'un champ électrique.

**Marqueurs génétiques** : Séquences spécifiques de l'ADN utilisées pour identifier des gènes ou des variations entre individus ou espèces.

**Gène 18S rRNA** : Gène codant pour l'ARN ribosomal 18S, utilisé fréquemment en taxonomie moléculaire pour identifier les eucaryotes.

**Biotechnologie marine** : Application des sciences biologiques et technologiques aux organismes marins pour produire des biens et services.

**Bioprospection** : Exploration de la biodiversité pour découvrir des composés bioactifs ou des gènes d'intérêt.

**Inhibiteurs PCR** : Substances pouvant interférer avec la réaction PCR et empêcher l'amplification correcte de l'ADN.

**Blast** : Outil bioinformatique permettant de comparer une séquence d'ADN avec des séquences référencées dans des bases de données.

**Alignement de séquences** : Procédé comparatif entre plusieurs séquences pour repérer les similarités ou les différences.

**Phylogénie / Arbre phylogénétique** : Représentation des relations évolutives entre espèces ou groupes biologiques.

**Codage génétique** : Système de correspondance entre les triplets de nucléotides (codons) et les acides aminés.

**Bases de données génétiques (ex : GenBank)** : Répertoires numériques d'informations sur les séquences génétiques d'organismes.

**Banques de gènes** : Collections organisées de matériel génétique conservé pour étude ou application.

**Consensus de séquences** : Séquence représentative construite à partir de plusieurs alignements, illustrant les régions conservées.

**Primers (amorces)** : Courtes séquences d'ADN utilisées pour amorcer la réplication lors d'une PCR.

**Mutations nucléotidiques** : Modifications ponctuelles dans une séquence d'ADN, pouvant affecter la fonction des gènes.

**Homologie de séquence** : Similarité entre séquences indiquant une origine évolutive commune.

**Écosystème marin** : Ensemble dynamique d'organismes marins interagissant avec leur environnement (eau, fond, lumière, etc.).

**Biodiversité** : Variété des formes de vie dans un milieu donné, incluant les gènes, les espèces et les écosystèmes.

**Réseau trophique** : Représentation des relations alimentaires entre les organismes d'un écosystème.

**Espèce endémique** : Espèce présente uniquement dans une région géographique limitée.

**Espèce invasive** : Espèce introduite dans un nouveau milieu où elle se développe rapidement au détriment des espèces locales.

**Pollution marine** : Introduction de substances nocives dans les milieux marins, impactant les écosystèmes.

**Acidification des océans** : Baisse du pH des océans due à l'absorption du CO<sub>2</sub> atmosphérique, affectant la faune marine.

**Zone côtière** : Interface entre la terre et la mer, riche en biodiversité mais vulnérable aux activités humaines.

**Changement climatique** : Modification durable du climat ayant des impacts majeurs sur les écosystèmes marins.

**Surpêche** : Prélèvement excessif de poissons par rapport à leur capacité de renouvellement.

**Eutrophisation** : Enrichissement excessif d'un milieu en nutriments, provoquant une prolifération d'algues nuisibles.

**Habitat benthique** : Zone de vie située au fond des mers et océans, abritant une faune spécifique.

**Récif corallien** : Structure calcaire formée par les coraux, très riche en biodiversité.

**Nutriments** : Substances chimiques nécessaires à la croissance des organismes vivants.

**Salinité** : Teneur en sels dissous dans l'eau de mer.

**Température de surface de la mer (SST)** : Température mesurée à la surface des océans, indicateur climatique important.

**Endémisme** : Fait qu'une espèce ne se trouve que dans une zone géographique précise et nulle part ailleurs.

**Electrophorèse sur gel d'agarose** : Technique utilisée pour séparer des fragments d'ADN selon leur taille en les faisant migrer dans un gel sous l'effet d'un courant électrique.

**Biomatériau** : Matériau d'origine biologique utilisé en médecine ou en ingénierie tissulaire.

**Bioturbation** : Processus de remaniement des sédiments marins par des organismes vivants (ex : holothuries).

**Calice** : Cavité ou structure contenant un polype chez les coraux et gorgones.

**Chondrosine** : Protéine spécifique de l'éponge *Chondrosia reniformis* ayant des propriétés antitumorales.

**Cnidaria** : Embranchement regroupant les méduses, coraux, anémones et gorgones, possédant des cellules urticantes (cnidocytes).

**Collagène fibrillaire** : Type de collagène formé de fines fibres, conférant solidité et élasticité aux tissus.

**Demospongiae** : Classe la plus diversifiée d'éponges marines, souvent souples.

**Détritivore** : Organisme se nourrissant de matière organique en décomposition.

**Diterpènes (eunicellane, cladiellane)** : Composés organiques produits par certaines espèces marines, aux propriétés bioactives.

**Échinodermes (Echinodermata)** : Embranchement regroupant des animaux marins à symétrie radiale (ex : étoiles de mer, oursins, holothuries).

**Espèce ingénieur** : Espèce modifiant activement son environnement, créant ou maintenant des habitats pour d'autres espèces.

**Fibrillaire** : Relatif à des fibres fines (ex : structure du collagène).

**Nutraceutique** : Aliment ou molécule naturelle ayant un effet bénéfique sur la santé, à mi-chemin entre nutrition et médicament.

**Papilles coniques** : Petites excroissances en forme de cône sur le tégument de certains animaux marins.

**Polypes** : Unité vivante des coraux et gorgones, généralement fixée et entourée de tentacules.

**Porifera** : Embranchement des éponges, organismes aquatiques filtrants à structure poreuse.

**Spicules** : Éléments de soutien minéraux formant le squelette de nombreuses éponges (absents chez *Chondrosia*).

**Saponines triterpéniques** : Composés naturels aux propriétés tensioactives, cytotoxiques et antifongiques, souvent extraits de plantes ou d'animaux marins.

**Substrat dur / meuble** : Support physique sur lequel les organismes marins s'installent (dur = roche, meuble = sable/vase).

**Suspensionniste** : Organisme se nourrissant de particules en suspension dans l'eau par filtration.

**Aphia ID** : Identifiant unique attribué par la base de données taxonomique WoRMS (World Register of Marine Species).

**Aglycone** : Partie non glucidique d'une molécule glycosidique, souvent à activité biologique.

**Amphiphile** : Molécule possédant à la fois une partie hydrophile (affinité pour l'eau) et hydrophobe (affinité pour les lipides).

**Autozoïde** : Polype fonctionnel d'une colonie de corail, chargé de l'alimentation.

**Bioindicateur** : Organisme vivant servant à évaluer l'état d'un environnement ou la présence de polluants.

**Bioactivité** : Capacité d'une substance à interagir avec un organisme vivant pour produire un effet spécifique.

**Écotoxicologie** : Science étudiant les effets des polluants sur les écosystèmes.

**Équinatoxines (EqT)** : Toxines produites par *Actinia equina* aux effets cytotoxiques puissants.

**Glycosaminoglycanes (GAG)** : Polymères glucidiques sulfatés présents dans les tissus conjonctifs.

**Glycoside** : Molécule composée d'un sucre lié à un autre composé non sucré (aglycone).

**Itéropare** : Se dit d'un organisme pouvant se reproduire plusieurs fois au cours de sa vie.

**Lectines** : Protéines capables de se lier spécifiquement à certains glucides, souvent impliquées dans la reconnaissance cellulaire.

**Mucus** : Sécrétion visqueuse riche en glycoprotéines produite par divers invertébrés marins.

**Peptides antimicrobiens (AMP)** : Courtes chaînes d'acides aminés possédant une activité contre bactéries, virus ou champignons.

**Polysaccharides sulfatés** : Polymères glucidiques contenant des groupes sulfates, souvent bioactifs.

**Saponines** : Glycosides naturels aux propriétés tensioactives, souvent bioactives.

**Stéroïdes** : Composés lipidiques dérivés du stéroïde, constituants des membranes cellulaires ou hormones.

**Symbiose** : Interaction biologique durable entre deux organismes, bénéfique pour l'un ou les deux.

**Taxinomie** : Science de la classification des êtres vivants.

**Tentacules pennés** : Tentacules en forme de plume, typiques des octocoralliaires.

**Centrifugation** : Technique de séparation des composants d'un mélange en fonction de leur densité à l'aide d'une force centrifuge.

**Chromatographie sur couche mince (CCM ou TLC)** : Méthode de séparation de composés sur une plaque recouverte d'un adsorbant ; les composés se déplacent à différentes vitesses selon leur affinité pour la phase stationnaire.

**Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)** : Technique analytique utilisée pour séparer, identifier et quantifier les composants d'un mélange à l'aide d'une phase mobile liquide sous haute pression et d'une colonne stationnaire.

**Colorimétrie** : Méthode de quantification basée sur l'intensité de la couleur d'une solution, souvent utilisée pour doser des protéines, sucres, etc.

**Dialyse** : Technique de séparation par diffusion à travers une membrane semi-perméable pour éliminer les petites molécules.

**Électrophorèse sur gel** : Technique de séparation des macromolécules (ADN, ARN, protéines) selon leur taille ou leur charge électrique dans un gel sous champ électrique.

**Extraction liquide-liquide** : Méthode de séparation basée sur la différence de solubilité d'un composé dans deux phases liquides non miscibles (souvent eau/solvant organique).

**Lyophilisation** : Technique de séchage par congélation et sublimation sous vide, permettant de conserver les biomolécules sans altération.

**Spectroscopie UV-Visible** : Technique basée sur l'absorption de lumière dans l'ultraviolet ou le visible pour détecter ou quantifier des composés.

**Spectroscopie infrarouge (IR)** : Technique permettant d'identifier les groupes fonctionnels présents dans une molécule à partir de ses vibrations moléculaires.

**Spectrométrie de masse (MS)** : Méthode permettant de mesurer la masse des molécules et d'identifier leur structure en les ionisant et en analysant leur rapport masse/charge.

**RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)** : Technique permettant d'obtenir des informations sur la structure atomique d'une molécule en analysant le comportement de certains noyaux (comme le proton) dans un champ magnétique.

**Test de cytotoxicité (ex : MTT, Trypan blue)** : Expériences in vitro mesurant l'effet toxique d'une molécule sur des cellules vivantes.

**Aliquotage** : Action de diviser un échantillon en portions homogènes appelées « aliquotes », afin d'en conserver une partie pour analyses futures, souvent dans des piluliers ou tubes Falcon.

**Appareillage SCUBA** : Ensemble d'équipements nécessaires à la plongée autonome, incluant bouteille d'air, détendeur, gilet stabilisateur, combinaison, masque et palmes.

**Carboglace** : Dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) à l'état solide, utilisé pour maintenir des températures très basses pendant le transport des échantillons sensibles à la chaleur, comme ceux destinés à des analyses génétiques.

**Paramètres physico-chimiques** : Ensemble de variables mesurées dans l'eau (température, salinité, pH, etc.) qui influencent le métabolisme des organismes marins.

**pH** : Indice mesurant l'acidité ou la basicité d'un milieu. Le pH de l'eau de mer est généralement alcalin (environ 8,1 à 8,3).

**Plongée scientifique** : Activité de plongée autonome réalisée dans un cadre de recherche, nécessitant des protocoles rigoureux pour l'observation et la collecte d'échantillons.

**PSU (Practical Salinity Unit)** : Unité standard utilisée pour exprimer la salinité de l'eau de mer, équivalente à une concentration en grammes de sel par kilogramme d'eau.

**Stockage cryogénique** : Conservation à très basse température (généralement à -80 °C ou dans l'azote liquide) pour préserver les propriétés biologiques et moléculaires des échantillons.

**Organismes sessiles** : Espèces fixes sur un substrat, comme les éponges ou les gorgones.

**Organismes encroûtants** : Espèces croissant en s'étalant sur des surfaces dures.

**Organismes mobiles** : Espèces capables de se déplacer comme les holothuries.

**Éviscération** : Réaction de stress chez certaines holothuries consistant à expulser leurs organes internes.

**WoRMS (World Register of Marine Species)** : Base de données taxonomique mondiale des espèces marines.

**DORIS** : Base française d'identification des espèces marines pour la faune et flore subaquatique.

**Dégradation post-mortem** : Ensemble des processus biologiques et enzymatiques qui altèrent un échantillon après sa mort.

**Épibiontes** : Organismes vivant fixés à la surface d'autres organismes marins (ex. algues sur une coquille).

**Dessiccateur** : Boîte hermétique contenant un agent déshydratant, utilisée pour stocker des échantillons à l'abri de l'humidité.

**PCR (Polymerase Chain Reaction)** : Technique de biologie moléculaire permettant d'amplifier une séquence spécifique d'ADN en de multiples copies.

**Barcoding ADN (code-barres ADN) :** Méthode d'identification des espèces basée sur la comparaison de courtes séquences génétiques standardisées.

**18S rRNA :** Gène codant pour l'ARN ribosomal 18S, largement utilisé comme marqueur moléculaire pour identifier les eucaryotes (animaux, plantes, algues, etc.).

**CTAB (Cetrimonium Bromide) :** Réactif utilisé dans une méthode d'extraction d'ADN permettant d'éliminer les polysaccharides et inhibiteurs de PCR.

**Amorces (ou primers) :** Courtes séquences d'ADN synthétiques qui amorcent la réplication de l'ADN lors de la PCR.

**Nucléotides :** Composants de base de l'ADN et de l'ARN, composés d'une base azotée, d'un sucre et d'un groupement phosphate.

**Taq polymérase :** Enzyme thermostable utilisée dans la PCR pour synthétiser de nouveaux brins d'ADN à partir des amorces.

**Code-barres génétique universel :** Région génétique standardisée utilisée pour l'identification moléculaire de tous les êtres vivants (ex. : 18S, COI, ITS).

**Marqueur génétique :** Séquence spécifique d'ADN utilisée pour différencier ou identifier des espèces, des populations ou des individus.

**.ab1 :** Format de fichier contenant les données brutes de séquençage générées par les analyseurs génétiques de type Sanger.

**A260/A280 :** Rapport d'absorbance mesurant la pureté de l'ADN ; un ratio d'environ 1.8 est indicatif d'un ADN relativement pur sans contamination protéique.

**Amplicon :** Fragment d'ADN obtenu après amplification par PCR.

**BigDye Terminator v3.1 :** Kit de séquençage basé sur la méthode de Sanger, utilisant des ddNTPs marqués par fluorescence.

**Bootstrap :** Méthode statistique d'évaluation de la robustesse des branches dans un arbre phylogénétique.

**COI (Cytochrome c oxidase subunit I) :** Gène mitochondrial couramment utilisé pour l'identification des espèces animales (barcoding ADN).

**ddNTPs (Didésoxynucléotides) :** Nucléotides modifiés qui provoquent l'arrêt de l'élongation de l'ADN lors du séquençage Sanger.

**DynaBeads :** Billes magnétiques utilisées pour purifier des produits d'ADN ou d'ARN, ici pour le nettoyage post-séquençage.

**GenBank :** Base de données publique contenant des millions de séquences génétiques, maintenue par le NCBI.

**POP7 Polymer :** Polymère utilisé comme matrice dans l'électrophorèse capillaire pour séparer les fragments d'ADN.

**Réactif de Folch :** Mélange chloroforme/méthanol (2:1) utilisé pour l'extraction des lipides.

**Réactif de Liebermann-Burchard :** Réactif colorimétrique pour la détection des saponines ou stéroïdes.

**Réactif de Dubois :** Mélange d'acide phénol-sulfurique utilisé pour révéler les sucres.

**Peptides antimicrobiens :** Courtes chaînes d'acides aminés capables de tuer ou d'inhiber la croissance des micro-organismes.

**Polysaccharides** : Macromolécules glucidiques formées de plusieurs unités de sucres simples (oses), avec des rôles structuraux ou énergétiques.

**Groupe hydroxyle (O-H)** : Fonction chimique caractéristique des alcools et des sucres.

**Groupe carboxyle (C=O)** : Fonction présente dans les acides, détectée par FTIR.

**Glycosidique (liaison)** : Liaison covalente entre deux molécules de sucre.

**Mucopolysaccharide** : Terme désignant des polysaccharides complexes contenant des groupements aminés ou acides, souvent présents dans les matrices extracellulaires.

**Fucosane sulfaté** : Polysaccharide sulfaté à base de fucose, retrouvé chez les holothuries (concombres de mer).

**Détritivore** : Organisme se nourrissant de matière organique en décomposition, comme *H. tubulosa*.

**Suspensivore** : Organisme filtrant les particules alimentaires en suspension dans l'eau, comme *E. singularis*.

**Acide gallique** : Composé phénolique utilisé comme standard dans le dosage des polyphénols totaux.

**Éviscération** : Réaction de stress chez certaines holothuries consistant à expulser leurs organes internes.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : Pourcentage

≥ : Supérieur ou égal à

°C : Degré Celsius

**16S** : Petite sous-unité ribosomique 16S

**18S** : Petite sous-unité ribosomique 18S

**A260/A230** : Rapport d'absorbance à 260 nm et 230 nm

**A260/A280** : Rapport d'absorbance à 260 nm et 280 nm

**ABTS** : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique)

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**AGPI** : Acides Gras Polyinsaturés

**AOR** : Alcyonium digitatum

**APHA** : American Public Health Association

**APS** : Agence de Presse Algérienne

**ARN** : Acide Ribonucléique

**ARNr** : Acide Ribonucléique ribosomique

**BANBIOM** : Base de données Nationale de la Biodiversité Marine

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**BOLD** : Barcode of Life Data system

**bp** : Paires de bases

**C** : *Holothuria tubulosa*

**C-H** : Liaison Carbone-Hydrogène

**C-O** : Liaison Carbone-Oxygène

**C=O** : Liaison Carbone-Oxygène double

**C. reniformis** : *Chondrosia reniformis* (Éponge)

**CaSO<sub>4</sub>** : Sulfate de Calcium

**CC** : Chromatographie sur Colonne

**CD** : Dichroïsme Circulaire

**CH<sub>3</sub>OH** : Méthanol

**CI<sub>50</sub>** : Concentration Inhibitrice à 50%

**cm** : Centimètre

**cm<sup>-1</sup>** : Nombre d'onde (spectroscopie)

**CM** : Concombre de Mer (*Holothuria tubulosa*)

**CM1-CM4** : Fractions chromatographiques du Concombre de Mer

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone  
**COI** : Cytochrome c Oxydase sous-unité I  
**COX-1/2** : Cyclooxygénase-1/2  
**CRX** : Chondrosia reniformis  
**Crx** : Chondrosia reniformis (dans les analyses)  
**CTAB** : Bromure de Cétyltriméthylammonium  
**ddNTP** : Didésoxynucléotide triphosphate  
**dNTP** : Désoxynucléotide triphosphate  
**DO** : Densité Optique  
**DPPH** : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl  
**E. singularis** : Eunicella singularis (Gorgone blanche)  
**EAG** : Équivalent Acide Gallique  
**EDTA** : Acide Éthylène Diamine Tétracétique  
**EO** : Paracentrotus lividus  
**EqT** : Équinatoxines  
**ESSBO** : École Supérieure des Sciences Biologiques d'Oran  
**FAO** : Food and Agriculture Organization  
**FASTA** : Format de données de séquence  
**FCS** : Fucosylated Chondroitin Sulfate  
**FRAP** : Pouvoir Antioxydant de Réduction du Fer  
**FTIR** : Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier  
**g** : Gramme  
**g/L** : Grammes par litre  
**GAG** : Glycosaminoglycanes  
**GB** : Eunicella verrucosa  
**GCS** : Glycosaminoglycanes Sulfatés  
**GOR A** : Eunicella singularis (Ain Beniane)  
**GOR T** : Eunicella singularis (Béni Saf)  
**Gor** : Gorgone (Eunicella singularis dans les analyses)  
**H.** : Holothuria  
**H. tubulosa** : Holothuria tubulosa (Concombre de mer)  
**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Acide Sulfurique  
**H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>** : Acide Borique  
**h** : Heure  
**HPLC** : Chromatographie Liquide Haute Performance

**HRMS** : Spectrométrie de Masse à Haute Résolution

**ID** : Identifiant

**IL-6** : Interleukine-6

**iNOS** : Oxyde Nitrique Synthase inductible

**INSTM** : Institut National de Sciences et Technologies de la Mer

**IR** : Spectroscopie Infrarouge

**K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>** : Sulfate de Potassium

**km** : Kilomètre

**LC-MS** : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse

**LC-MS/MS** : Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse en Tandem

**LPS** : Lipopolysaccharide

**m** : Mètre

**M** : Molaire

**MAT** : Matières Azotées Totales

**MD** : Alcyonium acaule

**MEGA** : Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**mg** : Milligramme

**mg/L** : Milligrammes par litre

**MgCl<sub>2</sub>** : Chlorure de Magnésium

**min** : Minute

**mL** : Millilitre

**mM** : Millimolaire

**mm** : Millimètre

**MS** : Spectrométrie de Masse

**MS/MS** : Spectrométrie de Masse en Tandem

**MTT** : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide

**N-H** : Liaison Azote-Hydrogène

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** : Carbonate de Sodium

**NaCl** : Chlorure de Sodium

**NaOH** : Hydroxyde de Sodium (Soude)

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**ng** : Nanogramme

**NH<sub>3</sub>** : Ammoniac

**nm** : Nanomètres

**NO** : Oxyde Nitrique

**NOAA** : National Oceanic and Atmospheric Administration

**O-H** : Liaison Oxygène-Hydrogène

**P<sub>0</sub>** : Poids initial (ballon vide)

**P<sub>1</sub>** : Poids final (ballon + extrait)

**pb** : Paires de bases

**PCR** : Polymerase Chain Reaction (Réaction en Chaîne par Polymérase)

**PGE<sub>2</sub>** : Prostaglandine E<sub>2</sub>

**pH** : Potentiel Hydrogène

**POP7** : Performance Optimized Polymer 7

**ppm** : Parties par million

**PSU** : Practical Salinity Unit

**psu** : Practical Salinity Unit (Unité Pratique de Salinité)

**RMN** : Résonance Magnétique Nucléaire

**RMN 1D** : Résonance Magnétique Nucléaire Unidimensionnelle

**RMN 2D** : Résonance Magnétique Nucléaire Bidimensionnelle

**rpm** : Révolutions par minute

**S=O** : Liaison Soufre-Oxygène double

**SCUBA** : Self-Contained Underwater Breathing Apparatus

**SDS-PAGE** : Électrophorèse sur Gel de Polyacrylamide en présence de Dodécylsulfate de Sodium

**Se** : Sélénium

**SRB** : Sulforhodamine B

**T°C** : Température en degrés Celsius

**TAE** : Tris-Acétate-EDTA

**Taq** : *Thermus aquaticus*

**TBARS** : Substances Réactives à l'Acide Thiobarbiturique

**TE** : Tris-EDTA

**TM** : *Actinia equina*

**TNF- $\alpha$**  : Facteur de Nécrose Tumorale alpha

**tr/min** : Tours par minute

**UHPLC** : Chromatographie Liquide Ultra-Haute Performance

**UNEP/MAP** : United Nations Environment Programme/Mediterranean Action Plan

**UV** : Ultraviolet

**V** : Volt

**v/v** : Volume/Volume

**V<sub>0</sub>** : Volume initial

**V<sub>1</sub>** : Volume de titrant consommé

**WoRMS** : World Register of Marine Species

**XTT** : 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide

**Y** : Prise d'essai

**µg** : Microgramme

**µL** : Microlitre

# TABLE DES MATIÈRES

Remerciements

Dédicace

Liste des figures

Liste des tableau

Fiche d'espèce

Glossaire

Liste des abréviations

Table des matières

<b>Introduction Générale</b> .....	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>4</b>
1 Contexte écologique et biodiversité marine en Algérie.....	5
1.1 La côte Algérienne : Caractéristiques géographiques et écologiques .....	5
1.2 La biodiversité marine en Algérie.....	5
1.3 Contribution des bases de données génétiques à la préservation des espèces marines .....	6
2 Invertébrés marins et biomolécules : Diversité et intérêt biotechnologique .....	7
2.1 Introduction aux invertébrés marins en biotechnologie .....	7
2.1.1 Définition des invertébrés marins et classification .....	7
2.1.2 Importance des invertébrés marins dans la biotechnologie : sources de biomolécules bioactives.....	8
2.2 Groupes étudiés : échinodermes, cnidaires, mollusques, éponges .....	8
2.2.1 Éponges ( <i>Porifera</i> ).....	8
2.2.2 Cnidaires ( <i>Cnidaria</i> ).....	9
2.2.3 . Mollusques ( <i>Mollusca</i> ) .....	9
2.2.4 Échinodermes ( <i>Echinodermata</i> ).....	9
2.3 Écologie et habitats des groupes étudiés .....	9
2.4 Espèces Marines Étudiées .....	10
3 Biomolécules marines : Potentiel biotechnologique et applications.....	19
4 Évaluation fonctionnelle et biologique des biomolécules : Approches par Bioessais...	21
4.1 Différents types de bioessais en pratique courante.....	21
4.2 Approche intégrée de criblage biologique et dérégulation rapide des extraits naturels .....	22
4.3 Le processus de caractérisation des biomolécules marines : de l'échantillon aux bioessais .....	23

## **CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT ..... 24**

1	Matériel.....	25
2	Méthodes .....	25
2.1	Choix et présentation des sites d'échantillonnage.....	25
2.1.1	Critères de sélection des sites .....	25
2.1.2	Site d'Aïn Beniane.....	25
2.1.3	Site de Béni Saf.....	26
2.2	Conditions environnementales et opérationnelles .....	27
2.2.1	Conditions météorologiques.....	27
2.2.2	Paramètres physico-chimiques In situ.....	27
2.3	Méthodologie d'échantillonnage en plongée SCUBA .....	27
2.3.1	Procédures de plongée et sécurité .....	27
2.3.2	Techniques de collecte .....	27
2.3.3	Identification préliminaire In situ et Ex situ .....	27
2.3.4	Spécificités par espèce .....	28
2.4	Prétraitement et conditionnement des échantillons .....	28
2.4.1	Prétraitement immédiat <i>Post</i> -collecte .....	28
2.4.2	Conditionnement pour analyses génétiques .....	28
2.4.3	Conditionnement pour analyses biochimiques.....	29
2.4.4	Étiquetage et Traçabilité .....	30
3	Analyse critique des protocoles de terrain.....	30
3.1	Bilan de l'échantillonnage et stratégies de conditionnement .....	30
3.2	Analyse critique des méthodes d'échantillonnage et de conservation .....	32
4	Conclusion : Bilan des opérations de terrain et fondations analytiques .....	33

## **CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES..... 34**

1	Matériel.....	35
2	Méthodes .....	36
2.1	Extraction de l'ADN génomique .....	36
2.1.1	Extraction ADN en utilisant le kit AIONA.....	36
2.1.2	Extraction ADN en utilisant le protocole CTAB optimisé .....	37
2.2	Contrôle qualité et quantification de l'ADN.....	39
2.3	Amplification du gène de l'ARNr 18S et COI.....	39
2.3.1	Les gènes de l'ARNr 18S et du cytochrome c oxydase sous-unité I (COI) ont été amplifiés par PCR.....	39

2.3.2	PCR.....	40
2.3.2.1	Mélange réactionnel (volume total : 25 µL) .....	40
2.3.2.2	Conditions de cyclage thermique (Thermocycleur Applied Biosystems™ SimpliAmp™).....	41
2.4	Purification des produits PCR .....	41
2.5	Contrôle qualité des produits PCR .....	41
2.6	Réactions de séquençage BigDye .....	41
2.7	Purification des produits de séquençage.....	42
2.8	Séquençage et contrôle qualité.....	42
2.9	Analyse bioinformatique préliminaire.....	42
3	Résultats génétiques .....	43
3.1	Extraction et contrôle qualité de l'ADN génomique.....	43
3.2	Amplification par PCR du gène ARNr 18S et COI.....	44
3.3	Séquençage et Analyse Bioinformatique.....	45
3.3.1	Résultats du Séquençage et Identification Moléculaire .....	45
3.3.2	Synthèse et interprétations .....	50
4	Conclusion et perspectives .....	51
4.1	Analyse critique de l'approche .....	51
4.2	Contraintes et inconvénients.....	52
4.3	Perspectives .....	52
<b>Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins .....</b>		<b>53</b>
1	Introduction.....	54
2	Matériels et Méthodes.....	54
2.1	Matériel .....	54
2.2	Extraction et Quantification des Lipides .....	54
2.3	Détermination des Matières Azotées Totales (MAT).....	55
2.4	Extraction des Saponines.....	57
2.4.1	Afin de mieux visualiser les différentes étapes réalisées en laboratoire, voici un schéma illustrant le protocole en Fig 16.....	58
2.5	Extraction des polysaccharides totaux et des pigments.....	59
2.6	Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu.....	61
2.7	Caractérisation spectrale par FTIR des polysaccharides extraits .....	61
2.8	Séparation des Pigments par Chromatographie sur Colonne .....	61
2.9	Évaluation de l'Activité Antioxydante par Test DPPH .....	62
3	Résultats et Discussion .....	63
3.1	Teneur en Lipides.....	63

3.1.1	Résultats Analytiques.....	63
3.1.2	Discussion.....	63
3.2	Matières Azotées Totales (MAT).....	63
3.2.1	Résultats Analytiques.....	63
3.2.2	Discussion.....	64
3.3	Caractérisation Spectrale par FTIR des extraits de polysaccharides marins.....	65
3.3.1	Rendements d'extraction.....	65
3.3.2	Analyse Spectroscopique FTIR.....	65
3.3.3	Détermination du Type de Polysaccharides et Implications.....	67
3.3.4	Contexte Écologique et Conditions d'Échantillonnage.....	67
3.4	Dosage des Polyphénols Totaux dans les Extraits de Saponines.....	68
3.4.1	Courbe d'Étalonnage de l'Acide Gallique.....	68
3.4.2	Résultats d'Absorbance et Concentrations en Polyphénols Totaux.....	68
3.4.3	Interprétation des Résultats.....	68
3.5	Séparation des Pigments par Chromatographie sur Colonne.....	69
3.5.1	Analyse des Profils Chromatographiques.....	69
3.5.2	Implications Écologiques et Fonctionnelles.....	72
3.6	Activité Antioxydante par Test DPPH.....	72
3.6.1	Résultats.....	73
3.6.2	Interprétation des Résultats.....	74
4	Conclusion Générale.....	75
	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>76</b>
	<b>Références Bibliographiques1</b>	

# **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

## Introduction Générale

---

Les océans, couvrant plus de 70 % de la surface terrestre, constituent le plus vaste écosystème de notre planète et abritent une biodiversité exceptionnelle. Cette immense richesse biologique marine représente près de 80 % de la biodiversité mondiale, avec des estimations suggérant l'existence de 700 000 à 1 million d'espèces marines, dont seulement 230 000 sont décrites (Mora et al., 2011; Appeltans et al., 2012). Cette diversité taxonomique s'accompagne d'une remarquable diversité chimique et fonctionnelle, résultat de millions d'années d'évolution et d'adaptation à des environnements variés et souvent extrêmes (Jaspars et al., 2016). Les organismes marins ont ainsi développé des stratégies biochimiques uniques pour survivre dans ces milieux, produisant une vaste gamme de molécules aux structures et propriétés biologiques souvent sans équivalent terrestre (Blunt et al., 2018).

Parmi les écosystèmes marins les plus riches, la Méditerranée occupe une place particulière. Bien que ne représentant que 0,8 % de la surface océanique mondiale, elle abrite environ 17 000 espèces marines, soit 7,5 % de la biodiversité marine globale (Coll et al., 2010). Cette mer semi-fermée constitue un hotspot de biodiversité caractérisée par un taux d'endémisme élevé estimé à environ 20 % (Bianchi et Morri, 2000).

La côte méditerranéenne algérienne, s'étendant sur près de 2 148 km (INCT, 2021), interface cruciale entre l'Afrique du Nord et la Méditerranée occidentale, héberge une biodiversité marine riche mais encore insuffisamment explorée (Grimes et al., 2018). Cependant, cette biodiversité fait face à des menaces croissantes : changement climatique, pollution, surexploitation des ressources, destruction des habitats et introduction d'espèces invasives (Halpern et al., 2015). Ces pressions anthropiques entraînent une érosion accélérée de la biodiversité marine, avec des conséquences potentiellement irréversibles sur le fonctionnement des écosystèmes et les services qu'ils fournissent (Worm et al., 2006). Dans ce contexte, la documentation et la valorisation durable de cette biodiversité deviennent des priorités scientifiques et sociétales majeures, particulièrement dans les régions comme l'Algérie où le potentiel biotechnologique marin reste largement inexploré.

La biotechnologie marine, définie comme l'application des méthodes scientifiques et d'ingénierie à l'utilisation des organismes marins pour fournir des biens et services (OCDE, 2013), représente justement un secteur en pleine expansion à l'échelle mondiale. Le marché global des produits dérivés de la biotechnologie marine était estimé à 4,8 milliards de dollars en 2020 et devrait atteindre 9,1 milliards d'ici 2030 (Grand View Research, 2021). Cette croissance est alimentée par la demande croissante de nouvelles molécules bioactives dans divers secteurs industriels. Les invertébrés marins, notamment les éponges, les cnidaires et les échinodermes, constituent des sources particulièrement prometteuses de biomolécules d'intérêt, ayant développé au cours de l'évolution des stratégies chimiques uniques de défense et d'adaptation (Leal et al., 2020). Les molécules issues de ces adaptations présentent des structures chimiques originales et des activités biologiques puissantes dans divers domaines thérapeutiques et industriels (Blunt et al., 2018; Carroll et al., 2020). La valorisation de ces biomolécules marines s'inscrit dans une démarche de "chimie bleue", visant à développer des procédés respectueux de l'environnement et économiquement viables (Greco et Cinquegrani, 2016), en accord avec les principes de l'économie circulaire et du développement durable.

Cependant, la valorisation biotechnologique des ressources marines repose fondamentalement sur une identification précise et fiable des espèces sources. Or, l'identification taxonomique basée uniquement sur des critères morphologiques présente d'importantes limites (Knowlton, 1993). De nombreux invertébrés marins présentent en effet une plasticité phénotypique considérable ou appartiennent à des complexes d'espèces cryptiques (Pante et al., 2015), ce qui peut conduire à des erreurs d'identification compromettant la reproductibilité des recherches et la traçabilité des ressources exploitées (Wares et al., 2001; Bucklin et al., 2011).

## Introduction Générale

---

Face à ces défis, les outils moléculaires se sont imposés comme une approche essentielle pour une identification taxonomique fiable (Hebert et al., 2003). Cette méthode, basée sur le séquençage d'une séquence standardisée d'ADN (Ratnasingham et Hebert, 2007), permet non seulement une identification précise des espèces mais aussi une meilleure traçabilité des ressources biologiques, une conservation efficace des espèces, en particulier celles qui sont menacées, et la découverte de biodiversité cryptique.

En Algérie, où la biodiversité marine reste insuffisamment documentée au niveau génétique, l'établissement de telles références moléculaires constitue une étape fondamentale pour le développement d'une biotechnologie marine durable et responsable (Radulovici et al., 2010).

Ainsi, ce travail s'inscrit dans une démarche intégrée visant à concilier exploration biotechnologique et conservation de la biodiversité marine méditerranéenne, en s'appuyant sur les outils les plus modernes de biologie moléculaire pour garantir une exploitation durable de ces ressources exceptionnelles.

La présente étude s'inscrit dans une démarche interdisciplinaire, à l'interface entre biologie marine, génie génétique, biologie moléculaire, biochimie et biotechnologie. Elle vise à établir un modèle d'approche intégrée pour la valorisation des ressources marines algériennes, combinant rigueur scientifique, innovation technologique et préoccupations environnementales.

La question de ce travail peut être formulée ainsi : Comment l'intégration de l'identification génétique et d'une caractérisation biochimique générale d'un échantillon d'espèces représentatif d'invertébrés marins de la côte algérienne, peut-elle permettre d'évaluer leur potentiel biotechnologique global et de contribuer à l'élaboration de stratégies de valorisation?

Pour répondre à cette question, la démarche entreprise dans le cadre de ce travail de recherche s'articule comme suit :

1. Échantillonnage ciblé et identification taxonomique : Procéder à l'échantillonnage d'invertébrés marins dans deux sites de la cote algérienne, en se concentrant sur des espèces présentant un intérêt potentiel pour la valorisation biotechnologique.
2. Optimisation des protocoles d'extraction d'ADN et de biomolécules : Optimiser des protocoles d'extraction d'ADN et des différentes classes de biomolécules (polysaccharides, lipides, protéines, polyphénols, pigments, saponines) spécifiquement adaptés aux tissus marins, afin d'assurer une qualité et une quantité optimales pour les analyses ultérieures.
3. Caractérisation génétique : Réaliser la caractérisation génétique des espèces sélectionnées (séquençage de marqueurs génétiques pertinents), afin de confirmer leur identité et d'explorer leur diversité génétique.
4. Caractérisation biochimique générale et évaluation du potentiel : Effectuer une caractérisation biochimique générale des extraits pour déterminer la teneur en diverses classes de biomolécules (polysaccharides, lipides, protéines, polyphénols, pigments, saponines) et évaluer leur potentiel biotechnologique global à travers des tests d'activités biologiques (notamment antioxydante, antimicrobienne) et des analyses physico-chimiques.

# **CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

# CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 Contexte écologique et biodiversité marine en Algérie

### 1.1 La côte Algérienne : Caractéristiques géographiques et écologiques

Le littoral algérien, s'étendant sur près de 2 148 km le long de la rive sud de la Méditerranée occidentale, constitue une interface géographique et écologique d'une richesse et d'une complexité remarquables (APS, 2023). Cette bande côtière, encadrée au nord par la mer Méditerranée et au sud par les chaînes montagneuses de l'Atlas Tellien et des Aurès, présente une grande variété de formations naturelles incluant falaises, plages sableuses et zones humides littorales. La diversité de ses paysages résulte de la combinaison entre la géologie régionale et les dynamiques marines locales, donnant naissance à une pluralité d'habitats marins essentiels (UNEP/MAP, 2019). Ces écosystèmes sont influencés par des facteurs environnementaux tels que la température, la salinité, les courants marins (comme le courant algérien qui longe la côte d'ouest en est), ainsi que les apports d'eau douce et de nutriments via les oueds, jouant tous un rôle crucial dans leur fonctionnement (Plan Bleu, 2019).



**Figure 1.** Localisation géographique du littoral algérien (Google Earth Pro, 2025)

### 1.2 La biodiversité marine en Algérie

Les eaux marines algériennes se distinguent par une biodiversité exceptionnelle, due à la variété des habitats côtiers et à leur emplacement stratégique dans le bassin occidental de la Méditerranée (Grimes et al, 2004). Cette biodiversité couvre un large éventail d'espèces, allant du plancton aux grands animaux marins, avec une importance particulière des invertébrés benthiques, essentiels au bon fonctionnement des écosystèmes marins. Une campagne récente d'inventaire a permis d'identifier 170 espèces réparties en plusieurs groupes taxonomiques, témoignant de la richesse faunistique du littoral algérien (Haddad et El Aihar, 2021).

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Cet inventaire met en lumière la prédominance de certains groupes : les Chordés (principalement les poissons) représentaient 42 % des espèces récoltées, suivis de près par les Mollusques (gastéropodes, bivalves, céphalopodes) avec 35 %. Les Arthropodes (crustacés notamment) comptaient pour 9 %, tandis que d'autres groupes importants comme les Cnidaires (coraux, anémones, méduses), les Échinodermes (oursins, étoiles de mer, holothuries), les Annélides (vers polychètes), les Spongiaires (éponges) et les Bryozoaires, bien que moins diversifiés en nombre d'espèces dans cette étude spécifique (représentant respectivement 5, 4, 2 et 1 %), n'en demeurent pas moins des composantes fondamentales de ces écosystèmes (Haddad et El Aihar, 2021).

Explorer cette richesse biologique, notamment celle des invertébrés, est essentiel pour mieux comprendre les dynamiques écologiques marines. Cette biodiversité est cependant fortement menacée par des pressions anthropiques et climatiques croissantes qui altèrent les écosystèmes marins. L'inventaire de Haddad et El Aihar (2021) a d'ailleurs identifié 5 espèces protégées par les conventions internationales (Berne, 1979; Barcelone, 1976) et la législation algérienne parmi les 170 recensées, soulignant l'urgence de la mise en place d'approches de conservation efficaces.

D'autre part, cette diversité biologique offre également des opportunités socio-économiques, en particulier pour la pêche traditionnelle et les activités écotouristiques. De plus, de nombreux organismes marins, en particulier les invertébrés sessiles ou peu mobiles comme les éponges, les gorgones ou les holothuries, sont connus pour produire une grande diversité de biomolécules aux propriétés pharmacologiques potentiellement intéressantes (polysaccharides, saponines, lipides, etc.), ouvrant des perspectives prometteuses en biotechnologie marine.

Une meilleure compréhension de cette biodiversité, notamment à l'échelle génétique, est donc un prérequis essentiel pour une gestion durable des ressources marines et la valorisation de leur potentiel.

### **1.3 Contribution des bases de données génétiques à la préservation des espèces marines**

La richesse de la biodiversité marine algérienne s'accompagne de nombreux défis, en particulier en matière d'identification des espèces et de suivi de leur diversité génétique. Les méthodes classiques basées sur la morphologie s'avèrent souvent insuffisantes, notamment pour les espèces cryptiques, polymorphes ou à stades précoces de développement (Hebert et al., 2003; Bucklin et al., 2011). De plus, ces approches ne permettent pas d'appréhender la variabilité génétique intra-population, essentielle pour comprendre les dynamiques évolutives et la résilience écologique (Frankham, 2005; Hughes et al., 2008).

Les outils moléculaires, et en particulier les bases de données génétiques telles que GenBank (NCBI, 2024) ou BOLD (Ratnasingham et Hebert, 2007), offrent une réponse efficace à ces limites. En associant des séquences d'ADN standardisées à des informations taxonomiques et géographiques validées, elles permettent une identification précise, même à partir de fragments d'organismes ou d'ADN environnemental (Ardura et al., 2010; Lopes et al., 2017). Ces systèmes sont également utiles pour étudier la structure et la connectivité des populations, orienter la gestion des ressources biologiques, et suivre l'impact des pressions anthropiques sur la diversité génétique (Palumbi, 2003; Allendorf et al., 2010).

En Algérie, l'importance de ces outils a conduit à la mise en place d'un projet de base de données nationale, souvent désignée par l'acronyme BANBIOM, soutenue par le Ministère de l'Enseignement Supérieur. Ce projet vise à centraliser les données sur environ 4 500 espèces marines, dont plus de 3 000 sont déjà documentées, en intégrant des aspects taxonomiques, écologiques et réglementaires. Interconnectée aux bases internationales, cette base renforce la

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

visibilité scientifique de la biodiversité algérienne et soutien des domaines stratégiques comme la biotechnologie marine et la valorisation pharmaceutique des biomolécules (BANBIOM, 2025).

### 2 Invertébrés marins et biomolécules : Diversité et intérêt biotechnologique

#### 2.1 Introduction aux invertébrés marins en biotechnologie

##### 2.1.1 Définition des invertébrés marins et classification

Les invertébrés marins constituent une catégorie incroyablement vaste et hétérogène d'organismes animaux dépourvus de colonne vertébrale, que l'on retrouve dans pratiquement tous les habitats océaniques, depuis les zones côtières peu profondes jusqu'aux profondeurs abyssales les plus extrêmes (Tyler et Young, 2003; Pechenik, 2015; Brusca et al., 2016). Ce groupe se caractérise par l'absence de colonne vertébrale, ce qui le distingue des vertébrés comme les poissons, les mammifères marins, les reptiles ou les oiseaux (Valentine et al., 1999; Nielsen, 2012).

En termes de classification, les invertébrés marins ne forment pas un groupe monophylétique, car ils n'incluent pas tous les descendants d'un ancêtre commun. Ils représentent néanmoins plus de 95 % des espèces animales connues, couvrant une grande diversité morphologique, fonctionnelle et écologique (Knoll et Carroll, 1999; Edgecombe et al., 2011 ; Romano et al., 2022).

Parmi les embranchements (phylums) les plus significatifs et souvent étudiés en sciences marines, sont cités dans le tableau 1.

**Tableau 1.** Principaux caractéristiques des groupes d'invertébrés marins étudiés en sciences marines

Groupe d'invertébrés marins	Caractéristiques principales	Références
Porifères (éponges)	Corps poreux filtrant l'eau pour se nourrir	Hooper et van Soest, 2002
Cnidaires (méduses, coraux, anémones)	Présence de cnidocytes (cellules spécialisées urticantes)	Cartwright et Collins, 2007 ; Daly et al., 2007
Mollusques (gastéropodes, bivalves, céphalopodes)	Grande variété morphologique	Haszprunar, 2000; Ponder et Lindberg, 2008
Annélides (principalement polychètes)	Vers segmentés, abondants dans les sédiments benthiques	Rouse et Pleijel, 2001
Arthropodes marins (crustacés)	Exosquelette chitineux, appendices articulés	Schram et Koenemann, 2004
Échinodermes (étoiles de mer, oursins, concombres de mer)	Symétrie radiale à l'état adulte	Mooi et David, 1997
Tuniciers (Urochordés) (ascidies)	Proches des vertébrés sur le plan phylogénétique malgré leur simplicité apparente	Delsuc et al., 2006; Satoh et al., 2014; Romano et al., 2022

Cette diversité biologique est le résultat de centaines de millions d'années d'évolution, durant lesquelles ces organismes ont colonisé des niches écologiques variées dans un environnement

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

marin souvent compétitif (Budd et Jensen, 2000 ; Erwin et al., 2011). Ce processus évolutif a permis le développement d'une multitude de stratégies adaptatives structurelles, écologiques et comportementales.

### 2.1.2 Importance des invertébrés marins dans la biotechnologie : sources de biomolécules bioactives

L'environnement marin, marqué par une forte compétition interspécifique, des pressions de prédation importantes et des conditions physico-chimiques parfois extrêmes, a favorisé l'émergence de mécanismes de défense chimique élaborés chez de nombreux invertébrés, en particulier ceux qui sont sessiles ou faiblement mobiles. Ces organismes produisent une grande variété de métabolites secondaires, souvent qualifiés de « produits naturels marins », qui ne participent pas directement aux fonctions métaboliques primaires telles que la croissance, le développement ou la reproduction, mais remplissent des rôles écologiques essentiels ; défense contre les prédateurs, compétition pour l'espace, communication chimique, protection contre les pathogènes ou les rayonnements UV (Leal et al., 2012; Mehbub et al., 2014 ; Blunt et al., 2018; Carroll et al., 2021 ; Romano et al., 2022) .

Ces composés révèlent fréquemment des propriétés biologiques remarquables qui suscitent un intérêt croissant dans le domaine de la recherche biomédicale et des biotechnologies (Jimeno et al., 2004; Molinski et al., 2009; Mayer et al., 2010; Carroll et al., 2021).

Les invertébrés marins sont ainsi considérés comme une ressource d'une richesse exceptionnelle, mais encore largement inexplorée, de molécules bioactives présentant un potentiel immense pour la découverte de nouveaux médicaments (anticancéreux, antibiotiques, antiviraux, anti-inflammatoires), de produits cosmétiques, de nutraceutiques, de biomatériaux (tels que le collagène ou les adhésifs), d'enzymes d'intérêt industriel, ou encore d'agents antifouling (Jimeno et al., 2004 ; Leal et al., 2012 ; Mehbub et al., 2014 ; Romano et al., 2022).

Il convient de souligner que, dans de nombreux cas, les véritables producteurs de ces métabolites secondaires ne sont pas les invertébrés eux-mêmes, mais des microorganismes symbiotiques (bactéries, champignons, micro-algues) associés à ces derniers. Néanmoins, l'invertébré hôte joue souvent un rôle crucial dans la régulation ou l'accumulation de ces substances (Piel, 2009 ; Thomas et al., 2010 ; Romano et al., 2022).

## 2.2 Groupes étudiés : échinodermes, cnidaires, mollusques, éponges

Parmi la grande diversité des invertébrés marins, certains groupes se sont distingués par leur production exceptionnelle de biomolécules présentant un grand potentiel pour la biotechnologie. Ces organismes marins constituent des réservoirs de composés bioactifs aux applications multiples dans les secteurs pharmaceutique, médical et industriel.

### 2.2.1 Éponges (*Porifera*)

Les éponges marines, parmi les animaux multicellulaires les plus anciens, sont particulièrement reconnues pour leur richesse en produits naturels. Ces organismes sessiles, dont la physiologie de filtration permet une interaction étroite avec leur environnement, ont été identifiés comme une source importante de métabolites bioactifs. En effet, des milliers de composés ont été isolés, montrant des propriétés anticancéreuses, antivirales, antifongiques et anti-inflammatoires (López-Legent et al., 2020; Paul et al., 2020).

Ces propriétés ont conduit à l'étude de ces molécules dans le développement de nouveaux traitements thérapeutiques. En outre, des études ont révélé que certains peptides extraits des éponges présentent des activités antioxydantes et immunomodulatrices intéressantes, ouvrant de nouvelles perspectives pour l'utilisation de ces organismes dans la biotechnologie (Robinson et al., 2019; Proksch et al., 2022).

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 2.2.2 Cnidaires (*Cnidaria*)

Les cnidaires, un groupe comprenant notamment les coraux, les anémones de mer, les méduses et les gorgones, sont reconnus comme une source importante de biomolécules bioactives. Ces organismes sont surtout connus pour leurs toxines, utilisées principalement pour la défense ou la capture de proies. Ces substances ont été étudiées pour leur potentiel en pharmacologie, notamment en tant qu'analgésiques et agents cardiovasculaires (Muller et al., 2018; He et al., 2021). Certaines molécules de cnidaires ont montré des propriétés antitumorales et anti-inflammatoires, ouvrant la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de diverses pathologies (Luo et al., 2020). Par ailleurs, des propriétés photoprotectrices ont été attribuées à certains composés produits par les cnidaires, en raison de leur capacité à filtrer ou à absorber les rayonnements UV (Kong et al., 2021).

### 2.2.3 . Mollusques (*Mollusca*)

Les mollusques marins, en raison de leur diversité biologique, sont une autre source importante de biomolécules d'intérêt. Parmi les plus étudiées figurent les conotoxines extraites des cônes marins. Ces peptides ont des propriétés neuro-actives puissantes, ce qui les rend très intéressants dans la recherche sur la gestion de la douleur, notamment pour le traitement des douleurs chroniques (Kim et al., 2019 ; Williams et al., 2021). De plus, des agents anticancéreux dérivés de certains opisthobranches marins ont montré un potentiel prometteur en oncologie (McClintock et al., 2020). L'étude des mollusques continue de dévoiler de nouvelles molécules, notamment pour les applications cosmétiques et nutraceutiques, grâce à leurs effets bénéfiques sur la peau et la santé (Vonnahme et al., 2021).

### 2.2.4 Échinodermes (*Echinodermata*)

Les échinodermes, tels que les étoiles de mer, les oursins et les concombres de mer (holothuries), produisent une variété de composés bioactifs ayant suscité un intérêt croissant. Parmi ceux-ci, les saponines, les stéroïdes et d'autres métabolites aux propriétés cytotoxiques, antifongiques, hémolytiques et immunostimulantes ont été largement étudiés.

Ces molécules sont prometteuses pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques et sont également explorées pour leur potentiel dans l'industrie des biomatériaux et des produits cosmétiques (Benedetti et al., 2019; Dorta et al., 2021). Par exemple, les saponines extraites des échinodermes ont montré des capacités immunomodulatrices intéressantes pour les traitements en biothérapie (Das et al., 2020).

## 2.3 Écologie et habitats des groupes étudiés

Les espèces d'invertébrés marins ciblées dans le cadre de ce mémoire se répartissent dans une gamme d'habitats variés le long des côtes algériennes, en particulier dans les zones infralittorales et circalittorales. Ces habitats, riches en diversité écologique, englobent une variété de milieux tels que les fonds rocheux, les herbiers de posidonie (*Posidonia oceanica*), les fonds meubles (sableux ou vaseux), ainsi que les communautés coralligènes. Les conditions environnementales de ces habitats, telles que la profondeur, l'hydrodynamisme, la nature du substrat, la température, la salinité et la disponibilité en nourriture, jouent un rôle crucial dans la distribution et l'abondance de ces espèces (Pérez-Ruzafa et al., 2020; Bouma et al., 2021).

Certaines espèces présentent des préférences écologiques spécifiques qui influencent leur répartition. Par exemple, les gorgones telles *Eunicella verrucosa* se trouvent principalement fixées sur des substrats durs tels que les roches et les épaves, dans des zones exposées à des courants modérés à forts (Betzler et al., 2020).

En revanche, les holothuries, telles que *Holothuria tubulosa*, privilégient les fonds meubles ou les herbiers de posidonie, où elles se nourrissent principalement de détritiques organiques et jouent

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

un rôle écologique essentiel dans le recyclage des nutriments (Aly et al., 2019; Mulligan et al., 2021). Les éponges comme *Chondrosia reniformis* peuvent coloniser une variété de substrats durs, souvent dans des zones plus ombragées, où elles forment des colonies en compétition avec d'autres organismes sessiles (Vacelet et al., 2018).

Les oursins, notamment *Paracentrotus lividus*, se rencontrent dans des zones rocheuses et dans les herbiers de posidonie, où ils broutent les algues et jouent un rôle clé dans la structuration de la végétation benthique (Rossi et al., 2019). Quant aux anémones comme *Actinia equina*, elles sont principalement fixées sur les rochers dans la zone intertidale ou infralittorale supérieure, où elles bénéficient de conditions stables pour se nourrir de plancton et d'autres petites proies (Boudouresque et al., 2021).

Comprendre l'écologie et la distribution de ces espèces est crucial, non seulement pour leur localisation et leur récolte éventuelle (qui doit être réalisée de manière durable), mais aussi car la production de métabolites secondaires est directement influencée par les conditions environnementales. Ces composés sont souvent produits en réponse à des stress environnementaux et sont essentiels à la défense des organismes marins contre les prédateurs, les pathogènes et les concurrents (Jiménez et al., 2020; Mora et al., 2021). La section qui suit (2.4.) détaillera la description des espèces étudiées et leurs caractéristiques écologiques spécifiques.

### 2.4 Espèces Marines Étudiées

Ce travail s'intéresse plus spécifiquement à un ensemble d'espèces d'invertébrés marins, particulièrement pertinentes pour la recherche biotechnologique et présentes sur les côtes algériennes.

Ces espèces ont été sélectionnées en fonction de leur potentiel connu pour la production de biomolécules bioactives et de leur accessibilité pour des études d'identification génétique et d'extraction. Les espèces en question sont présentées plus en détail dans les chiffres techniques à suivre.

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### *Holothuria (Holothuria tubulosa)*, Gmelin, 1791

Aphia ID : 125182



#### Taxinomie

**Règne :** *Animalia*  
**Embranchement :** *Echinodermata*  
**Classe :** *Holothuroidea*  
**Ordre :** *Holothuriida*  
**Famille :** *Holothuriidae*  
**Genre :** *Holothuria*  
**Espèce :** *Holothuria (Holothuria) tubulosa*

#### Distribution Mondiale :



INPN., 2025

#### Biologie

Cette holothurie présente un organisme cylindrique pouvant atteindre 30 cm de longueur, avec une coloration caractéristique brun-rougeâtre à noirâtre et une texture rugueuse due à la présence de papilles coniques (Mezali et al., 2020 ; Romano et al., 2022). L'espèce se distingue par ses remarquables capacités de régénération, propriété qui suscite un intérêt croissant en recherche biomédicale (García-Arrarás et Dolmatov, 2010 ; Sugni et al., 2020).

#### Utilisation en biotechnologie

Les recherches récentes révèlent un potentiel biotechnologique considérable avec la présence de collagène de haute qualité, de protéines bioactives et de polysaccharides aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques (Custódio et al., 2024; Somaida et al., 2024). Les saponines triterpéniques extraites de cette espèce démontrent des activités cytotoxiques, antifongiques et hémolytiques prometteuses (Bordbar et al., 2011). Des études in vitro confirment l'efficacité des extraits contre diverses lignées cellulaires cancéreuses, ouvrant des perspectives thérapeutiques significatives (Mamelona et al., 2007; Ridzwan et al., 2014).

#### Écologie

L'espèce colonise principalement les fonds meubles constitués de sable et de vase, ainsi que les herbiers de *Posidonia oceanica*, de la surface jusqu'à 100 mètres de profondeur (Neghli et Mezali, 2019; Mezali et Sliman Tamacha, 2020). En tant qu'organisme détritivore, elle ingère activement les sédiments riches en matière organique, jouant un rôle écologique fondamental dans la bioturbation et le recyclage des nutriments au sein des écosystèmes benthiques méditerranéens (Belbachir et al., 2014 ; Zmemlia et al., 2020).

### Fiche espèce 1. *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### *Eunicella verrucosa*, (Pallas, 1766)

Aphia ID : 125366



#### Taxinomie

**Règne :** *Animalia*

**Embranchement:** *Cnidaria*

**Classe :** *Octocorallia*

**Ordre :** *Malacalcyonacea*

**Famille :** *Eunicellidae*

**Genre :** *Eunicella*

**Espèce :** *Eunicella verrucosa*

#### Distribution Mondiale



INPN., 2025

#### Biologie

Cette gorgone coloniale développe des structures arborescentes en éventail remarquables pouvant atteindre 50 cm de hauteur, présentant des colorations variées allant du rose à l'orange ou au blanc (Ioannou et al., 2009). Les branches cylindriques portent des polypes blancs insérés dans des calices proéminents caractéristiques appelés "verrues", et l'espèce adopte un mode d'alimentation suspensionniste par capture de particules via les tentacules des polypes (Rossi et al., 2008; Hughes et al., 2020).

#### Utilisation en biotechnologie

Les recherches en bioprospection marine révèlent une production remarquable de métabolites secondaires, notamment des diterpènes de type eunicellane et cladiellane, ainsi que divers stéroïdes (Coll et al., 1987). Ces composés bioactifs présentent des activités anti-inflammatoires, cytotoxiques et antimicrobiennes prometteuses pour le Développement de nouveaux agents Thérapeutiques (Rocha et al., 2011; Menna et al., 2013).

#### Ecologie

*E. verrucosa* se fixe préférentiellement sur des substrats durs incluant roches et épaves, privilégiant les zones exposées aux courants marins et bien éclairées entre 5 et 30 mètres de profondeur (Bensari et al., 2020). En tant qu'espèce ingénieur d'écosystème, elle forme des forêts animales complexes qui abritent une faune associée riche et diversifiée, contribuant significativement à la biodiversité des communautés benthiques méditerranéennes (Cerrano et al., 2000; Linares et al., 2008).

**Fiche espèce 2.** *Eunicella verrucosa*, (Pallas, 1766)

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### *Chondrosia reniformis*, Nardo, 1847

Aphia ID : 134112



#### Taxinomie

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Porifera*

Classe : *Demospongiae*

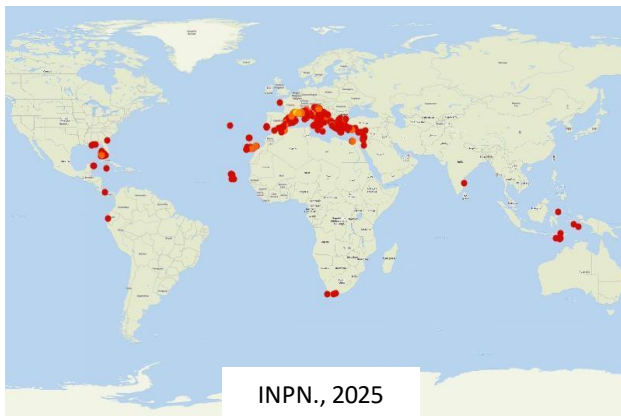
Ordre : *Chondrosiida*

Famille : *Chondrosiidae*

Genre : *Chondrosia*

Espèce : *Chondrosia reniformis*

#### Distribution Mondiale



#### Biologie

Cette éponge présente une morphologie massive et lobée caractéristique rappelant la forme d'un rein, avec une coloration gris-brun foncé et une consistance cartilagineuse remarquablement élastique (Pozzolini et al., 2020). L'originalité de son squelette réside dans l'absence totale de spicules minéraux, composé exclusivement d'un réseau dense de fibres de collagène fibrillaire conférant des propriétés mécaniques particulières (Téten et al., 2017; Exposito et al., 2002).

#### Utilisation en biotechnologie

Le collagène fibrillaire de *C. reniformis* représente une ressource marine exceptionnelle aux propriétés mécaniques et biomédicales exploitées en recherche avancée (Heinemann et al., 2007). La chondrosine, protéine spécifique identifiée dans cette espèce, démontre des propriétés anti-tumorales significatives *in vitro* (Silva et al., 2012). Les applications en médecine régénérative incluent la reconstruction cutanée, cartilagineuse et osseuse, tandis que l'ingénierie tissulaire exploite ce biomatériau pour la conception de membranes, matrices 3D et scaffolds biocompatibles (Martínez-Poveda et al., 2016; Pozzolini et al., 2018).

#### Ecologie

L'espèce colonise principalement les substrats durs incluant roches et formations coralligènes, privilégiant les zones ombragées ou à faible luminosité depuis la surface jusqu'à plusieurs dizaines de mètres de profondeur (Di Pizzo et al., 2024). Cette adaptation aux environnements peu éclairés reflète une stratégie écologique spécialisée au sein des communautés benthiques méditerranéennes (Sarà et Vacelet, 1973).

Fiche espèce 3. *Chondrosia reniformis*, Nardo, 1847

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### *Paracentrotus lividus*, (Lamarck, 1816)

Aphia ID : 124316



#### Taxinomie

Règne : *Animalia*

Embranchement: *Echinodermata*

Classe : *Echinoidea*

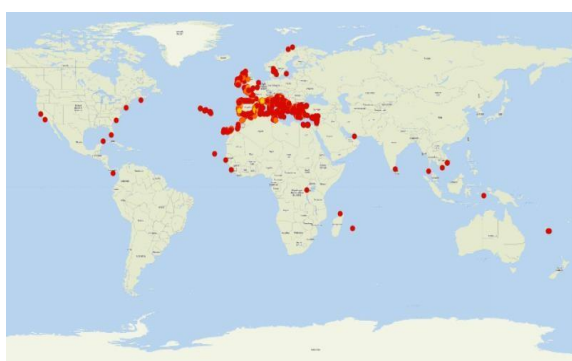
Ordre : *Camarodonta*

Famille : *Parechinidae*

Genre : *Paracentrotus*

Espèce : *Paracentrotus lividus*

#### Distribution Mondiale



INPN., 2025

#### Biologie

Cet oursin se caractérise par un test globuleux et légèrement aplati pouvant atteindre 7 cm de diamètre, recouvert de nombreuses épines robustes dont la coloration varie du violet foncé au brun ou au vert (Boudouresque et al., 2016). Cette variation chromatique reflète souvent les conditions environnementales locales et l'âge des individus (Grosjean et al., 1998; Bulleri et al., 1999).

#### Utilisation en biotechnologie

Les recherches révèlent la présence de polyhydroxy-naphtoquinones aux propriétés antioxydantes et potentiellement antibactériennes remarquables (Stabili et al., 2015). Les peptides antimicrobiens identifiés dans les cœlomocytes de l'espèce ouvrent des perspectives thérapeutiques intéressantes (Pinsino et al., 2012). En écotoxicologie, les embryons et larves de *P. lividus* servent de bioindicateurs sensibles pour l'évaluation de la pollution marine, leur réponse aux contaminants constituant un outil de surveillance environnementale reconnu (Killian et al., 2009; Bellas et al., 2014).

#### Ecologie

*P. lividus* occupe la zone intertidale jusqu'à environ 30 mètres de profondeur, adoptant un régime herbivore brouteur intensif (El Idrissi et al., 2023). Lorsque présent en forte densité, l'espèce peut provoquer un surpâturage des algues conduisant à la formation de "déserts sous-marins", zones considérablement appauvries en végétation et représentant un défi écologique majeur (Verlaque et Nédélec, 1983; Sala et al., 1998).

Fiche espèce 4. *Paracentrotus lividus*, (Lamarck, 1816)

*Actinia equina*, (Linnaeus, 1758)

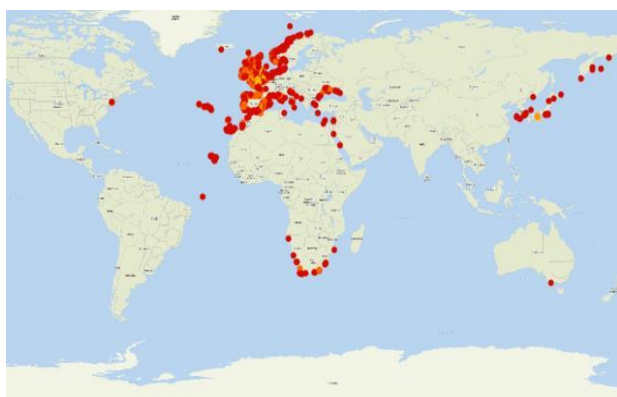
Aphia ID : 100803



**Taxinomie**

**Règne :** *Animalia*  
**Embranchement :** *Cnidaria*  
**Classe :** *Hexacorallia*  
**Ordre :** *Actiniaria*  
**Famille :** *Actiniidae*  
**Genre :** *Actinia*  
**Espèce :** *Actinia equina*

**Distribution Mondiale**



INPN., 2025

**Biologie**

Cette anémone de mer présente un corps cylindrique se fixant fermement aux rochers par un disque pédieux, capable de se rétracter en une boule rouge vif caractéristique lors des marées basses (Chintiroglou et al., 1997). L'espèce possède jusqu'à 192 tentacules courts et rétractiles disposés autour de la bouche centrale, avec des colorations variables incluant rouge, brun et vert selon les populations locales (Östman, 2000).

**Utilisation en biotechnologie**

Les équinatoxines (EqT) représentent des cytolysines remarquables formant des pores dans les membranes cellulaires, présentant des activités hémolytique, cytotoxique et cardiotoxique significatives (Anderluh et Maček, 2002). Les équines, peptides antimicrobiens récemment isolés, démontrent une efficacité contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives (Bulti et Šuput, 1997). Le mucus riche en protéines et polysaccharides offre un potentiel d'application biomédicale et cosmétique prometteur nécessitant des recherches approfondies (Norton et al., 1982).

**Ecologie**

*A. equina* colonise les côtes rocheuses de l'Atlantique et de la Méditerranée en zone intertidale, démontrant une résistance remarquable à l'émersion grâce à sa capacité de rétraction corporelle (Martin et al., 2015). En tant que prédateur opportuniste, elle capture petits crustacés, poissons et débris organiques grâce aux cnidocytes des tentacules, jouant un rôle important dans les réseaux trophiques intertidaux (Sanamyan et al., 2012; Tkachuk et al., 2024).

### *Alcyonium acaule*, Marion, 1878

Aphia ID : 125331



#### Taxinomie

**Règne :** *Animalia*

**Embranchement :** *Cnidaria*

**Classe :** *Octocorallia*

**Ordre :** *Malacalcyonacea*

**Famille :** *Alcyoniidae*

**Genre :** *Alcyonium*

**Espèce :** *Alcyonium acaule*

#### Distribution Mondiale



INPN., 2025

#### Biologie

Ce corail mou forme des colonies digitées caractéristiques pouvant atteindre 15 à 20 cm de hauteur, se fixant au substrat par une base élargie et présentant une surface recouverte de polypes blancs autozoïdes à 8 tentacules pennés typiques des octocoralliaires (Garrabou et al., 2001). La texture ferme résulte de la présence de spicules calcaires et de la pression hydrostatique interne maintenue par l'organisme (Fabricius et Alderslade, 2001).

#### Utilisation en biotechnologie

Les analyses phytochimiques révèlent la présence de terpènes variés incluant diterpènes et sesquiterpènes, ainsi que divers stéroïdes aux activités biologiques potentielles (Benayahu et al., 2018). Ces molécules démontrent des propriétés cytotoxiques, anti-inflammatoires et antimicrobiennes prometteuses pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, bien que des recherches supplémentaires soient nécessaires pour valider ces applications (Rocha et al., 2015).

#### Ecologie

*A. acaule* colonise les fonds rocheux et coralligènes exposés à un courant modéré, généralement entre 20 et 100 mètres de profondeur (Rocha et al., 2011). L'espèce contribue significativement à la complexité des habitats benthiques et favorise la biodiversité locale en offrant des micro-habitats aux organismes associés (Ballesteros, 2006; Costello et al., 2015).

**Fiche espèce 6.** *Alcyonium acaule*, Marion, 1878

### *Eunicella singularis*, (Esper, 1791)

Aphia ID : 125365



#### Taxinomie

Règne : *Animalia*

Embranchement : *Cnidaria*

Classe : *Octocorallia*

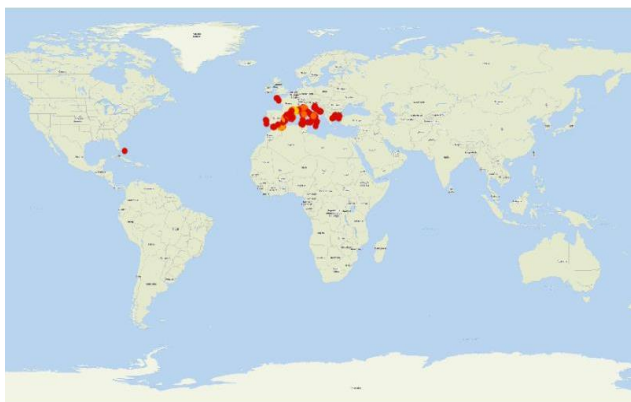
Ordre : *Malacalcyonacea*

Famille : *Eunicellidae*

Genre : *Eunicella*

Espèce : *Eunicella singularis*

#### Distribution Mondiale



INPN., 2025

#### Biologie

*E. singularis* constitue une espèce gonochorique et itéropare maintenant un ratio sexuel stable d'environ 1:1 (Ribes et al., 2007). Son cycle reproductif complexe comprend une longue période d'ovogenèse de 13 à 17 mois, culminant par la libération de larves planula de fin mai à juillet, stratégie reproductrice adaptée aux conditions méditerranéennes (Coma et al., 1995).

#### Utilisation en biotechnologie

Les recherches récentes sur le venin de *E. singularis* révèlent une diversité remarquable de toxines aux applications biotechnologiques potentielles significatives (Modica et al., 2024). Ces découvertes soulignent l'importance évolutive du venin chez les Octocoralliaires et ouvrent des perspectives prometteuses pour le développement de médicaments innovants, bien que des études cliniques approfondies soient nécessaires (Lewis et Garcia, 2003).

#### Ecologie

Cette gorgone joue un rôle essentiel dans les écosystèmes méditerranéens, formant fréquemment des colonies denses servant d'habitat à de nombreux organismes marins (Aurelle et al., 2024). *E. singularis* entretient une relation mutualiste avec des algues symbiotiques, renforçant sa résilience face aux changements environnementaux et lui permettant de prospérer dans des conditions variables (Allemand et Grover, 2018).

Fiche espèce 7. *Eunicella singularis*, (Esper, 1791)

*Alcyonium digitatum*, Linnaeus, 1758

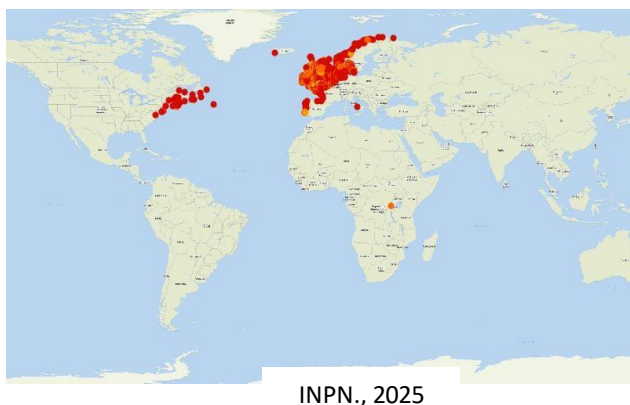
Aphia ID : 125333



**Taxinomie**

**Règne :** *Animalia*  
**Embranchement :** *Cnidaria*  
**Classe :** *Octocorallia*  
**Ordre :** *Malacalcyonacea*  
**Famille :** *Alcyoniidae*  
**Genre :** *Alcyonium*  
**Espèce :** *Alcyonium digitatum*

**Distribution Mondiale**



**Biologie**

*A. digitatum* développe des colonies lobées et massives caractéristiques en forme de doigts ou de masses charnues atteignant 20 à 30 cm de hauteur, avec une coloration variant du blanc au jaune ou orange (Hartnoll, 1975). L'espèce présente des polypes autozoïdes à 8 tentacules pennés et se fixe solidement sur substrats durs incluant roches, coquilles et épaves dans des zones à forts courants, de la zone intertidale basse jusqu'à 50 mètres de profondeur (Colin et al., 1980).

**Utilisation en biotechnologie**

Les études phytochimiques récentes révèlent la présence de diterpènes bioactifs aux propriétés pharmacologiques potentielles (Alsmark et al., 2013). Le microbiome endobionte d'*A. digitatum* dévoile une riche diversité bactérienne incluant  $\alpha$ -protéobactéries et actinobactéries, micro-organismes pouvant contribuer à la production de composés bioactifs d'intérêt thérapeutique (Webster et Hill, 2001). Bien que certains métabolites présentent des activités biologiques prometteuses, des études supplémentaires approfondies demeurent nécessaires pour valider leur potentiel applicatif (Sipkema et al., 2005).

**Ecologie**

Cette espèce structurante des communautés benthiques de l'Atlantique Nord contribue significativement à la complexité des habitats marins et supporte une biodiversité associée remarquable (Manuel, 1988). Les colonies d'*A. digitatum* créent des micro-environnements favorables à l'établissement de nombreuses espèces épibiontes et commensales (Budd, 2008).

**Fiche espèce 8.** *Alcyonium digitatum*, Linnaeus, 1758

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### 3 Biomolécules marines : Potentiel biotechnologique et applications

Après avoir mis en lumière la richesse de la biodiversité des invertébrés marins présents sur les côtes algériennes, en soulignant le potentiel biotechnologique de plusieurs espèces clés comme *Holothuria tubulosa*, *Eunicella singularis*, *Chondrosia reniformis*, *Paracentrotus lividus*, *Actinia equina*, et les *Alcyonium sp*, cette partie se propose d'explorer plus en détail la nature chimique et les propriétés biologiques des principales familles de biomolécules issues de ces organismes, ainsi que leurs applications potentielles dans divers domaines industriels, notamment pharmaceutique, cosmétique et nutraceutique.

Les invertébrés marins, soumis à des pressions évolutives intenses, ont développé une chimie secondaire extraordinairement riche et diversifiée. Parmi les innombrables composés isolés, plusieurs grandes familles de biomolécules se distinguent par leur abondance, leur originalité structurale et leurs activités biologiques prometteuses.

Le tableau suivant présente une synthèse des principales classes de biomolécules d'intérêt biotechnologique extraites d'invertébrés marins. Pour chaque type de molécule, sont détaillés la définition, les sources taxonomiques marines identifiées, les caractéristiques structurales ou fonctionnelles, ainsi que les activités biologiques associées et leurs applications potentielles dans les domaines thérapeutique, biomédical ou environnemental.

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 2.** Classification, propriétés fonctionnelles et perspectives d'application des molécules bioactives issues d'invertébrés

Type de biomolécule	Définition	Sources marines	Caractéristiques principales	Activités biologiques / Applications	Références
<b>Saponines</b>	Glycosides amphiphiles composés d'un sucre lié à un aglycone triterpénique ou stéroïdique.	Holothuries, Gorgones	Glycosides triterpéniques ou stéroïdiques, amphiphiles	Cytotoxiques (anticancéreux), antifongiques, antibactériennes, antivirales, immunostimulantes, anti-inflammatoires	Chevolot et al., 2001 Guo et al., 2016 Li et al., 2019
<b>Polysaccharides (GCS / GAG)</b>	Polymères de sucres sulfatés, notamment glycosaminoglycanes comme la chondroïtine-sulfate.	Holothuries	Polysaccharides sulfatés (chondroïtine-sulfate + fucose)	Anticoagulantes, antithrombotiques, anti-inflammatoires, antivirales, anticancéreuses	Zhang et al., 2018 Wang et al., 2020
<b>Protéines (collagène, enzymes, lectines)</b>	Macromolécules formées d'acides aminés, avec des fonctions structurales et bioactives.	Éponges, holothuries	Collagène marin, protéines bioactives (ex. chondrosine)	Biomatériaux (tissus, gélatine), propriétés antitumorales	Liu et al., 2017 Kim et al., 2019
<b>Lipides et acides gras</b>	Molécules hydrophobes comprenant acides gras et lipides complexes, souvent insaturés en mer.	Holothuries, éponges, cnidaires	Acides gras polyinsaturés (AGPI) oméga-3/6, stérols marins, phospholipides	Santé cardiovasculaire, anti-inflammatoires, biomarqueurs environnementaux	Singh et al., 2015 Martinez et al., 2021
<b>Composés phénoliques</b>	Molécules organiques avec un ou plusieurs groupes hydroxyles sur un cycle aromatique.	Holothuries, autres invertébrés	Polyphénols, flavonoïdes, quinones	Antioxydants, antibactériens, antiviraux, anti-inflammatoires, anticancéreuses	Perez et al., 2014 Xu et al., 2018
<b>Terpènes</b>	Large famille de composés dérivés de l'isoprène, souvent bioactifs et odorants.	Éponges, gorgones, cnidaires	Mono-, sesqui-, di-, tri- et tétraterpènes	Cytotoxiques, anti-inflammatoires, antimicrobiens, antiviraux	Jones et al., 2016; Singh et Sharma, 2020)
<b>Pigments bioactifs</b>	Composés colorés qui protègent les organismes contre les stress environnementaux.	Crustacés, échinodermes, autres invertébrés	Caroténoïdes, spinochromes, mélanines	Antioxydants, photoprotecteurs, antibactériens, cytotoxiques	Kimura et al., 2017 Lee et al., 2019

### 4 Évaluation fonctionnelle et biologique des biomolécules : Approches par Bioessais

L'isolement et la caractérisation structurale de nouvelles molécules ne sont que des étapes intermédiaires. L'objectif final de la bioprospection marine est souvent d'identifier des composés possédant une activité biologique intéressante pour une application potentielle (pharmaceutique, cosmétique, etc.) (Thomas et Kim, 2013). Il est donc essentiel d'évaluer l'activité biologique des extraits bruts, des fractions chromatographiques et des composés purs obtenus. Cette évaluation se fait par le biais de **bioessais** (ou tests biologiques), qui sont des procédures standardisées permettant de mesurer l'effet d'une substance sur un système biologique vivant (cellules, enzymes, micro-organismes, organismes entiers) (Sekkat et al., 2001).

Le choix des bioessais dépend de l'application visée et des activités recherchées. Une stratégie de criblage "*screening*" peut impliquer l'utilisation d'une batterie de tests pour explorer un large éventail d'activités potentielles, ou être plus ciblée si l'on recherche une activité spécifique (par exemple, anticancéreuse ou antibiotique) (Manier et al., 2023).

#### 4.1 Différents types de bioessais en pratique courante

Le tableau ci-dessous (tableau 3) présente une classification des bioessais couramment utilisés pour évaluer les propriétés biologiques des composés marins, notamment en termes de cytotoxicité, d'activité antimicrobienne, antioxydante, enzymatique ou anti-inflammatoire (Stoddart, 2011; Wiegand et al., 2000; Copeland, 2013; Prior et al., 2005; Vane & Botting, 1998). Chaque type de test est brièvement décrit, accompagné des méthodes analytiques associées ainsi que d'exemples de cibles biologiques ou de modèles cellulaires couramment employés dans ce type d'évaluation pharmacologique ou écologique.

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

**Tableau 3.** Principaux types de bioessais utilisés pour l'évaluation de l'activité biologique des biomolécules marines

Type de bioessai	Description	Méthodes utilisées	Exemples de cibles / modèles
Tests de cytotoxicité	Évaluation de la capacité d'une substance à tuer ou inhiber la prolifération des cellules. Essentiels pour la recherche anticancéreuse (Stoddart, 2011).	Tests colorimétriques (MTT, XTT, SRB) pour quantifier la viabilité cellulaire. $CI_{50}$ (concentration inhibitrice à 50 %) comme paramètre d'évaluation (ISO 10993-5:2009).	Lignées cellulaires cancéreuses : sein, poumon, côlon, leucémie, etc.
Tests antimicrobiens	Détection de l'activité antibactérienne ou antifongique.	- Méthode de diffusion sur gélose (zone d'inhibition) - Méthode de dilution (CMI : Concentration Minimale Inhibitrice) (Wiegand et al., 2000).	Bactéries Gram-positif ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), Gram-négatif ( <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ), champignons ( <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus</i> spp.)
Tests d'activité enzymatique	Évaluation de l'effet inhibiteur sur des enzymes impliquées dans des processus pathologiques (Copeland, 2013).	Méthodes spectrophotométriques, fluorimétriques, luminescentes (Dixon & Webb, 1979).	Enzymes cibles : protéases, kinases, acétylcholinestérase, tyrosinase
Tests antioxydants	Mesure de la capacité à neutraliser les radicaux libres ou prévenir l'oxydation (Huang et al., 2005).	- Piégeage de radicaux libres (DPPH, ABTS) - Réduction du fer (FRAP) - Inhibition de la peroxydation lipidique (TBARS) - Tests cellulaires contre le stress oxydatif (Prior et al., 2005).	Agents oxydants, radicaux libres, cellules exposées au stress oxydatif
Tests anti-inflammatoires	Mesure de l'inhibition de la production de médiateurs pro-inflammatoires. Utilisés dans des modèles cellulaires (Vane & Botting, 1998).	Dosage de TNF- $\alpha$ , IL-6, NO, PGE <sub>2</sub> ; inhibition de COX-1/2, iNOS (Gilroy et al., 1999).	Cellules immunitaires stimulées (ex. macrophages + LPS)
Autres tests spécifiques	Tests adaptés selon les objectifs (antiviraux, antiparasitaires, écotoxicologiques, etc.).	- Tests antiviraux : inhibition de la réplication virale - Tests antiparasitaires - Tests de liaison à des récepteurs - Tests écotoxicologiques (évaluation de la toxicité sur organismes aquatiques modèles) (Manier et al., 2023; Sekkat et al., 2001)	Organismes aquatiques modèles : larves d'oursin, daphnies, algues

### 4.2 Approche intégrée de criblage biologique et dérégulation rapide des extraits naturels

Face à la complexité des extraits naturels, une stratégie de **criblage guidé par l'activité biologique** est souvent employée. L'extrait brut est d'abord testé dans les bioessais choisis. Si une activité est détectée, l'extrait est fractionné par chromatographie, et chaque fraction est à nouveau testée. Les fractions actives sont ensuite purifiées davantage, en suivant l'activité biologique à chaque étape, jusqu'à l'isolement du ou des composés responsables de l'activité observée.

## CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Cependant, ce processus peut être long et coûteux, et conduit souvent à la ré-isolation de composés déjà connus. Pour accélérer le processus et éviter la redondance, des stratégies de **déréplication** sont mises en œuvre. La déréplication consiste à identifier rapidement les composés connus présents dans les extraits ou les fractions actives, dès les premières étapes de l'analyse. Le couplage Chromatographie liquide - spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) est particulièrement puissant pour cela : en comparant les masses moléculaires, les spectres de fragmentation et les temps de rétention avec des bases de données de produits naturels connus (comme MarinLit, Dictionary of Natural Products), on peut rapidement identifier les molécules déjà décrites et concentrer les efforts de purification et de caractérisation structurale sur les composés potentiellement nouveaux (Wolfender et al., 2015).

L'intégration des analyses chimiques (Chromatographie liquide - spectrométrie de masse LC-MS, Résonance Magnétique Nucléaire RMN) et des données biologiques (résultats des bioessais) permet ainsi d'optimiser le processus de découverte de nouvelles biomolécules marines bioactives.

### 4.3 Le processus de caractérisation des biomolécules marines : de l'échantillon aux bioessais

L'exploration chimique et biologique des invertébrés marins est un processus complexe mais passionnant, qui nécessite la mise en œuvre coordonnée d'un large éventail de techniques. Depuis la récolte et la préparation de l'échantillon (Campos, 2017; Le Goff, 2020), en passant par l'extraction (conventionnelle ou moderne) (Chemat et al., 2019), la purification chromatographique (Chromatographie sur Colonne CC, Chromatographie liquide haute performance HPLC, etc.), l'élucidation structurale (MS, RMN, etc.) (Pellissier, 2017; Wolfender et al., 2019) et l'évaluation fonctionnelle (bioessais) (Sekkat et al., 2001; Stoddart, 2011), chaque étape requiert une expertise spécifique et des équipements souvent sophistiqués.

L'exemple de l'extraction et de la caractérisation du collagène de *Chondrosia reniformis* illustre bien ce processus. Après récolte et lyophilisation de l'éponge, le collagène peut être extrait par des méthodes acides ou enzymatiques (pepsine). La purification peut impliquer des précipitations sélectives et des dialyses. La caractérisation fait appel à des techniques comme l'électrophorèse sur gel (SDS-PAGE) pour déterminer la taille des chaînes polypeptidiques, l'analyse d'acides aminés, la spectroscopie infrarouge IR ou Dichroïsme circulaire CD pour confirmer la structure triple hélice, et la microscopie électronique pour visualiser l'organisation fibrillaire. Des tests de biocompatibilité *in vitro* (cytotoxicité, adhésion cellulaire) sont ensuite nécessaires pour valider son potentiel biomédical (Di Pizzo et al., 2024).

De même, l'isolement des saponines d'*Holothuria tubulosa* implique une extraction hydroalcoolique, suivie de partitions liquide-liquide et de multiples étapes de chromatographie (silice, phase inverse HPLC) guidées par un test d'activité (par exemple, hémolytique ou cytotoxique). La caractérisation structurale fine de chaque saponine purifiée nécessite ensuite une analyse Résonance Magnétique Nucléaire unidimensionnelle et bidimensionnelle (RMN 1D et 2D) poussée, ainsi que des expériences de spectrométrie de masse (Spectrométrie de masse à haute résolution HRMS, Spectrométrie de masse en tandem MS/MS) pour déterminer la structure de l'aglycone et la séquence des sucres (INSTM Bulletin, 2023).

Le développement de méthodes d'extraction plus rapides, plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement (chimie verte) (Chemat et al., 2019), ainsi que l'amélioration constante des techniques analytiques (Chromatographie liquide ultra-haute performance UHPLC, HRMS, RMN à très haut champ) et des outils bio-informatiques pour la déréplication et l'analyse de données omiques (Parrish et al., 2015; Wolfender et al., 2019), continuent d'accélérer le rythme des découvertes dans le domaine fascinant des produits naturels marins.

## **CHAPITRE II. MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT**

---

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

La réussite d'une étude axée sur la valorisation biotechnologique et l'identification génétique d'organismes marins repose fondamentalement sur la qualité et la pertinence des échantillons collectés. Les étapes d'échantillonnage sur le terrain, de prétraitement et de conditionnement sont donc d'une importance capitale, car elles impactent directement la fiabilité des analyses génétiques et biochimiques ultérieures (Stat et al., 2017 ; Borrell et al., 2020). Des protocoles inadéquats peuvent entraîner une dégradation de l'ADN, rendant l'identification moléculaire difficile voire impossible, ou encore, altérer la composition et l'activité des biomolécules d'intérêt, faussant ainsi les résultats des dosages biochimiques (Ransome et al., 2017; Truong et al., 2019).

Ce chapitre présente en détail le matériel mobilisé et décrit rigoureusement les méthodes employées pour la collecte des espèces d'invertébrés marins ciblées sur les sites d'Aïn Beniane et Béni Saf (Algérie), ainsi que les stratégies de prétraitement et de conditionnement différenciées mises en œuvre pour préserver au mieux l'intégrité des échantillons destinés, d'une part, aux analyses génétiques et, d'autre part, aux investigations biochimiques.

L'objectif étant de fournir une description transparente et reproductible des procédures suivies, afin d'évaluer la robustesse de la base expérimentale de cette étude.

### 1 Matériel

La réussite des campagnes d'échantillonnage et des analyses subséquentes repose sur la disponibilité et l'adéquation du matériel utilisé. (Le matériel principal mobilisé est en Annexe I).

### 2 Méthodes

Cette section décrit en détail les différentes étapes méthodologiques suivies, depuis la sélection des sites jusqu'au conditionnement final des échantillons pour analyses.

#### 2.1 Choix et présentation des sites d'échantillonnage

Le choix des sites d'échantillonnage est une étape fondamentale qui conditionne la représentativité et la pertinence des données collectées (Underwood et Chapman, 1996).

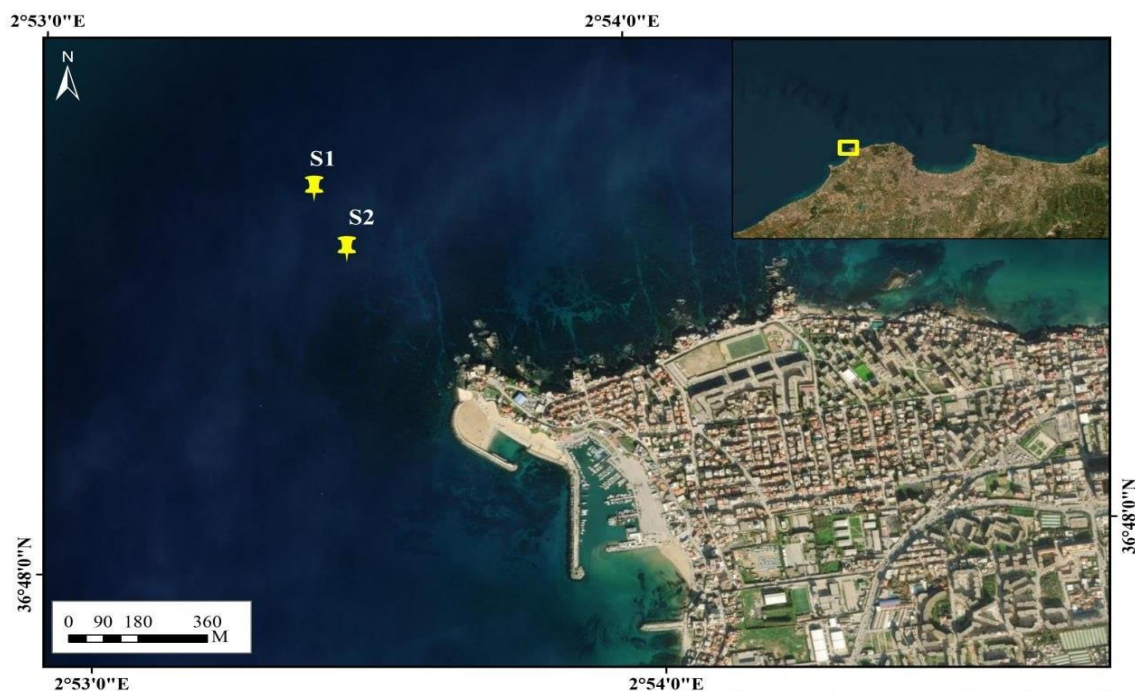
##### 2.1.1 Critères de sélection des sites

Les deux sites retenus, Aïn Beniane (région d'Alger) et Béni Saf (région d'Aïn Témouchent), ont été sélectionnés sur la base de critères empiriques et pragmatiques. Principalement, ces zones sont connues par l'équipe pour abriter des populations établies des espèces d'invertébrés ciblées par l'étude, suite à des observations répétées lors de précédentes campagnes ou activités. L'accessibilité des sites et les conditions logistiques ont également été prises en compte, des facteurs importants pour la faisabilité des campagnes d'échantillonnage répétées (Baker et Wolff, 2009).

##### 2.1.2 Site d'Aïn Beniane

Situé sur la côte ouest d'Alger, le site d'Aïn Beniane se caractérise par des fonds rocheux et des herbiers de posidonie (*Posidonia oceanica*), offrant des habitats diversifiés pour la faune benthique (Boudouresque et al., 2006). Les prélèvements ont été effectués à des profondeurs de 18 et 20 mètres. Une carte de localisation détaillée du site est présentée en Fig 2.

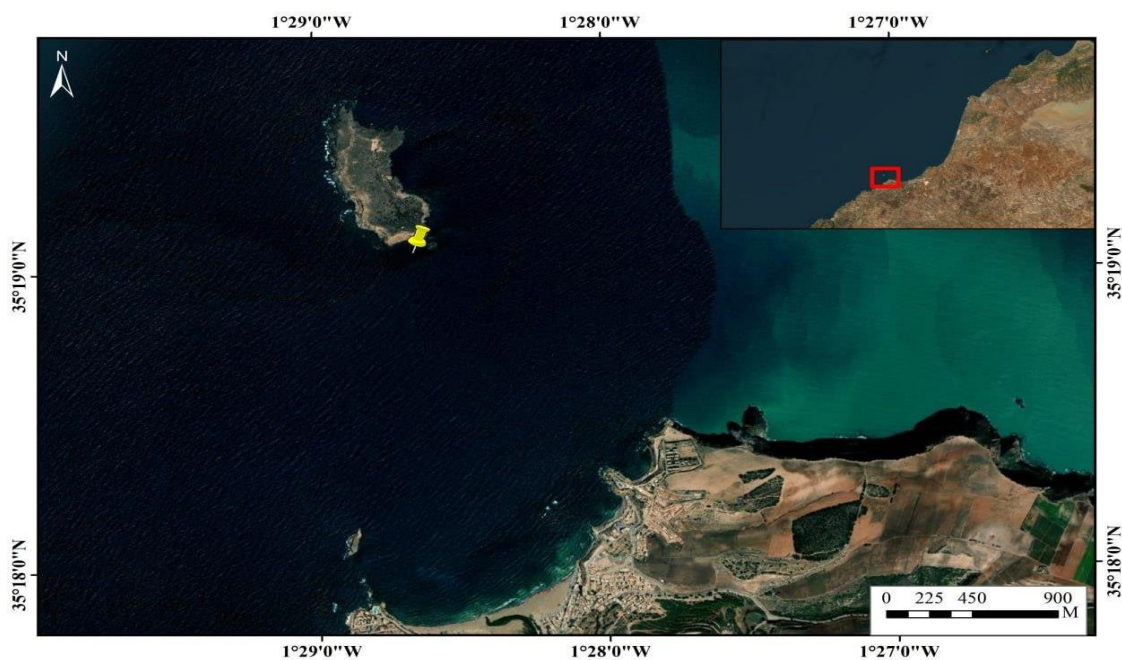
## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT



**Figure 2.** Carte de localisation du site d'échantillonnage d'Aïn Beniane (Alger)

### 2.1.3 Site de Béni Saf

Localisé plus à l'ouest, près d'Aïn Témouchent, le site de Béni Saf présente également des habitats rocheux et sédimentaires propices aux espèces ciblées (García-Raso et al., 2006). L'échantillonnage y a été réalisé à une profondeur de 10 mètres. Une carte de localisation est fournie en Fig 3.



**Figure 3.** Carte de localisation du site d'échantillonnage de Béni Saf (Aïn Témouchent)

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

### 2.2 Conditions environnementales et opérationnelles

La documentation des conditions durant l'échantillonnage est importante pour interpréter les résultats et évaluer la reproductibilité (Kingsford et Battershill, 1998).

#### 2.2.1 Conditions météorologiques

Les campagnes d'échantillonnage ont été réalisées précisément les 19 et 23 février 2025 à Ain Benian, et le 9 avril 2025 à Béni Saf, sur la côte algérienne.

Les conditions météorologiques étaient généralement favorables, avec une mer calme à peu agitée (inférieure à l'état 3 de l'échelle de Beaufort), un vent faible (inférieur à 10 nœuds) et une bonne visibilité sous-marine. Ces conditions sont essentielles pour garantir la sécurité des plongeurs et assurer une collecte efficace des échantillons (Lang et Fucile, 2012).

#### 2.2.2 Paramètres physico-chimiques In situ

Lors de chaque plongée d'échantillonnage, les paramètres physico-chimiques de l'eau ont été mesurés à la profondeur de collecte à l'aide d'une sonde multiparamètre (Marque/Modèle).

Les valeurs moyennes enregistrées étaient approximativement : Température = 16 °C, Salinité = 36.53 PSU, pH = 8.2 (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, 2017). Ces paramètres contextuels peuvent influencer la physiologie des organismes et la composition biochimique (Harley et al., 2006).

### 2.3 Méthodologie d'échantillonnage en plongée SCUBA

La plongée autonome scientifique (SCUBA diving) est une méthode directe et sélective pour l'échantillonnage d'organismes benthiques spécifiques, permettant une observation fine de l'habitat et une collecte ciblée (English et al., 1997; Pardo et al., 2014).

#### 2.3.1 Procédures de plongée et sécurité

Toutes les plongées ont été réalisées en respectant scrupuleusement les règles de sécurité de la plongée scientifique en autonomie définies par les standards internationaux et nationaux, incluant la planification des plongées, la vérification du matériel (check-list pré-plongée), la plongée en binôme et le respect des procédures de décompression (NOAA Diving Manual, 2017).

#### 2.3.2 Techniques de collecte

La collecte des spécimens a été effectuée manuellement par les plongeurs (*hand-collection*), méthode privilégiée pour sa sélectivité et son faible impact comparé aux méthodes destructives comme le chalutage ou le dragage (Bergmann et al., 2009).

Les organismes sessiles ou encroûtants (comme les gorgones ou éponges) ont été détachés délicatement de leur substrat à l'aide d'un couteau de plongée, en veillant à ne prélever que la quantité nécessaire et à minimiser l'impact sur l'environnement immédiat (Wood et Probert, 2013).

Les organismes mobiles (comme les holothuries) ont été ramassés à la main. Chaque spécimen ou groupe de spécimens d'une même espèce collecté au même point a été placé immédiatement dans un sac de prélèvement individuel (sac de congélation et un filet de plongée).

#### 2.3.3 Identification préliminaire In situ et Ex situ

Une première identification visuelle des espèces a été réalisée *in situ* par les plongeurs expérimentés, basée sur des critères morphologiques macroscopiques évidents (forme, couleur, taille) (Hayward et Ryland, 1995).

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

De retour en surface et au laboratoire, cette identification a été confirmée à l'œil nu et, si besoin, à l'aide d'une loupe binoculaire et d'un microscope, en se basant sur des critères morphologiques plus fins et en utilisant des guides d'identification taxonomique de référence pour la faune marine méditerranéenne, notamment les fiches d'identification des espèces de la FAO (Fischer et al., 1987).

La distribution géographique de chaque espèce a été vérifiée à l'aide des bases de données en ligne WoRMS (World Register of Marine Species) et Doris (Données d'Observations pour la Reconnaissance et l'Identification de la Faune et la Flore Subaquatiques). Chaque espèce a été identifiée en se basant sur des caractéristiques distinctives.

### 2.3.4 Spécificités par espèce

Des précautions spécifiques ont été appliquées lors de la collecte de certaines espèces. Pour les holothuries, une manipulation minimale et rapide était privilégiée afin d'éviter le déclenchement du phénomène d'éviscération, une réaction de stress bien documentée chez ces organismes (García-Arrarás et Greenberg, 2001).

Concernant les gorgones (comme *Eunicella singularis*), seuls des fragments apicaux de quelques centimètres ont été prélevés sur différentes colonies, une pratique visant à minimiser l'impact sur la colonie mère et à favoriser sa régénération ultérieure (Linares et al., 2008).

Le nombre d'individus ou de fragments collectés a été ajusté en fonction de l'abondance observée sur le site et des quantités requises pour les analyses génétiques et biochimiques planifiées, se situant typiquement entre 5 et 10 spécimens (ou fragments équivalents) par espèce et par site.

## 2.4 Prétraitement et conditionnement des échantillons

Le traitement rapide et adéquat des échantillons après la collecte est crucial pour préserver l'intégrité de l'ADN (éviter la dégradation par les nucléases endogènes) et des biomolécules (éviter l'oxydation, l'hydrolyse ou la dégradation enzymatique) (Seutin et al., 1991; Anchordoquy et Molina, 2007).

### 2.4.1 Prétraitement immédiat *Post-collecte*

Dès le retour au laboratoire, et dans un délai maximal de 2-3 heures après la collecte pour minimiser la dégradation *post-mortem* (Dawson et al., 1998), les échantillons ont subi un prétraitement standardisé.

Chaque spécimen a été soigneusement rincé à l'eau de robinet pour éliminer le maximum de sédiments, de mucus ou d'épibiontes, suivi d'un rinçage final à l'eau distillée pour ôter les sels (Bucklin, 2000).

### 2.4.2 Conditionnement pour analyses génétiques

Pour chaque espèce, une aliquote d'environ 50 g (de tissu ou plusieurs petits individus/fragments) a été spécifiquement destinée aux analyses moléculaires. Ces échantillons ont subi un rinçage supplémentaire dans de l'éthanol à 70 % pendant quelques minutes, une concentration souvent utilisée pour le rinçage initial bien que l'éthanol  $\geq 95$  % soit préférable pour la préservation à long terme de l'ADN (Nagy, 2010; Stein et al., 2013). Ils ont ensuite été placés dans des piluliers étiquetés et congelés rapidement à  $-20$  °C.

Par la suite, ces échantillons ont été transportés à la plateforme de génomique de l'École Supérieure en Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), dans une glacière contenant de la carboglace pour maintenir une température inférieure à  $-70$  °C durant le transport, évitant ainsi les cycles de congélation-décongélation néfastes (Anchordoquy et Molina, 2007).

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

Ils ont été immédiatement transférés dans un congélateur à  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour un stockage à long terme, condition considérée comme optimale pour la préservation de l'ADN de haute qualité sur de longues durées (Prendini et al., 2002; Eärn et al., 2013).

### 2.4.3 Conditionnement pour analyses biochimiques

Le reste des échantillons de chaque espèce, destiné aux analyses biochimiques, a également été congelé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  après rinçage à l'eau distillée.

Compte tenu de la quantité importante de biomasse et de la capacité limitée du lyophilisateur disponible, deux stratégies de déshydratation ont été employées :

**Lyophilisation (*Freeze-drying*)** : Une partie des échantillons congelés a été lyophilisée. Ce processus, qui implique la sublimation de l'eau à basse température ( $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) et sous vide poussé, est considéré comme la méthode de référence pour préserver l'intégrité structurale et chimique de nombreuses biomolécules, notamment les protéines, les polysaccharides et certains métabolites secondaires thermosensibles (Karel, 1973; Franks, 1990). La lyophilisation minimise également les réactions d'oxydation et prévient la croissance microbienne.

**Séchage à l'étuve (*Oven-drying*)** : L'autre partie des échantillons congelés a été séchée dans une étuve à une température contrôlée de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  jusqu'à poids constant. Bien que potentiellement plus agressive que la lyophilisation pour certaines molécules (dénaturation de certaines protéines, dégradation de pigments ou de composés volatils), le séchage à température modérée ( $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) est une alternative couramment utilisée, économique et rapide, qui peut préserver adéquatement de nombreux composés, notamment pour des analyses de composition globale (lipides, cendres) ou pour certaines classes de métabolites secondaires plus stables (certains polyphénols, saponines) (Reyes et al., 2007; Queiroz et al., 2008). Le choix de  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  visait à limiter la dégradation thermique excessive tout en assurant un séchage efficace.



**Figure 4.** Séchage des échantillons d'*Holothuria tubulosa* et *Eunicella singularis* dans une étuve à  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Les échantillons lyophilisés et séchés ont été, par la suite, broyés en poudre fine à l'aide d'un broyeur adapté (moulin à café) pour augmenter la surface d'extraction, puis stockés dans des contenants hermétiques (flacons en verre) étiquetés, à température ambiante, à l'abri de la lumière et de l'humidité dans un dessiccateur pour ralentir toute dégradation résiduelle jusqu'aux extractions biochimiques (Martins et al., 2014).

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT**

### **2.4.4 Étiquetage et Traçabilité**

Un système d'étiquetage rigoureux a été mis en place dès la collecte. Chaque sac de prélèvement, ainsi que chaque tube ou flacon de conservation, a été marqué avec un identifiant unique utilisant des étiquettes résistantes et un marqueur indélébile. Cet identifiant incluait au minimum : le code de l'espèce, le site et la date de prélèvement, mais aussi le type de conditionnement.

Ces informations ont été consignées dans un cahier de laboratoire et une base de données informatique (tableur Excel), pour assurer une traçabilité complète et sans équivoque de chaque échantillon tout au long du processus analytique, une étape essentielle pour la gestion de la qualité des données (Gibert et al., 2019).

## **3 Analyse critique des protocoles de terrain**

Cette section présente les résultats immédiats liés aux opérations d'échantillonnage et de conditionnement, et discute de manière critique les choix méthodologiques opérés.

### **3.1 Bilan de l'échantillonnage et stratégies de conditionnement**

Les campagnes d'échantillonnage menées en février et avril 2025 sur les sites d'Aïn Beniane et Béni Saf ont permis la collecte de 8 espèces d'invertébrés marins ciblées par l'étude. L'identification préliminaire réalisée sur le terrain et au laboratoire, à l'aide de critères morphologiques externes et de guides taxonomiques (Fischer et al., 1987), a permis d'attribuer un nom d'espèce présumé à chaque spécimen collecté.

L'identification des espèces animales marines a été réalisée par une approche combinée, s'appuyant sur des observations morphologiques macroscopiques à l'œil nu et l'utilisation de fiches d'identification spécialisées. Le tableau ci-dessous (Tableau 4), présente les principales caractéristiques morphologiques et écologiques des espèces marines collectées dans le cadre de ce travail :

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

**Tableau 4.** Espèces marines échantillonnées

Espèce	Code / Sites	Description morphologique et écologique	Références (ordre chronologique)
<i>Holothuria (H.) tubulosa</i>	C (Ain Benian)	Holothurie cylindrique atteignant 30 cm, brun-rougeâtre à noirâtre, texture rugueuse à papilles coniques. Remarquable régénération, d'intérêt biomédical.	García-Arrarás et Dolmatov, 2010; Sugni et al., 2020; Mezali et al., 2020; Romano et al., 2022
<i>Eunicella singularis</i>	GOR A (Ain Benian) GOR T (Benisaf)	Gorgone en éventail jusqu'à 50 cm, colorée (rose, orange, blanc). Branches cylindriques à polypes blancs insérés dans des calices proéminents. Suspensionniste.	Rossi et al., 2008; Ioannou et al., 2009; Hughes et al., 2020
<i>Chondrosia reniformis</i>	CRX (Ain Benian)	Éponge massive et lobée, forme de rein, gris à brun foncé, texture cartilagineuse. Squelette sans spicules, composé de collagène fibrillaire.	Exposito et al., 2002; Tétenti et al., 2017; Pozzolini et al., 2020
<i>Paracentrotus lividus</i>	EO (Benisaf)	Oursin globuleux aplati (jusqu'à 7 cm), épines robustes violettes à vertes. Couleur liée à l'environnement et à l'âge.	Grosjean et al., 1998; Bulleri et al., 1999; Boudouresque et al., 2016
<i>Actinia equina</i>	TM (Benisaf)	Anémone rouge vif, corps cylindrique fixé par disque pédieux. Se rétracte à marée basse. Jusqu'à 192 tentacules courts, colorés (rouge, brun, vert).	Chintiroglou et al., 1997; Östman, 2000
<i>Alcyonium acaule</i>	MD (Benisaf)	Corail mou formant colonies digitées (15–20 cm), base élargie, polypes blancs à 8 tentacules pennés. Texture ferme due à spicules calcaires et pression hydrostatique.	Fabricius et Alderslade, 2001; Garrabou et al., 2001
<i>Eunicella verrucosa</i>	GB (Benisaf)	Gorgone gonochorique, ratio sexuel stable (1:1). Ovogenèse de 13–17 mois, libération de larves planula entre mai et juillet. Adaptée aux conditions méditerranéennes.	Coma et al., 1995; Ribes et al., 2007
<i>Alcyonium digitatum</i>	AOR (Benisaf)	Corail mou lobé en forme de doigts (20–30 cm), blanc à orange. Fixé sur substrats durs en zones à forts courants, jusqu'à 50 m. Polypes à 8 tentacules pennés.	Hartnoll, 1975; Colin et al., 1980

Cependant, il est crucial de souligner que l'identification basée uniquement sur la morphologie externe peut s'avérer insuffisante pour certaines espèces cryptiques ou présentant une forte plasticité phénotypique (Knowlton, 1993).

Des similarités morphologiques entre espèces proches ou des variations intra spécifiques liées à l'environnement peuvent conduire à des erreurs d'identification (Wares et al., 2001). Par conséquent, l'identification visuelle réalisée dans cette étude doit être considérée comme préliminaire et nécessitera une confirmation rigoureuse par les analyses génétiques prévues ultérieurement (Hebert et al., 2003).

Concernant le conditionnement, les différentes méthodes appliquées (congélation à -80 °C après rinçage à l'éthanol 70 % pour la caractérisation génétique ; lyophilisation et séchage à l'étuve à 50 °C pour la biochimie) ont permis de préserver la biomasse collectée en vue des

## CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT

analyses futures. L'intégrité physique des échantillons a été maintenue durant le transport et le stockage.

La qualité de l'ADN extrait des échantillons conservés à -80 °C et l'impact comparé de la lyophilisation et du séchage à l'étuve sur les profils biochimiques seront évalués lors des chapitres analytiques ultérieurs.

### 3.2 Analyse critique des méthodes d'échantillonnage et de conservation

Les choix méthodologiques effectués pour l'échantillonnage et le conditionnement découlent d'un compromis entre les objectifs scientifiques, les contraintes logistiques et les bonnes pratiques reconnues. L'échantillonnage par collecte manuelle en plongée SCUBA a été privilégié pour sa grande sélectivité, permettant de cibler précisément les espèces d'intérêt et de minimiser la collecte accessoire et l'impact sur l'habitat, contrairement aux méthodes non sélectives comme le chalutage ou le dragage (Bergmann et al., 2009; Pardo et al., 2014). Cependant, cette méthode introduit un biais potentiel lié à l'observateur (le plongeur), qui peut inconsciemment sélectionner des individus de taille ou d'apparence spécifique, ou être limité par la visibilité et le temps de plongée (Andrew et Mapstone, 1987). De plus, la collecte manuelle est limitée aux profondeurs accessibles en plongée autonome.

Le choix des sites basé sur la connaissance préalable de la présence des espèces est pragmatique mais peut limiter la généralisation des résultats si ces sites ne sont pas représentatifs de l'ensemble de la côte algérienne. Idéalement, un plan d'échantillonnage stratifié aléatoire serait préférable mais souvent plus complexe et coûteux à mettre en œuvre (Kingsford et Battershill, 1998).

Concernant la préservation pour la génétique, la congélation à -80 °C est la méthode de référence pour le stockage à long terme de l'ADN (Prendini et al., 2002). Le rinçage initial à l'éthanol 70 % est une pratique courante sur le terrain, bien que l'éthanol à 95-100 % soit généralement recommandé pour une meilleure déshydratation et préservation de l'ADN, limitant davantage l'activité des nucléases (Nagy, 2010; Stein et al., 2013). L'utilisation de l'éthanol 70 % pourrait potentiellement conduire à une légère dégradation de l'ADN sur le long terme comparé à l'éthanol absolu, mais reste une méthode acceptable pour de nombreuses applications de séquençage ou de phylogénie si le stockage ultérieur à -80 °C est rapide (Dawson et al., 1998).

Pour la biochimie, la lyophilisation est considérée comme la méthode de séchage la plus douce, préservant au mieux l'intégrité des molécules thermosensibles et labiles (Franks, 1990). Le séchage à l'étuve, même à une température modérée de 50 °C, peut potentiellement entraîner une dégradation de certaines classes de composés (ex: pigments, certaines vitamines, enzymes) ou induire des réactions d'oxydation ou de Maillard (Queiroz et al., 2008). Il sera donc important, lors de l'analyse des résultats biochimiques, de considérer que les profils obtenus à partir des échantillons séchés à l'étuve pourraient différer de ceux obtenus par lyophilisation, notamment pour les molécules les plus sensibles.

Cette double approche, bien que contraignante par la logistique, pourrait néanmoins fournir des informations comparatives intéressantes sur la stabilité des biomolécules d'intérêt face à différentes méthodes de séchage (Reyes et al., 2007).

En conclusion, les méthodes d'échantillonnage et de conditionnement employées, bien que présentant certaines limites inhérentes aux contraintes techniques, logistiques et à la nature des échantillons biologiques, ont été choisies pour répondre au mieux aux objectifs de l'étude dans le contexte logistique donné.

## **CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES D'ÉCHANTILLONNAGE ET DE CONDITIONNEMENT**

La reconnaissance des biais potentiels et des limites de chaque méthode sera essentielle lors de l'interprétation des résultats génétiques et biochimiques.

### **4 Conclusion : Bilan des opérations de terrain et fondations analytiques**

En somme, ce chapitre a détaillé le matériel et les protocoles méthodologiques rigoureux mis en œuvre pour l'échantillonnage de 8 espèces d'invertébrés marins sur les côtes d'Aïn Beniane et Béni Saf, ainsi que pour le prétraitement et le conditionnement différencié des échantillons destinés aux analyses génétiques et biochimiques.

Les choix opérés, tels que la collecte sélective en plongée SCUBA et les stratégies de conservation adaptées (congélation à -80 °C pour l'ADN, lyophilisation et séchage à 50 °C pour la biochimie), visent à fournir une base matérielle de la meilleure qualité possible pour répondre aux objectifs de l'étude, tout en tenant compte des contraintes logistiques (Anchordoquy et Molina, 2007; Howell et al., 2014).

L'identification préliminaire basée sur la morphologie externe, bien qu'utile sur le terrain, a été reconnue comme nécessitant une validation moléculaire ultérieure (Knowlton, 1993). De même, les limites inhérentes aux méthodes d'échantillonnage (biais du plongeur) et de séchage (impact potentiel de l'étuve) ont été discutées et devront être prises en compte lors de l'interprétation des résultats finaux (Andrew et Mapstone, 1987; Queiroz et al., 2008).

Malgré ces limites, les procédures décrites assurent une traçabilité complète et fournissent des échantillons préservés selon des standards reconnus, constituant ainsi un fondement solide pour les investigations génétiques et biochimiques qui seront présentées dans les chapitres suivants.

**CHAPITRE III. ANALYSE  
GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION  
MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES  
MARINES**

---

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

L'identification précise des espèces constitue la pierre angulaire de toute étude écologique, biogéographique ou de valorisation biotechnologique de la biodiversité marine (Costello et al., 2010; Mora et al., 2011). Cependant, comme souligné dans le chapitre précédent, l'identification basée uniquement sur des critères morphologiques présente d'importantes limitations dans l'environnement marin. De nombreux organismes marins, particulièrement les invertébrés benthiques, présentent une plasticité phénotypique considérable, possèdent des stades larvaires morphologiquement distincts des adultes, ou appartiennent à des complexes d'espèces cryptiques indiscernables à l'œil nu (Knowlton, 1993; Pante et al., 2015). Ces difficultés taxonomiques peuvent conduire à des erreurs d'identification, compromettant ainsi la fiabilité des inventaires de biodiversité, des évaluations de stocks et de la traçabilité des ressources exploitées (Wares et al., 2001; Bucklin et al., 2011).

Face à ces défis, les outils moléculaires, notamment le séquençage d'ADN, se sont imposés comme une approche complémentaire, voire essentielle, pour une identification taxonomique fiable et standardisée (Hebert et al., 2003; Stoeckle et Thaler, 2014). Le principe repose sur le séquençage d'une région courte et standardisée d'ADN où la variation interspécifique dépasse généralement la variation intraspécifique, permettant ainsi d'attribuer un spécimen inconnu à une espèce connue par comparaison avec des bases de données de référence (Ratnasingham et Hebert, 2007). Pour les métazoaires, le gène mitochondrial de la cytochrome c oxydase I (COI) est le marqueur le plus largement utilisé (Hebert et al., 2003). Cependant, pour certains groupes d'invertébrés marins, l'amplification du COI peut s'avérer difficile, et des marqueurs ribosomiques nucléaires, comme le gène codant pour la petite sous-unité ribosomique 18S (ARNr 18S), sont souvent préférés ou utilisés de façon complémentaire (Machida et al., 2009; Tang et al., 2012; Cowart et al., 2015). Le gène 18S, de par sa nature conservée flanquée de régions plus variables, est particulièrement utile pour les assignations taxonomiques à des niveaux supérieurs (genre, famille) et pour l'étude de la diversité phylogénétique au sein de divers groupes d'invertébrés (Fontaneto et al., 2009 ; Pawlowski et al., 2012).

La mise en œuvre d'analyses génétiques sur des organismes marins collectés en milieu naturel implique plusieurs étapes critiques, depuis l'extraction d'ADN de qualité suffisante jusqu'à l'obtention de séquences interprétables. Les tissus marins peuvent être riches en polysaccharides, polyphénols ou autres métabolites secondaires qui peuvent co-précipiter avec l'ADN et inhiber les réactions enzymatiques ultérieures comme la Réaction en Chaîne par Polymérase (PCR) (Schrader et al., 2012; Demesye et al., 2013). L'optimisation des protocoles d'extraction et de purification est donc souvent nécessaire pour surmonter ces inhibitions et obtenir un ADN utilisable (Moreira et al., 2011 ; Sharma et al., 2014).

Ce chapitre détaille l'ensemble du flux opérationnel mis en œuvre pour l'analyse génétique de 8 espèces d'invertébrés marins collectées le long de la côte algérienne. Il décrit les protocoles utilisés pour l'extraction d'ADN génomique, les contrôles qualité quantitatifs et qualitatifs, l'amplification par PCR du marqueur ARNr 18S, la purification des produits PCR, et le séquençage.

Les résultats obtenus à chaque étape sont présentés, et les séquences obtenues sont analysées pour confirmer l'identité taxonomique des espèces étudiées. L'objectif étant de fournir une évaluation transparente de la faisabilité et des résultats de l'approche d'identification moléculaire dans le contexte de cette étude, contribuant ainsi à l'établissement d'une base de référence génétique pour la faune marine algérienne.

### 1 Matériel

Cette section décrit en détail le matériel et les protocoles expérimentaux mis en œuvre pour l'analyse génétique des échantillons d'invertébrés marins collectés.

## **CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES**

Le matériel spécifique utilisé lors des analyses génétiques est résumé dans l'Annexe II.

### **2 Méthodes**

#### **2.1 Extraction de l'ADN génomique**

L'extraction d'ADN génomique de haute qualité est une étape préliminaire essentielle pour les analyses moléculaires. Compte tenu de la nature des tissus marins potentiellement riches en inhibiteurs, l'utilisation d'une méthode adaptée a été nécessaire.

Pour ce faire, deux méthodes ont été suivies :

##### **2.1.1 Extraction ADN en utilisant le kit AIONA**

L'extraction de l'ADN génomique des échantillons animaux marins a initialement été tentée en utilisant le kit d'extraction AIONA, développé par l'équipe de la Plateforme de Technologie Génomique, l'École Supérieure des Sciences Biologiques d'Oran (ESSBO), pour l'échantillon d'holothurie (concombre de mer).

##### **Étapes détaillées:**

###### **Préparation de l'échantillon :**

- Peser l'échantillon.
- Rinçage à l'eau de mer stérile, puis à l'eau distillée.
- Séchage en tapotant avec un peu de papier absorbant.
- Broyage dans l'azote liquide à l'aide d'un mortier et pilon.
- Stockage temporaire possible à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

###### **Lyse cellulaire :**

- Ajouter progressivement le tampon de lyse préchauffé à  $70^{\circ}\text{C}$  (volume adapté à la quantité : 3 ml pour 200 mg d'échantillon).
- Homogénéiser soigneusement.
- Transférer le broyat dans un tube de 15 ml.
- Incuber à  $65^{\circ}\text{C}$  pendant 1h 30 min.
- Homogénéisation.
- Laisser refroidir (sur glace ou à température ambiante).

###### **Extraction organique :**

- Ajouter un volume égal de chloroforme:isoamyl alcool (24:1).
- Homogénéiser pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 10 000 rpm pendant 15 min.
- Récupérer délicatement la phase aqueuse (surnageant) dans un nouveau tube.
- Répéter l'extraction avec chloroforme au moins 2 fois.

###### **Préparation pour liaison sur colonne :**

- Si l'échantillon est riche en mucilage (comme l'holothurie), ajouter 1/10 vol de NaCl 5M.
- Ajouter 3 volumes de tampon de liaison du kit

## **CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES**

- Homogénéiser.
- Charger 700 µL max par passage sur la colonne de silice.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 2 min, répéter jusqu'à chargement complet.

### **Lavage de la colonne :**

- Ajouter 500 µL de Wash 1, centrifuger.
- Répéter l'étape.
- Ajouter 750 µL de Wash 2, centrifuger.
- Répéter l'étape.
- Centrifuger à vitesse max – 2 min pour sécher la colonne.

### **Élu-tion de l'ADN :**

- Placer la colonne dans un eppendorf propre.
- Ajouter 100 µL de tampon d'élution préchauffé (Tris-HCl 10 mM, pH 8, à 65 °C, possibilité d'utiliser l'eau distillée stérile).
- Incuber à température ambiante pendant 5 minutes.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 2 min.
- Répéter cette étape une deuxième fois (recommandé).

### **Stockage de l'ADN :**

- Conserver l'ADN extrait à :
  - –20 °C pour un usage à court terme
  - –80 °C pour un stockage à long terme

### **Traitement à l'ARNase :**

- Ajouter 15 µL d'ARNase dans 200 µL de la solution d'ADN.
- Incuber à 37 °C pendant 1h.
- Incuber à 78 °C pendant 15 min pour désactiver l'enzyme.
- Refroidissement (sur glace)

### **2.1.2 Extraction ADN en utilisant le protocole CTAB optimisé**

La méthode d'extraction retenue est basée sur le protocole CTAB (Doyle et Doyle, 1987), connu pour sa capacité à éliminer les polysaccharides et polyphénols (Porebski et al., 1997; Sharma et al., 2014).

#### **Lyse cellulaire et extraction initiale**

- Broyage en poudre fine à l'aide d'un mortier et pilon pré-refroidis, éventuellement avec une petite quantité de sable stérile.
- Ajouter 10 mL de tampon CTAB préchauffé (65 °C) par gramme de tissu broyé.
- Mélanger doucement par inversion (ne pas vortexer pour éviter la fragmentation de l'ADN).

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

- Incuber à 65 °C pendant 60 min pour les invertébrés marins en agitant toutes les 10 à 15 min.
- Laisser refroidir à température ambiante.
- Ajouter 1/10 du volume de NaCl 5M (soit ~100 µL pour 1 mL de lysat) (optionnel mais recommandé pour algues et mucus).
- Bien mélanger.

### Extraction organique :

- Ajouter un volume égal de chloroforme:isoamyl alcool (24:1).
- Mélanger doucement par inversion pendant 5 min.
- Centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 à 15 min à 4 °C.
- Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube.
- (Facultatif : refaire une seconde extraction si présence de lipides ou turbidité.)

### Précipitation de l'ADN à l'isopropanol (overnight) :

- Ajouter 0.6 volume d'isopropanol froid (-20 °C).
- Mélanger doucement.
- Incuber overnight (12–18h) à -20 °C pour maximiser la précipitation.

### Centrifugation et lavage :

- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 20 min à 4 °C.
- Jeter le surnageant délicatement (le pellet blanc contient l'ADN).
- Laver le pellet avec 1 mL d'éthanol 70 % froid.
- Centrifuger à nouveau 10 min, jeter l'éthanol.
- Répéter le lavage à l'éthanol une deuxième fois (recommandé).
- Laisser sécher à l'air libre 10–15 min (ne pas trop sécher !).

### Purification sur colonne de silice (*remplace la précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol*)

- Mesurer le volume de la phase aqueuse.
- Ajouter 3 volumes de tampon de liaison (binding buffer) pour 1 volume de phase aqueuse.
  - Pour les holothuries : ajouter 1/10 du volume de NaCl 5 M pour aider à éliminer les mucopolysaccharides.
- Mélanger doucement par inversion.
- Charger jusqu'à 700 µL du mélange sur la colonne de silice.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 2 min.
- Jeter l'écoulement et répéter jusqu'à ce que tout le mélange ait traversé la colonne.
- Lavage avec le Wash 1 puis le Wash 2.
- Centrifuger à 14 000 rpm pendant 2 min après chaque lavage
- Centrifuger la colonne vide à vitesse maximale pendant 2 minutes.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

### Élution :

- Placer la colonne dans un tube propre de 1,5 mL.
- Ajouter 100 µL de tampon d'élution (Eau distillée stérile) préchauffé (65 °C) au centre de la membrane.
- Incuber à température ambiante pendant 2–5 minutes.
- Centrifuger à 12 000 rpm pendant 1 minute.

### Élution supplémentaire optionnelle :

Ajouter encore 100 µL de tampon d'élution, incuber et centrifuger pour récupérer davantage d'ADN (utile pour les échantillons riches en polysaccharides).

### Traitement à la RNase

- Ajouter 15 µL de RNase A à 200 µL de solution d'ADN.
- Incuber à 37 °C pendant 1 heure.
- Inactiver la RNase par chauffage à 70 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir sur glace.

### Conservation de l'ADN

- Court terme : à –20 °C
- Long terme : à –80 °C dans des tubes bien scellés

## 2.2 Contrôle qualité et quantification de l'ADN

La concentration et la pureté de l'ADN extrait ont été évaluées par un contrôle quantitatif et qualitatif. Le contrôle quantitatif a été réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre ScanDrop<sup>2</sup>, qui a permis de déterminer la concentration d'ADN et d'estimer sa pureté via les ratios d'absorbance A260/A280 et A260/A230. Un ratio A260/A280 d'environ 1,8 est considéré comme idéal pour l'ADN pur.

Le contrôle qualitatif a été effectué par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %, permettant de visualiser l'intégrité de l'ADN génomique et de détecter d'éventuelles dégradations ou contaminations par l'ARN.

## 2.3 Amplification du gène de l'ARNr 18S et COI

### 2.3.1 Les gènes de l'ARNr 18S et du cytochrome c oxydase sous-unité I (COI) ont été amplifiés par PCR.

Les amorces spécifiques pour ces gènes ont été synthétisées avec le MerMade 4, un synthétiseur d'oligonucléotides de haute performance. Le gène de COI a été amplifié en utilisant un jeu d'amorces animales wobble contenant des bases dégénérées pour assurer une couverture taxonomique plus large des régions conservées du gène COI, couramment utilisée pour l'identification génétique des espèces animales (Hebert et al., 2003).

La taille attendue de l'amplicon pour les amorces COI wobble est d'environ ~658 bp paires de bases. Pour le gène 18S, des amorces universelles ont été utilisées, permettant l'amplification d'une région d'environ ~1,150 bp paires de bases.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

**Tableau 5.** Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des gènes 18S rRNA et COI chez les espèces marines

Cible génétique	Type d'amorces	Séquence Forward (5'-3')	Séquence Reverse (5'-3')	Taille attendue de l'amplicon	Référence
18S rRNA (Eucaryotes)	Universelles	GTAGTCATATGCT GTCTC	CTT CCG TCA ATT CCT TTA AG	~1 150 pb	Lin et al., 2012
COI mitochondrial (animaux)	Dégénérées (wobble primers)	GGTCAACAAATCA TA AAG AY ATY GG	TAA ACT TCA GGG TGACCA AAR AAY CA	~658 pb	Leray et al., 2013

L'amplification PCR du gène 18S rRNA a été réalisée pour toutes les espèces animales, à l'exception des échantillons TM et GB, et donc l'identification moléculaire de ces derniers a été réalisée à l'aide du gène mitochondrial COI (cytochrome c oxydase I).

### 2.3.2 PCR

Les conditions de PCR ont été optimisées pour chaque jeu d'amorces dans le but d'assurer une amplification spécifique et efficace.

#### 2.3.2.1 Mélange réactionnel (volume total : 25 µL)

Les réactions PCR ont été réalisées à l'aide du kit Thermo Scientific™ Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/µL), un système enzymatique basé sur une ADN polymérase thermostable dérivée de *Thermus aquaticus*, optimisée pour l'amplification standard de fragments d'ADN de petite à moyenne taille. Le kit comprend l'enzyme, un tampon 10× avec MgCl<sub>2</sub> et un mélange de dNTPs.

Un mélange réactionnel typique de 25 µL volume total a été préparé, dont la composition est résumée dans le tableau 6.

**Tableau 6.** Composants du mélange réactionnel PCR standard pour l'identification génétique

Composants	Volume/Concentration finale
Tampon Taq 10×	2,5 µL
Mélange de dNTPs (2 mM chacun)	2,5 µL (soit 0,2 mM de chaque dNTP)
Amorces forward	0,05 µM
Amorces reverse	0,05 µM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	2 mM
ADN matrice	10 pg – 1 µg
Taq DNA polymérase	1,25 unités
Eau sans nucléase (nuclease-free)	Compléter jusqu'à 25 µL
Volume total	25 µL

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

### 2.3.2.2 Conditions de cyclage thermique (Thermocycleur Applied Biosystems™ SimpliAmp™)

- **Amplification du gène 18S rRNA (amorces universelles)**
  - Dénaturation initiale : 95 °C pendant 2 minutes
  - 35 cycles :
    - Dénaturation : 95 °C pendant 1 minute
    - Hybridation : 55 °C pendant 1 minute
    - Élongation : 72 °C pendant 4 minutes
    - Élongation finale : 72 °C pendant 6 minutes
- **Amplification du gène mitochondrial COI (amorces dégénérées)**
  - Dénaturation initiale : 95 °C pendant 10 minutes
  - 30 cycles :
    - Dénaturation : 95 °C pendant 10 secondes
    - Hybridation : 55 °C pendant 30 secondes (température ajustée à la dégénérescence des amorces)
    - Élongation : 72 °C pendant 1 minute
    - Élongation finale : 72 °C pendant 7 minutes

### 2.4 Purification des produits PCR

Les produits PCR amplifiés ont été purifiés à l'aide d'ExoSAP-IT pour éliminer les amorces résiduelles et les nucléotides non incorporés, améliorant ainsi l'efficacité du séquençage. Cette étape est cruciale pour obtenir des séquences de haute qualité en réduisant le bruit de fond et les signaux non spécifiques lors de l'analyse par séquençage.

### 2.5 Contrôle qualité des produits PCR

Après amplification, les produits PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,2 %. La migration a été effectuée à 100 V pendant 45 minutes. La taille des amplicons a été estimée par comparaison avec un marqueur de poids moléculaire (échelle 100 pb).

### 2.6 Réactions de séquençage BigDye

Le séquençage à haute résolution a été réalisé en utilisant le kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Ce protocole est basé sur la méthode de terminaison de chaîne par didésoxynucléotides (méthode de Sanger), qui utilise des nucléotides modifiés (didésoxynucléotides, ddNTPs) pour arrêter la synthèse de l'ADN à des positions spécifiques.

Chaque ddNTP est marqué par un fluorochrome différent, permettant la détection des fragments d'ADN terminés. Les réactions de séquençage ont ciblé à la fois les brins sens et antisens pour chaque isolat, permettant une couverture complète et une validation croisée des séquences obtenues.

Un mélange réactionnel typique de 10 µL a été préparé, contenant :

- 1 µL de BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix
- 1 µL de tampon de séquençage 5X

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

- 0,5 µM d'amorce de séquençage (identique aux amorces PCR)
- 50-100 ng d'ADN amplifié

Les cycles de séquençage ont été réalisés sur un thermocycleur et comprenaient généralement 25 cycles de :

- Dénaturation : 96 °C pendant 10 secondes
- Hybridation : 50 °C pendant 5 secondes
- Élongation : 60 °C pendant 4 minutes

### 2.7 Purification des produits de séquençage

Les réactions de séquençage ont été purifiées à l'aide du kit DynaBeads Sequencing Clean-Up (Thermo Scientific). Ce kit utilise des billes magnétiques et un lavage à l'éthanol 70 % pour éliminer les colorants non incorporés et les sels, garantissant ainsi des lectures de haute qualité et minimisant les interférences lors de l'analyse par électrophorèse capillaire. La purification est essentielle pour obtenir des chromatogrammes de séquençage clairs et précis.

### 2.8 Séquençage et contrôle qualité

Les produits purifiés ont été analysés sur un analyseur génétique Sanger (Applied Biosystems 3500). Cet instrument permet la séparation des fragments d'ADN marqués par fluorescence en fonction de leur taille, générant des données de séquence brutes au format .ab1 pour une analyse ultérieure. Le principe de l'électrophorèse capillaire repose sur la migration des fragments d'ADN chargés négativement à travers un capillaire rempli d'un polymère (POP7 Polymer Standard) sous l'effet d'un champ électrique. Les fragments sont détectés par un laser à mesure qu'ils passent devant une fenêtre de détection, et les signaux fluorescents sont convertis en un chromatogramme.

Le contrôle qualité du séquençage a été effectué en examinant visuellement les chromatogrammes pour détecter les pics superposés, les signaux faibles ou les arrêts prématurés, qui pourraient indiquer des problèmes de pureté de l'ADN ou de la réaction de séquençage.

### 2.9 Analyse bioinformatique préliminaire

Bien que l'équipe de l'ESSBO ait effectué une analyse bioinformatique préliminaire, nous avons réalisé notre propre analyse pour maîtriser l'ensemble du processus et approfondir notre compréhension. Les étapes suivantes ont été réalisées :

- **Visualisation et Correction des Séquences :** Les fichiers de séquences brutes (.ab1) ont été importés dans le logiciel Chromas (Technelysium Pty Ltd). Chromas a été utilisé pour la visualisation des chromatogrammes, la vérification de la qualité des bases, la suppression des régions de faible qualité aux extrémités des séquences, et la correction manuelle des erreurs de lecture (par exemple, les chevauchements de pics ou les bases ambiguës). Les séquences corrigées ont été exportées au format FASTA.

- **Recherche d'Homologie et Identification des Espèces :** Pour l'identification taxonomique des espèces, les séquences d'ADN obtenues ont été soumises à la base de données GenBank du NCBI (National Center for Biotechnology Information) via l'outil BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). BLAST permet de comparer une séquence nucléotidique ou protéique donnée à une base de données de séquences et d'identifier les séquences similaires. Les résultats de BLAST ont été utilisés pour confirmer l'identité des espèces en se basant sur le pourcentage de similarité avec les séquences de référence les plus proches.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

• **Alignement des Séquences et Construction d'Arbres Phylogénétiques** : L'alignement des séquences a été effectué à l'aide du logiciel MEGA 12 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12). MEGA 12 a également été utilisé pour la construction d'arbres phylogénétiques. La méthode d'inférence phylogénétique de Maximum de Vraisemblance (Maximum Likelihood) a été appliquée. La robustesse des arbres a été évaluée par des analyses de bootstrap (500 et 1000 réplicats).

### 3 Résultats génétiques

Cette section présente les résultats obtenus à chaque étape clé du processus d'analyse génétique, depuis l'extraction de l'ADN jusqu'aux tentatives de séquençage.

#### 3.1 Extraction et contrôle qualité de l'ADN génomique

Suite à l'échec de la méthode d'extraction initiale avec le kit AIONA sur les échantillons de concombre de mer après trois tentatives, le protocole CTAB optimisé a été appliqué à l'ensemble des espèces d'invertébrés marins collectées. Cette méthode a permis d'obtenir de l'ADN génomique pour toutes les espèces traitées.

Les résultats de la quantification et de l'évaluation de la pureté de l'ADN par spectrophotométrie (Scandrop) sont présentés dans le Tableau 7.

**Tableau 7.** Quantification et pureté de l'ADN génomique extrait des espèces animales marines.

Code de l'échantillon	Pureté d'ADN (A260/A280)	Concentration ADNdb (ng/μl)
CRX	2.10	63.67
C	1.41	76.06
EO	1.90	211.77
Gor A	1.83	256.70
Gor T	1.90	572.30
MD	1.82	300.00
AOR	1.88	50.41
GB	1.40	60.43
TM	2.30	345.98

Légende : CRX, C, EO, Gor A, Gor T, MD, AOR, GB, TM représentent les codes des différentes espèces animales analysées. Pureté mesurée par le ratio d'absorbance A260/A280.

Les concentrations d'ADN obtenues varient considérablement entre les espèces, allant de 50.41 ng/μL (AOR) à 572.30 ng/μL (Gor T). Ces variations peuvent refléter des différences interspécifiques dans la cellularité des tissus, l'efficacité de l'extraction, ou la quantité de tissu initial utilisée. Néanmoins, pour la majorité des échantillons, les concentrations obtenues sont largement suffisantes pour les analyses PCR ultérieures (typiquement > 10 ng/μL requis) (Sambrook & Russell, 2001).

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

Concernant la pureté, les ratios A260/A280 se situent majoritairement entre 1.8 et 2.0 (EO, GOR A, GOR T, MD, AOR), indiquant une contamination protéique faible et acceptable pour la plupart des applications moléculaires (Glasel, 1995). Cependant, certains échantillons présentent des ratios en dehors de cette plage optimale : 1.40 (GB) et 1.41 (C), suggérant une possible contamination résiduelle par des protéines ou d'autres composés absorbant à 280 nm ; et 2.10 (CRX) et 2.30 (TM), pouvant indiquer une contamination par de l'ARN résiduel (Wilfinger et al., 1997). Les ratios A260/A230 seraient également informatifs pour évaluer la présence de polysaccharides ou de sels résiduels, contaminants fréquents avec la méthode CTAB (Sharma et al., 2014).

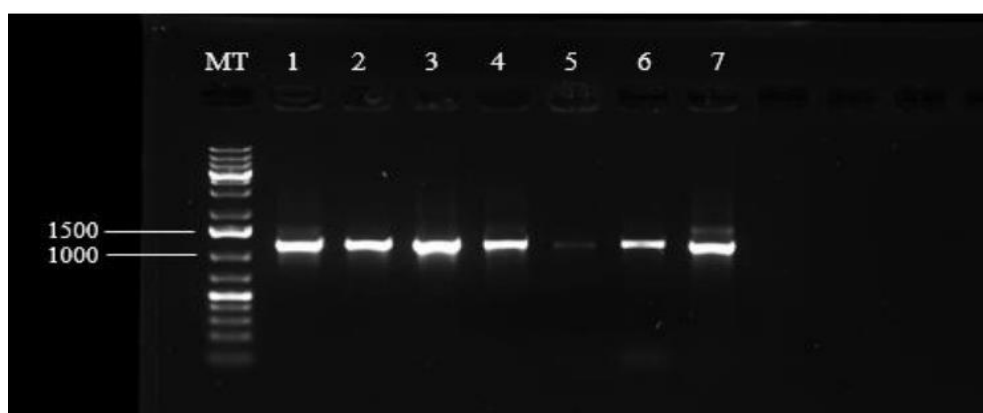
L'analyse qualitative par électrophorèse sur gel d'agarose a généralement montré la présence de bandes d'ADN de haut poids moléculaire pour la plupart des échantillons, confirmant l'intégrité globale de l'ADN extrait. Cependant, un léger "smear" (traînée) indiquant une dégradation partielle a pu être observé pour certains échantillons, potentiellement ceux présentant des ratios de pureté sous-optimaux. Malgré ces variations, la qualité générale de l'ADN a été jugée suffisante pour procéder aux étapes d'amplification, soulignant la robustesse du protocole CTAB modifié.

L'échec répété du kit AIONA sur l'holothurie a démontré la nécessité d'adapter les méthodes d'extraction aux échantillons marins complexes. L'optimisation des étapes de lyse et de purification est cruciale face à la richesse en polysaccharides et métabolites secondaires pouvant inhiber les réactions enzymatiques (Monteiro et al., 1997).

### 3.2 Amplification par PCR du gène ARNr 18S et COI

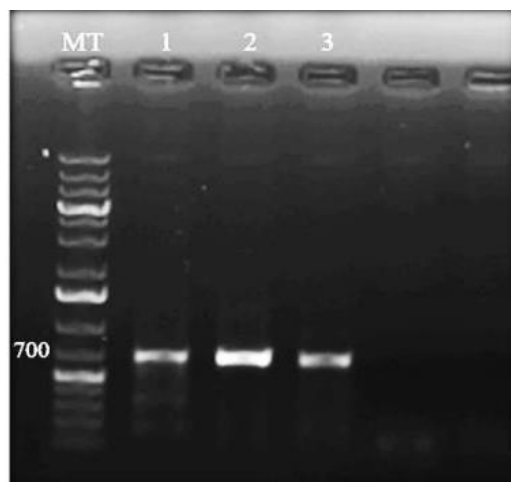
L'amplification PCR du gène 18S rRNA a été globalement réussie pour la plupart des espèces animales étudiées. Des amplicons de taille attendue (1150 pb) ont été observés sur gel d'agarose, confirmant l'efficacité des amorces utilisées. Cette performance est cohérente avec la littérature, qui souligne la robustesse du gène 18S pour l'identification des eucaryotes marins (Medlin et al., 1988).

Toutefois, pour les échantillons TM (probablement *Actinia equina*) et GB (probablement *Eunicella verrucosa*), le gène COI mitochondrial a été utilisé pour permettre l'identification moléculaire. L'amplification COI a abouti à un produit net d'environ 658 pb, démontrant l'efficacité des amorces wobble COI pour les espèces animales (Hebert et al., 2003). Les résultats des amplicons PCR des gènes 18S et COI sur gel d'agarose 1,2 % figurent dans Fig 5 et Fig 6 respectivement.



## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

**Figure 5.** Visualisation des amplicons PCR du gène 18S rRNA d'espèces animales marines sur gel d'agarose à 1,2 %. (MT : marqueur de taille d'ADN (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Pistes : 1 – CRX ; 2 – C ; 3 – EO ; 4 – GOR A ; 5 – GOR T ; 6 – MD ; 7 – AOR)



**Figure 6.** Visualisation des amplicons PCR du gène COI d'espèces animales marines sur gel d'agarose à 1,2 %. (MT : marqueur de taille d'ADN (GeneRuler 1 kb DNA Ladder). Pistes : 1 – Témoin positif ; 2 – TM ; 3 – GB).

### 3.3 Séquençage et Analyse Bioinformatique

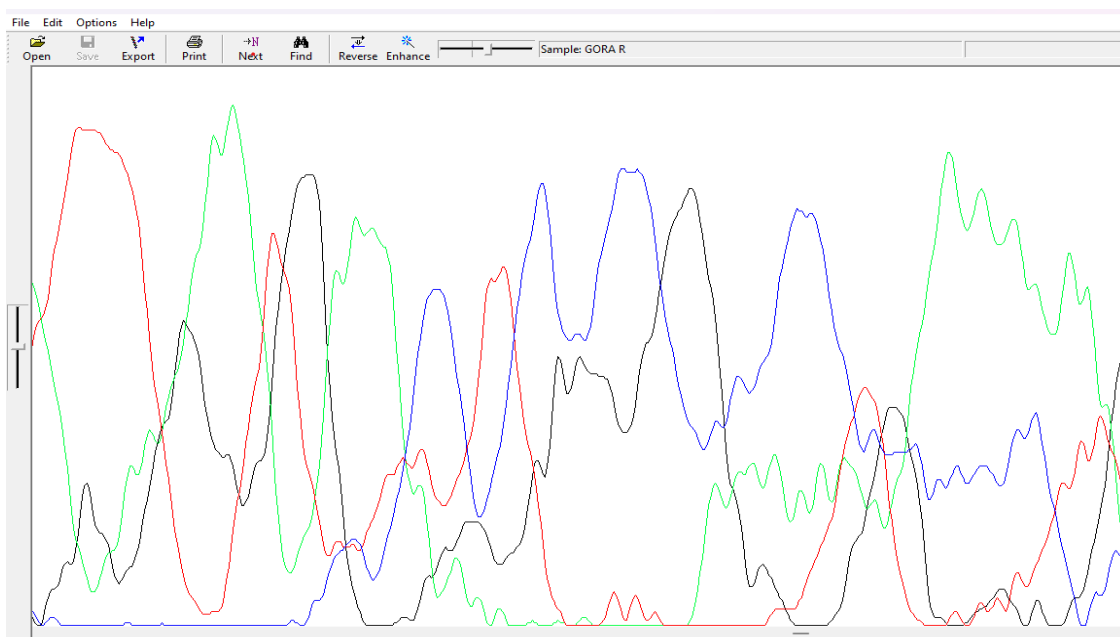
Les produits PCR purifiés ont été soumis au séquençage BigDye. Les chromatogrammes obtenus ont été analysés avec Chromas pour la visualisation et la correction des séquences. La qualité des séquences a été évaluée, et les régions de faible qualité ont été éliminées. Les séquences corrigées faisaient l'objet des analyses bioinformatiques.

Il est important de noter que pour certaines espèces (C, GB, AOR), bien que l'amplification par PCR ait été couronnée de succès, la qualité des séquences obtenues a été jugée insuffisante pour une identification taxonomique fiable via les bases de données génétiques (Fig 7). Cette insuffisance peut être attribuée à plusieurs facteurs, notamment la présence d'inhibiteurs dans les extraits d'ADN, la complexité du génome des organismes, ou des limites inhérentes aux protocoles de séquençage utilisés. Une qualité de séquence suboptimale se manifeste souvent par des signaux faibles, des chevauchements de pics ou des ambiguïtés dans les chromatogrammes, rendant l'interprétation difficile et incertaine. En conséquence, une optimisation approfondie des protocoles de séquençage est impérative pour ces échantillons.

#### 3.3.1 Résultats du Séquençage et Identification Moléculaire

Les séquences obtenues ont été soumises à des recherches d'homologie via NCBI BLAST. Le résumé des résultats d'identification moléculaire pour les espèces analysées dans le tableau 8.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES



**Figure 7.** Exemple d'une séquence de mauvaise qualité visualisée sur Chromas

**Tableau 8.** Résultats d'identification moléculaire par BLAST des séquences analysées

Séquences	Espèce probable	Query cover	% d'identité	Accession	Amorces
EO	<i>Genocidaris maculata</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	100 %	98.29%	<a href="#">AF279199.1</a>	18s
GORT	Uncultured marine dinoflagellate isolate ZBO-101 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	97%	98.96%	<a href="#">MZ621018.1</a>	18s
TM	<i>Actinia equina</i>	93 %	100%	<a href="#">PQ739553.1</a>	COI
GORA	<i>Eunicella verrucosa</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	2 %	94,12 %	<a href="#">gi469662631</a> <a href="#">HF913302.1</a>	18s
CRX	<i>Chondrosia reniformis</i> voucher KY276 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	90 %	96,39 %	<a href="#">MZ416517.2</a>	18S
MD	<i>Thesea nivea</i> voucher USNM:1695050 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	100%	98.66%	<a href="#">PP410840.1</a>	18S

### CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

• EO (*Genocidaris maculata*) : l'échantillon EO\_A, initialement identifié visuellement comme *Paracentrotus lividus*, a présenté une discordance taxonomique lors de l'analyse moléculaire. Le séquençage de l'amplicon obtenu avec les amorces 18S rRNA a révélé une similarité de 98,29 % avec *Genocidaris maculata* (Accession GenBank : AF279199.1). Cette correspondance suggère une proximité génétique significative avec *G. maculata*, remettant en question l'identification morphologique initiale.

Ce type de divergence peut s'expliquer par :

- Une ressemblance morphologique entre espèces d'oursins, particulièrement à des stades juvéniles ou selon les conditions environnementales ;
- Des limitations dans l'identification visuelle en l'absence de critères diagnostiques fins (comme les structures internes ou la micro-anatomie) ;
- Ou encore une cohabitation d'espèces proches dans la même niche écologique.

• GORT (Uncultured marine dinoflagellate isolate ZBO-101) : L'échantillon GOR T\_F, morphologiquement identifié comme une gorgone du type *Eunicella singularis*, a donné lieu à une identification moléculaire inattendue. La séquence obtenue à partir de l'amplicon 18S (brin forward) a montré 98,96 % de similarité avec un isolat de dinoflagellé marin non cultivé (*uncultured marine dinoflagellate isolate ZBO-101*, Accession GenBank : MZ621018.1). Cette correspondance ne renvoie à aucune espèce animale connue, ce qui souligne :

- Soit la présence d'un organisme symbiotique co-extrait avec l'ADN de l'hôte (comme cela est fréquent chez les gorgones, notamment avec des dinoflagellés symbiotiques du genre *Symbiodinium*),
- Soit une contamination environnementale,
- Soit un manque de données de référence pour cette espèce dans les bases de données.

Ce résultat suggère que l'ADN extrait provient principalement du symbiote plutôt que de l'animal hôte.

L'analyse de cette séquence illustre la limite des approches des amorces non spécifiques lorsque des ADN exogènes sont co-amplifiés.

• TM (*Actinia equina*) : L'échantillon TM, initialement identifié morphologiquement comme une tomate de mer (*Actinia equina*), les résultats ont montré une similarité de 100 % avec *Actinia equina* (Accession GenBank : PQ739553.1), confirmant l'identification de l'espèce.

• GORA : Bien que morphologiquement attribué à *Eunicella singularis*, l'échantillon GORA montre 96,14 % de similarité avec *Eunicella verrucosa*. Cette divergence modérée peut s'expliquer par la nature très conservée du gène 18S, qui ne capte pas toujours les différences fines entre espèces étroitement apparentées. Il est possible aussi que la population locale de *Eunicella singularis* présente une variation génétique non référencée dans GenBank, ou que l'échantillon corresponde à une hybridation naturelle entre *E. singularis* et *E. verrucosa* dans cette zone. Pour trancher, l'utilisation d'un marqueur mitochondrial plus variable (COI) ou le séquençage de fragments supplémentaires d'ARNr (ITS, 28S) serait recommandé.

• CRX (*Chondrosia reniformis*): L'échantillon CRX présente 96,17 % de similarité sur 18S avec la séquence de référence. Ce résultat un peu en-dessous du seuil habituellement attendu ( $\geq 98$  %) suggère soit une lignée géographiquement isolée à Alger, soit la co-extraction d'ADN d'un micro-symbiote ou contaminant interne. Les éponges hébergent souvent des bactéries ou

### CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

microalgues dont l'ADN peut se mêler à l'ADN hôte. Une purification plus stricte ou le séquençage d'un marqueur alternatif (COI, 28S) permettraient de confirmer l'espèce et d'éliminer l'hypothèse d'une contamination.

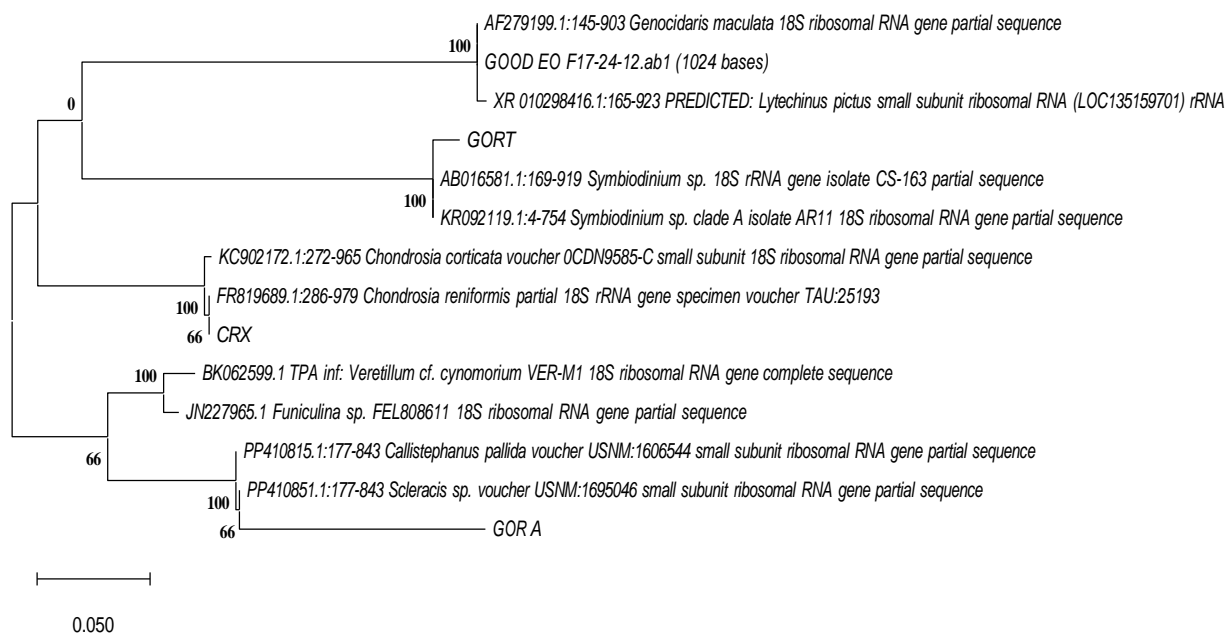
• MD : Identifié sur le terrain comme *Alcyonium acaule*, l'échantillon MD correspond en fait à 98,50 % de similarité avec le tunicier *Thesea nivea* via 18S rRNA. Ce fort score moléculaire, indique très probablement une confusion morphologique lors de la collecte. Les caractéristiques externes (couleur, forme) ont pu prêter à confusion entre corail mou et tunicier adulte fixé. Il faut donc reprendre la morphologie interne (structure des sclérites ou de la tunicine) pour valider définitivement cette attribution moléculaire et ajuster les inventaires d'espèces.

**Tableau 9.** Comparaison des identifications morphologiques et moléculaires des espèces animales étudiées

Code	Identification morphologique	Identification moléculaire (BLAST)	% Identité	Hypothèse(s)
EO	<i>Paracentrotus lividus</i>	<i>Genocidaris maculata</i> (AF279199.1)	98,29 %	Ressemblance morphologique entre espèces d'oursins ; possible erreur de terrain ; ou limites du 18S pour discrimination fine entre oursins.
GOR T	<i>Eunicella singularis</i> (Bénisaf)	Dinoflagellé marin non cultivé ( <i>Symbiodinium</i> sp.) (MZ621018.1)	98,96 %	Contamination ou co-extraction de l'ADN symbiotique ; typique chez les gorgones qui hébergent des <i>Symbiodinium</i> sp. intracellulaires.
GOR A	<i>Eunicella singularis</i> (Alger)	<i>Eunicella verrucosa</i> (DQ831272.1)	96,14 %	Mauvais positionnement morphologique; résolution insuffisante du 18S pour ce genre ; identification visuelle probablement correcte au genre mais imprécise à l'espèce.
CRX	<i>Chondrosia reniformis</i>	<i>Chondrosia reniformis</i> (FR819689.1 ; MZ416517.x)	96,17 %	Résultat très cohérent ; identifications concordantes avec morphologie et arbre phylogénétique ; séquences fiables malgré légères variations de % identité.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

TM	<i>Actinia equina</i>	<i>Actinia equina</i> (COI – PQ739553.1)	100 %	Excellente confirmation via séquençage COI; très haute fiabilité de l'identification ; illustre complémentarité des marqueurs.
----	-----------------------	--	-------	--



**Figure 8.** Arbre phylogénétique (construit avec MEGA 12) des espèces animales marines amplifiées avec le gène 18S rRNA, en utilisant "the maximum likelihood method" avec bootstrap analysis (1000 replicats).

### Interprétation

L'arbre phylogénétique (Fig 8) construit selon la méthode du Maximum de Vraisemblance, à partir des séquences du gène 18S rRNA, a permis d'évaluer avec précision les relations taxonomiques entre les différents invertébrés marins étudiés. Les pourcentages indiqués sur les branches traduisent la fiabilité statistique des regroupements observés.

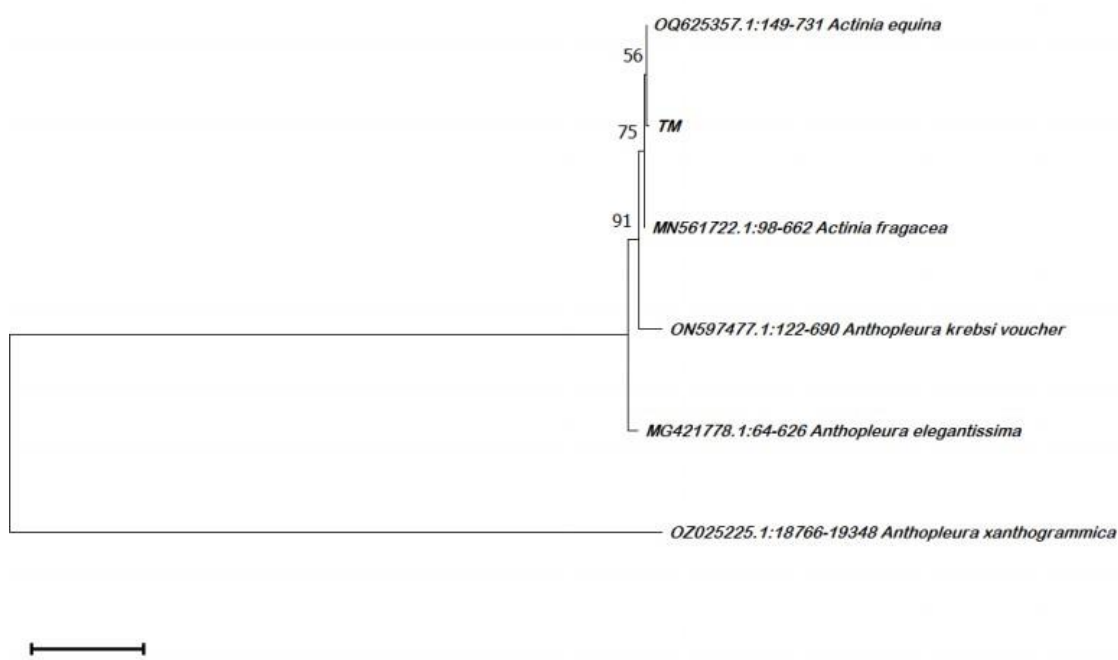
L'échantillon CRX se regroupe de façon nette et sans ambiguïté avec deux espèces du genre *Chondrosia* (*C. corticata* et *C. reniformis*), avec un appui de 100 %. Ce résultat confirme pleinement son appartenance au groupe des éponges (phylum Porifera), en cohérence avec son identification morphologique.

L'échantillon GOR T, également issu d'une gorgone récoltée à Aïn Témouchent, présente un résultat inattendu : il se regroupe fortement (100 %) avec des séquences du genre *Symbiodinium*, clade A, qui correspond à des dinoflagellés symbiotiques. Ce type d'association n'est pas rare, notamment chez les coraux mous, où ces microalgues symbiotiques vivent à l'intérieur des tissus de l'hôte. Il est donc probable que la séquence amplifiée provienne non pas de la gorgone elle-même, mais de son symbiote photosynthétique, co-extrait et co-amplifié

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

lors de l'analyse. Ce phénomène est bien documenté et témoigne de la complexité des relations hôte-symbiote dans le milieu marin.

Enfin, l'échantillon EO s'intègre parfaitement dans un clade très bien soutenu (100 %, avec un sous-clade à 96 %) regroupant les échinodermes *Lytechinus pictus* et *Genocidaris maculata*. Ce positionnement confirme sans ambiguïté son appartenance au groupe des oursins (phylum *Echinodermata*).



**Figure 9.** Arbre phylogénétique de l'échantillon TM et d'espèces apparentées d'anémones de mer, construit à l'aide du logiciel MEGA11.

L'arbre a été généré à partir des séquences du gène mitochondrial COI, selon la méthode du Neighbor-Joining avec une analyse de bootstrap (200 répliquats).

### Interprétation

L'échantillon **TM** (Fig 9) se regroupe dans le même clade que *Actinia equina*, avec laquelle il entretient une relation phylogénétique étroite. Une branche secondaire, soutenue par une valeur de bootstrap de 56 %, relie ce clade à *Actinia fragacea*, suggérant une parenté évolutive plus large au sein du genre *Actinia*.

Bien que ce soutien soit modéré, cette topologie indique que TM appartient très probablement au genre *Actinia*. Étant donné sa proximité avec *A. equina*, il pourrait correspondre à cette espèce ou à un taxon très proche.

### 3.3.2 Synthèse et interprétations

- Discordances (EO, GOR A) révèlent les limites du marqueur 18S rRNA pour certaines espèces marines, notamment dans les groupes très diversifiés ou mal représentés dans les bases de données.
- Présence d'ADN symbiotique ou environnemental (GOR T) illustre la complexité des échantillons marins et la nécessité de séparer les cellules hôtes et symbiotes si besoin.

## CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES

- CRX est l'exemple modèle d'une correspondance parfaite entre morphologie, données moléculaires, et phylogénie.

Cette approche a souligné certains cas d'identification incertaine :

- la co-extraction de symbiotes chez les gorgones;
- une possible mauvaise représentation de *Holothuria tubulosa* dans les bases de données 18S;
- des échecs de séquençage probablement liés à des inhibiteurs résiduels ou à un ADN dégradé.

### 4 Conclusion et perspectives

Ce chapitre a exploré un échantillon représentatif d'invertébrés marins dans deux sites de la côte algérienne à travers une approche intégrée, combinant l'identification classique et les techniques de biologie moléculaire. Les travaux menés ont permis d'identifier un ensemble d'espèces animales marines, mettant en lumière l'importance de leur conservation. Au-delà des résultats scientifiques, cette étude a également mis en évidence les défis inhérents à la recherche en milieu marin et l'importance d'une démarche scientifique rigoureuse et adaptative.

#### 4.1 Analyse critique de l'approche

L'approche adoptée combine l'identification morphologique et l'analyse génétique, qui représente une stratégie robuste pour la caractérisation des espèces marines. L'identification classique, basée sur l'observation visuelle et l'utilisation de fiches de détermination (Fischer et al., 1987) et de bases de données comme WoRMS et Doris, a fourni une première couche d'information essentielle. Cette méthode, bien que fondamentale, présente des limites inhérentes, notamment la difficulté à distinguer les espèces cryptiques, les variations intraspécifiques dues à la plasticité phénotypique, et la nécessité d'une expertise taxonomique approfondie (Knowlton, 1993; Tautz et al., 2003). L'intégration de l'identification génétique, via le séquençage des gènes 18S ARNr et COI, a permis de surmonter bon nombre de ces obstacles, offrant une précision accrue dans l'identification des espèces, même à partir d'échantillons fragmentés ou de stades larvaires (Hebert et al., 2003; Ward et al., 2005).

Cependant, l'application des techniques moléculaires n'a pas été sans défis. L'extraction de l'ADN, en particulier pour des organismes riches en polysaccharides comme l'holothurie, s'est avérée complexe. L'échec répété du kit AIONA, a souligné la nécessité d'adapter les protocoles aux spécificités biochimiques des échantillons marins. L'adoption du protocole CTAB modifié (Doyle et Doyle, 1987) a démontré l'importance de la flexibilité méthodologique et de la capacité à innover face aux contraintes expérimentales. Bien que le CTAB ait permis d'obtenir un ADN de meilleure qualité, des défis subsistent, notamment en termes de pureté et de concentration pour certains échantillons (Sambrook et Russell, 2001).

Les résultats de séquençage ont également présenté des taux de succès variables. L'utilisation d'amorces universelles et wobble a permis d'amplifier les gènes cibles pour toutes les espèces, mais l'absence de séquences de qualité (résultats de séquençage) pour certains échantillons, a limité la portée de l'analyse génétique. Ces échecs peuvent être attribués à plusieurs facteurs. Ces contraintes soulignent la nécessité d'optimiser davantage les protocoles de séquençage pour les espèces marines.

L'analyse bioinformatique, bien que menée en parallèle avec celle de l'ESSBO, a été cruciale pour la validation et l'interprétation des résultats. L'utilisation de logiciels comme Chromas pour la correction des séquences et MEGA 12 pour l'alignement et la phylogénie a permis une

## **CHAPITRE III. ANALYSE GÉNÉTIQUE ET IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE DES ESPÈCES MARINES**

maîtrise complète du processus, renforçant la confiance dans les identifications obtenues. La comparaison avec les bases de données publiques via NCBI BLAST a confirmé la plupart des identifications morphologiques, tout en révélant des cas de divergence ou d'identification incertaine.

### **4.2 Contraintes et inconvénients**

Plusieurs contraintes et inconvénients ont jalonné cette étude, impactant potentiellement l'exhaustivité des résultats :

- **Qualité et Quantité d'ADN** : Malgré l'optimisation des protocoles, l'obtention d'ADN de haute qualité et en quantité suffisante a été un défi constant. La présence de polysaccharides et d'autres métabolites secondaires dans les tissus marins peut interférer avec l'extraction et les réactions enzymatiques en aval (Cao et al., 2012).
- **Succès du Séquençage** : Le séquençage n'a pas été un succès pour toutes les espèces, limitant la possibilité d'obtenir des séquences complètes pour certains marqueurs génétiques. Cela a restreint la capacité à réaliser des analyses phylogénétiques plus poussées ou à confirmer l'identification pour toutes les espèces par des méthodes moléculaires (Sanger & Coulson, 1977).
- **Contamination** : La détection d'une séquence de dinoflagellé dans un échantillon animal souligne le risque de contamination ou de présence d'organismes symbiotiques/parasites, ce qui peut compliquer l'interprétation des résultats (Baker et al., 2003).

### **4.3 Perspectives**

Les résultats de cette étude ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche scientifique future en biodiversité marine et en biotechnologie en Algérie :

- **Extension de la Base de Données Génétique** : Poursuivre l'échantillonnage et l'identification moléculaire d'un plus grand nombre d'espèces marines algériennes pour enrichir la base de données génétique nationale.
- **Optimisation des Protocoles** : Développer et optimiser des protocoles d'extraction d'ADN et d'amplification PCR spécifiques pour les espèces marines difficiles, en explorant de nouvelles méthodes de lyse ou de purification pour surmonter les problèmes d'inhibiteurs (Ivanova et al., 2006).
- **Applications Biotechnologiques** : Exploiter les espèces identifiées pour la recherche de biomolécules à fort potentiel pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire. L'identification génétique précise est une étape clé pour la traçabilité et la valorisation durable de ces ressources (Jiménez et al., 2018).

En conclusion, cette étude a démontré la faisabilité et l'importance de l'identification moléculaire pour la caractérisation de la biodiversité marine algérienne. Malgré les défis méthodologiques, les résultats obtenus constituent une contribution significative à la connaissance de la faune marine locale et ouvrent la voie à des recherches futures prometteuses pour la valorisation et la conservation de ce patrimoine naturel exceptionnel.

# **CHAPITRE IV. ANALYSE BIOCHIMIQUE DES ÉCHANTILLONS MARINS**

---

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 1 Introduction

Ce chapitre présente les analyses biochimiques approfondies menées sur diverses espèces d'invertébrés marins collectées. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la composition en biomolécules d'intérêt biotechnologique, telles que les protéines, les lipides, les polysaccharides, les pigments, les saponines et les polyphénols. La compréhension de ces profils biochimiques est cruciale pour identifier les espèces ayant un potentiel élevé de valorisation dans les secteurs pharmaceutique, nutraceutique et cosmétique. En outre, cette recherche vise à contribuer à la protection de la diversité des espèces marines côtières en développant des méthodes d'utilisation respectueuses de l'environnement. Les analyses ont été réalisées en tenant compte des conditions environnementales spécifiques au moment de l'échantillonnage, afin d'offrir une interprétation contextuelle des résultats obtenus.

### 2 Matériels et Méthodes

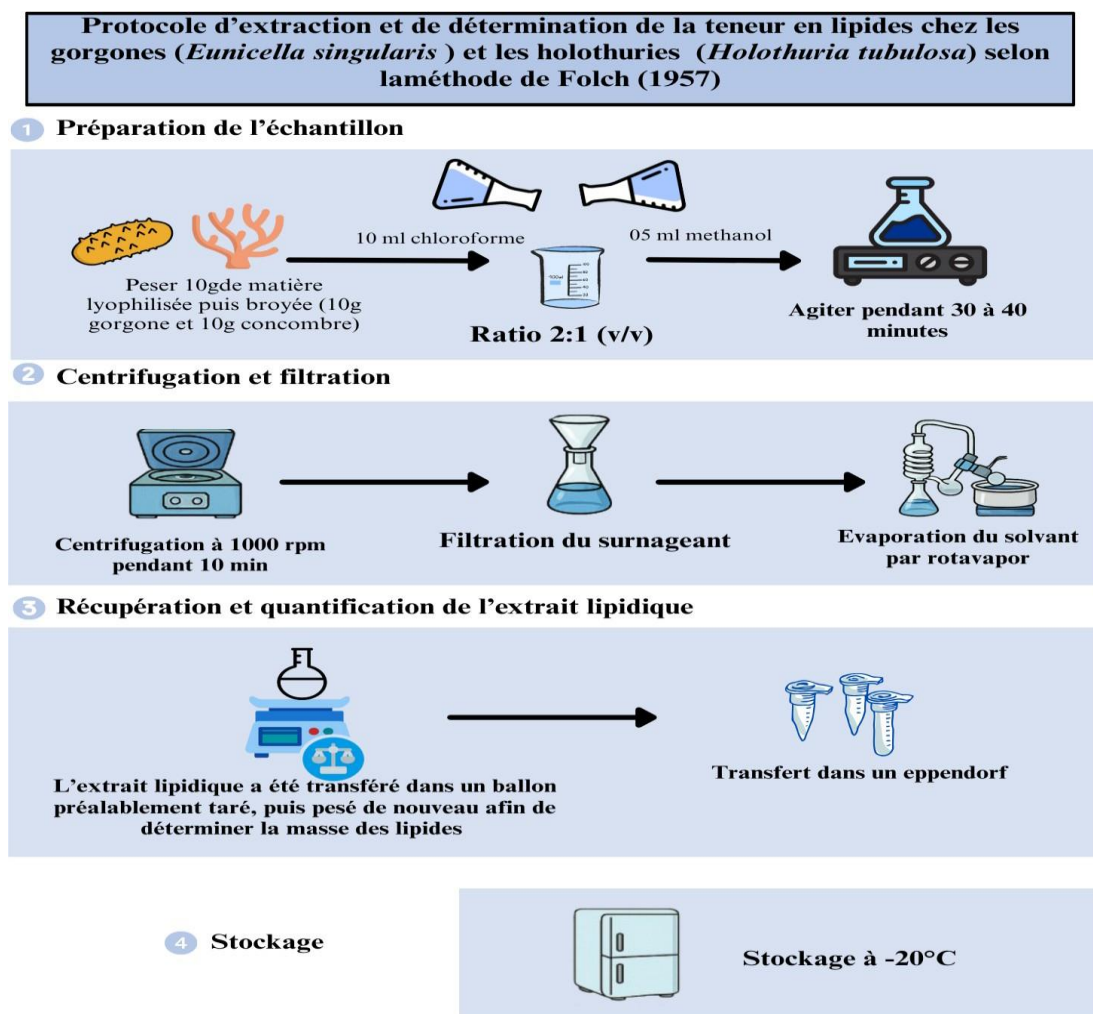
#### 2.1 Matériel

Le matériel et les réactifs utilisés pour les analyses biochimiques sont listés en Annexe III.

#### 2.2 Extraction et Quantification des Lipides

L'extraction des lipides totaux a été réalisée selon la méthode de Folch et al. (1957), une technique éprouvée pour l'isolement des lipides à partir de matrices biologiques. Cette méthode utilise un mélange de chloroforme et de méthanol (2:1, v/v) pour solubiliser efficacement les lipides tout en minimisant la co-extraction de composés non lipidiques. Le protocole détaillé est le suivant :

10 g de matière lyophilisée (*Eunicella singularis* et *Holothuria tubulosa*) ont été pesés avec précision et transférés dans un bécher. Un volume de 10 mL de chloroforme et 5 mL de méthanol a été ajouté, portant le volume total de solvant à 15 mL. Le mélange a été agité à température ambiante pendant 30 à 40 minutes pour assurer une solubilisation complète des lipides dans la phase chloroformique. Après agitation, la solution a été centrifugée à 1000 tr/min pendant 10 minutes pour séparer la phase lipidique du résidu solide. Le surnageant, contenant les lipides extraits, a été filtré sur papier Whatman pour éliminer les particules résiduelles. La phase lipidique filtrée a ensuite été transférée dans un ballon taré, et les solvants ont été évaporés à l'aide d'un évaporateur rotatif jusqu'à l'obtention d'un extrait lipidique sec. La teneur en lipides a été déterminée par gravimétrie, en pesant le ballon avec l'extrait lipidique sec et en soustrayant le poids initial du ballon vide. Les extraits lipidiques ont été conservés à -20 °C pour les analyses ultérieures. (Fig 10)



**Figure 10.** Schéma du protocole d'extraction et de détermination de la teneur en lipides chez les gorgones (*Eunicella singularis*) et les holothuries (*Holothuria tubulosa*) selon la méthode de Folch (1957).

### 2.3 Détermination des Matières Azotées Totales (MAT)

La détermination des matières azotées totales (MAT) a été effectuée par la méthode de Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), une technique de référence pour la quantification de l'azote total et l'estimation des protéines brutes. Cette méthode se déroule en trois étapes principales :

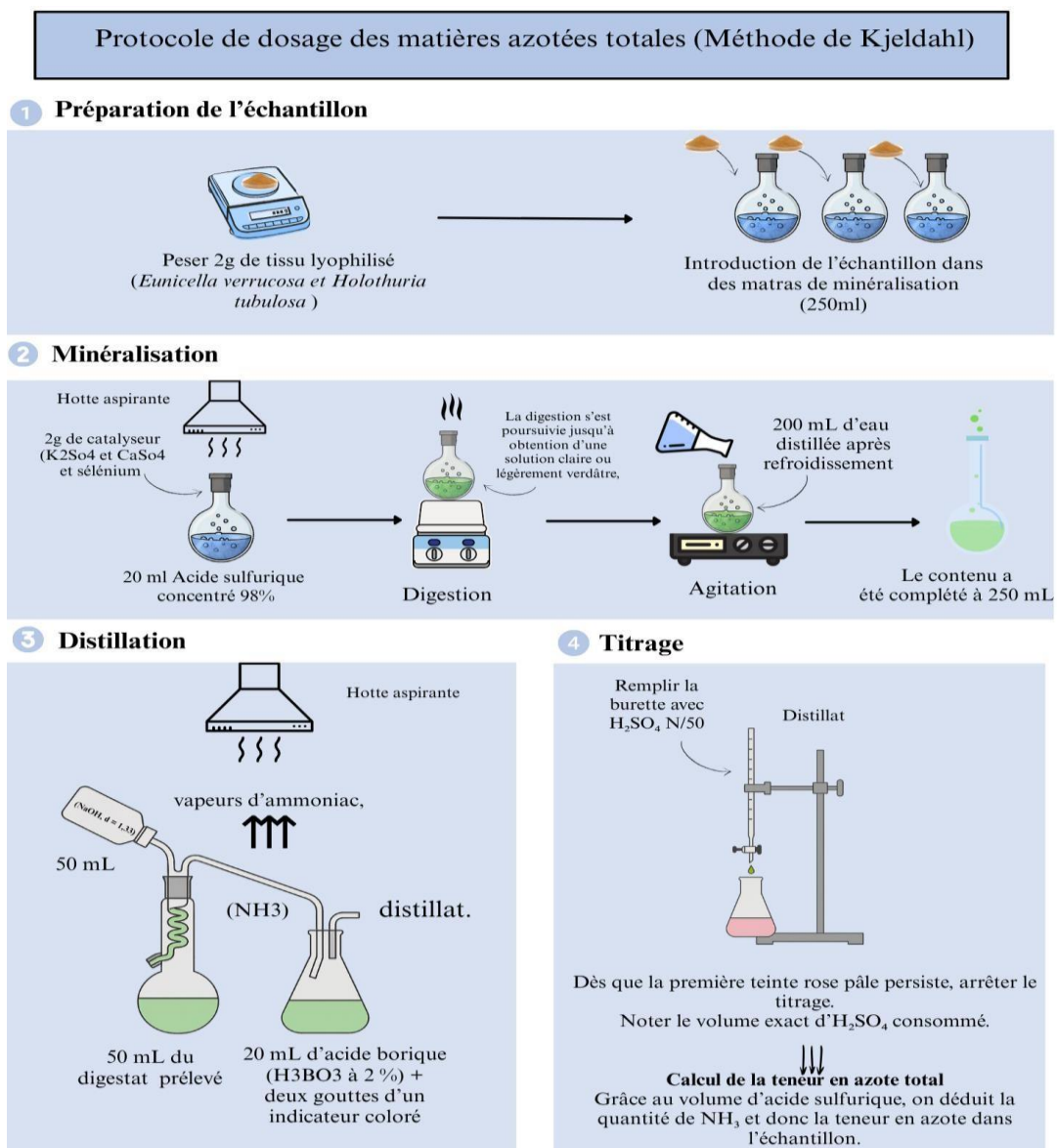
**Minéralisation :** 2 g de tissu lyophilisé (*Eunicella singularis* et *Holothuria tubulosa*) ont été pesés et transférés dans des matras de minéralisation de 250 mL. 2 g de catalyseur (mélange de  $K_2SO_4$ ,  $CaSO_4$  et sélénium) et 20 mL d'acide sulfurique concentré (98 %) ont été ajoutés. La minéralisation a été réalisée sous hotte aspirante sur un bloc digesteur, chauffé progressivement jusqu'à ébullition, jusqu'à l'obtention d'une solution claire. Après refroidissement, 200 mL d'eau distillée ont été ajoutés lentement sous agitation, et le volume final a été ajusté à 250 mL dans une fiole jaugée.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

**Distillation :** Un volume de 50 mL du digestat a été prélevé et introduit dans un appareil de distillation Büchi. Cinquante millilitres de soude concentrée (NaOH,  $d = 1,33$ ) ont été ajoutés pour libérer l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ). L'ammoniac dégagé a été capté dans un erlenmeyer contenant 20 mL d'acide borique ( $\text{H}_3\text{BO}_3$  à 2 %) et deux gouttes d'un indicateur coloré (mélange de rouge de méthyle et de vert de bromocrésol). La distillation a été poursuivie jusqu'à l'obtention d'un volume total de 100 mL de distillat.

**Titrage :** L'ammoniac retenu dans la solution d'acide borique a été dosé par titrage à l'aide d'une solution d'acide sulfurique  $\text{H}_2\text{SO}_4$  N/50. Le titrage a été effectué jusqu'au virage de l'indicateur coloré (passage du vert au rose pâle). Le volume d'acide sulfurique consommé a été noté pour le calcul ultérieur de la teneur en azote total.

Afin de mieux visualiser les différentes étapes réalisées en laboratoire, le protocole d'extraction et de détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT) appliqué aux gorgones et aux holothuries, basé sur la méthode de Kjeldahl, est illustré dans Fig 11.



**Figure 11.** Schéma du protocole d'extraction et de détermination de la teneur en matières azotées totales (MAT) appliqué aux gorgones et aux holothuries, basé sur la méthode de Kjeldahl

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 2.4 Extraction des Saponines

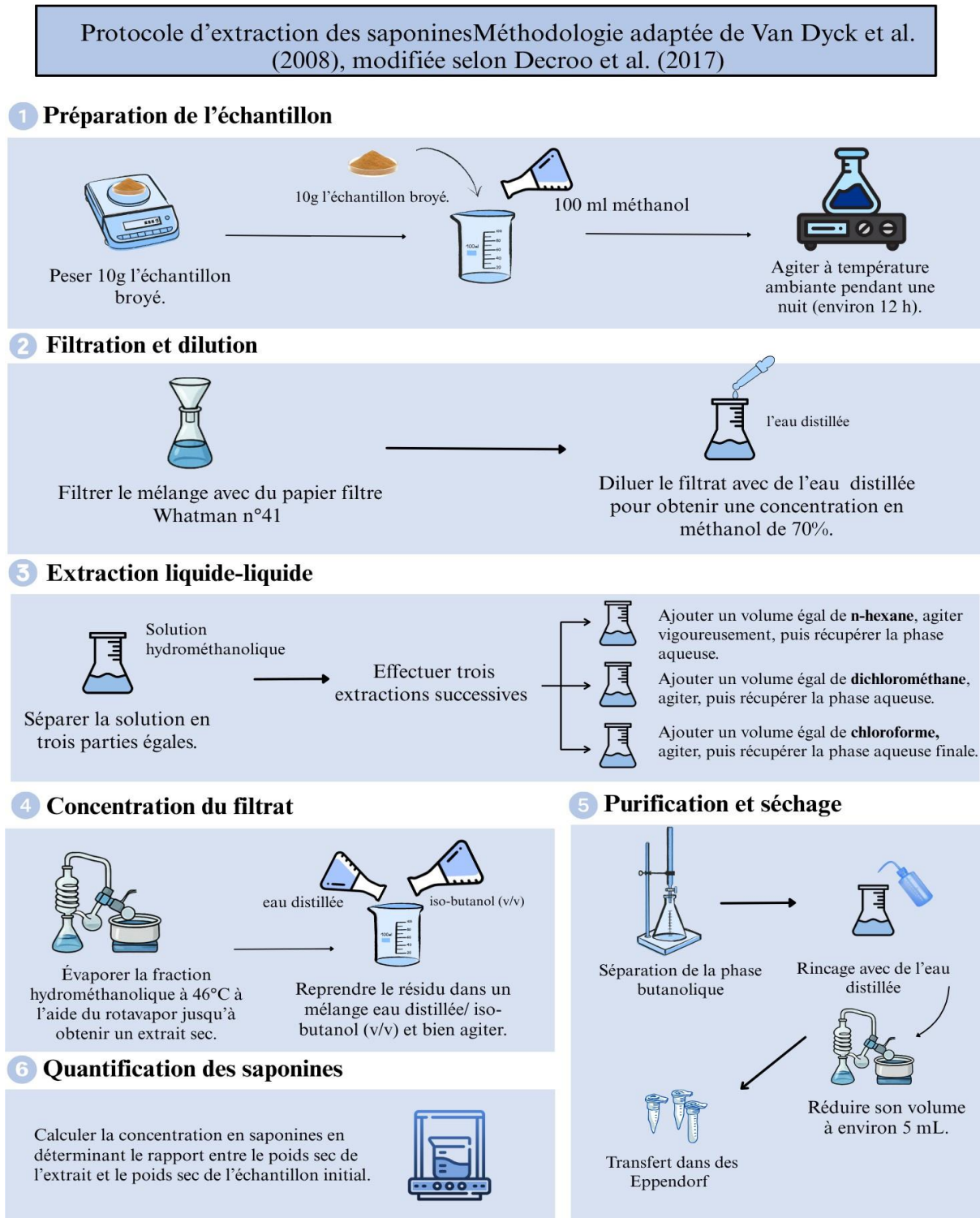
L'extraction des saponines a été réalisée selon une méthodologie adaptée de Van Dyck et al. (2008), modifiée selon Decroo et al. (2017). Cette méthode repose sur une extraction liquide-liquide séquentielle à partir d'un extrait hydro-méthanolique initial, exploitant les différences de polarité des solvants pour séparer sélectivement les saponines des autres composés. Le protocole est le suivant :

10 g de poudre lyophilisée (*Holothuria tubulosa*, *Eunicella singularis* et *Chondrosia reniformis*) ont été mis en contact avec 100 mL de méthanol pur (CH<sub>3</sub>OH) sous agitation magnétique constante à température ambiante pendant 12 heures. L'extrait méthanolique brut a été filtré sur papier Whatman n°41. Le filtrat a été dilué avec de l'eau distillée pour ajuster la concentration méthanolique finale à 70 % (v/v). La solution hydro-méthanolique a été répartie en trois fractions égales et soumise à une série d'extractions liquide-liquide :

- 1. Première extraction (n-hexane) :** Un volume équivalent de n-hexane a été ajouté. Après agitation et décantation, la phase aqueuse supérieure a été récupérée pour éliminer les composés apolaires.
- 2. Deuxième extraction (dichlorométhane) :** La phase aqueuse a été traitée de manière identique avec du dichlorométhane. La phase aqueuse a été conservée après séparation.
- 3. Troisième extraction (chloroforme) :** Une extraction finale au chloroforme a été réalisée. La phase aqueuse finale, enrichie en saponines, a été concentrée par évaporation sous vide à 46°C jusqu'à l'obtention d'un résidu sec. Ce résidu a été solubilisé dans un mélange biphasique eau distillée/iso-butanol (1:1, v/v). La phase butanolique, contenant les saponines, a été isolée par décantation, rincée à l'eau distillée et concentrée par évaporation rotative.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

Afin de mieux visualiser les différentes étapes réalisées en laboratoire, voici un schéma illustrant le protocole en Fig 12.



**Figure 12.** Schéma du protocole d'extraction des saponines selon Van Dyck et al. (2008), modifié par Decroo et al. (2017)

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 2.5 Extraction des polysaccharides totaux et des pigments

L'extraction des polysaccharides totaux et des pigments a été adaptée de Dubois et al. (1956), avec des modifications spécifiques aux tissus animaux marins. Cette approche séquentielle permet l'isolement sélectif des pigments liposolubles et des polysaccharides hydrosolubles.

**Extraction des pigments liposolubles :** 20 g de tissu lyophilisé et finement broyé (*Holothuria tubulosa* et *Eunicella singularis*) ont été mélangés avec 200 mL d'acétone. Le mélange a été agité magnétiquement pendant 2 heures à température ambiante. Après filtration sur papier filtre, le surnageant coloré, riche en pigments, a été récupéré et stocké à l'abri de la lumière pour des analyses spectrophotométriques.

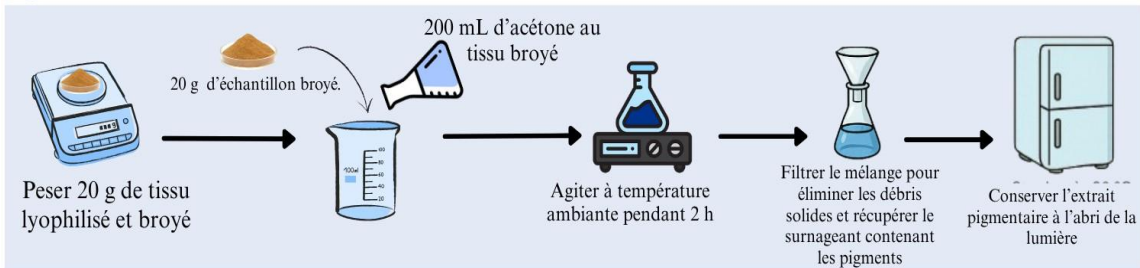
**Extraction aqueuse des polysaccharides :** Après évaporation complète de l'acétone résiduelle du culot solide, 500 mL d'eau distillée ont été ajoutés. Le mélange a été chauffé au bain-marie bouillant pendant 3 heures sans agitation. Le milieu réactionnel a été filtré à chaud, et le filtrat a été clarifié par centrifugation à 5000 tr/min pendant 15 minutes.

**Précipitation alcoolique des polysaccharides :** Le surnageant clarifié a été précipité par addition progressive de deux volumes d'éthanol absolu (1000 mL pour 500 mL de filtrat). Le mélange a été maintenu au repos pendant 12 heures. Les précipités ont été collectés par filtration, déshydratés dans une étuve ventilée à 40°C pendant 24 heures, puis pulvérisés pour obtenir une poudre fine.

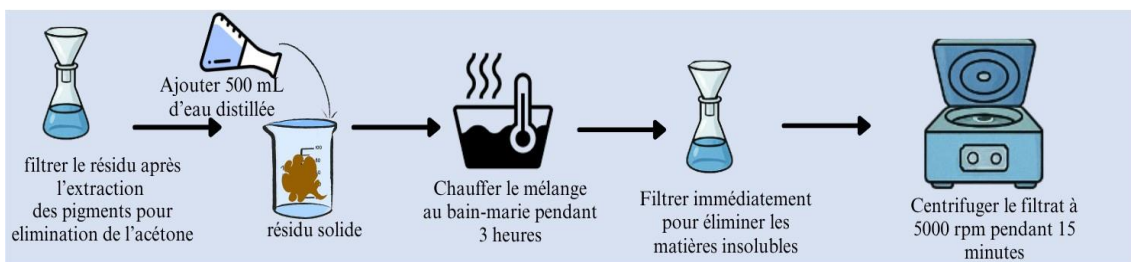
Afin de mieux visualiser les différentes étapes réalisées en laboratoire, voici un schéma illustrant le protocole en Fig 13.

### Protocole d'extraction des polysaccharides totaux et des pigments (Adapté de Dubois et al., 1956, avec modifications appliquées aux tissus animaux)

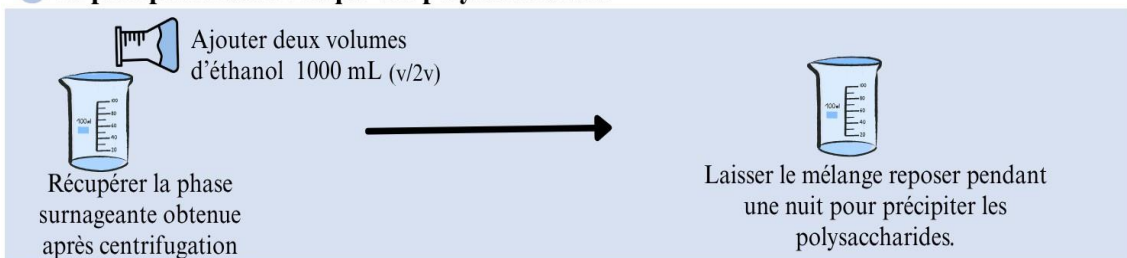
#### 1 Extraction des pigments liposolubles



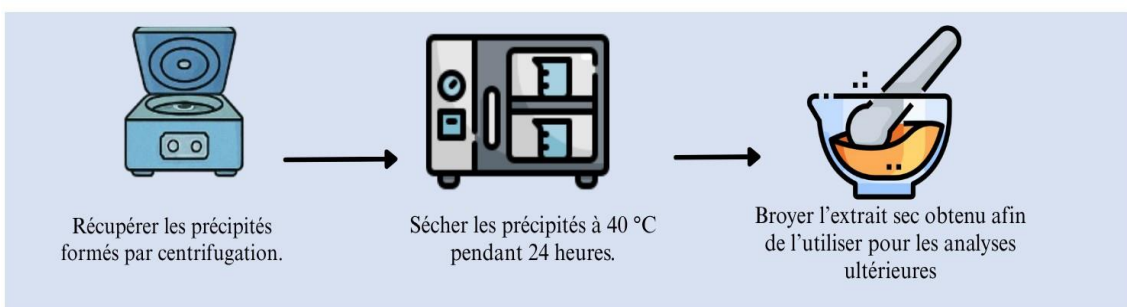
#### 2 Extraction aqueuse des polysaccharides



#### 3 la précipitation alcoolique des polysaccharides



#### 4 Récupération et de séchage



**Figure 13.** Schéma du Protocole d'extraction des polysaccharides totaux et des pigments (Adapté de Dubois et al., 1956, avec modifications appliquées aux tissus animaux)

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 2.6 Dosage des polyphénols totaux par la méthode de Folin-Ciocalteu

Le dosage des polyphénols totaux a été réalisé selon la méthode de Folin-Ciocalteu, en utilisant l'acide gallique comme étalon de référence (Singleton, 1999). Cette méthode colorimétrique est basée sur la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu par les composés phénoliques en milieu alcalin, formant un complexe bleu dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en polyphénols.

**Préparation des solutions :** Une solution mère d'acide gallique (0,6 mg/mL) a été préparée en dissolvant 60 mg d'acide gallique dans 100  $\mu$ L d'éthanol absolu. Une solution de carbonate de sodium à 20 % a été préparée en dissolvant 4 g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dans 50 mL d'eau distillée.

**Préparation de la gamme étalon :** Une série de solutions étalons d'acide gallique a été préparée par dilutions successives pour obtenir des concentrations allant de 0,03 à 0,30 mg/mL.

Préparer une série de solutions étalons par dilution successive de la solution mère d'acide gallique pour obtenir les concentrations suivantes :

Concentration (mg/mL)	Volume solution mère ( $\mu$ L)	Volume éthanol ( $\mu$ L)
0,03	50	950
0,09	150	850
0,12	200	800
0,15	250	750
0,18	300	700
0,21	350	650
0,24	400	600
0,27	450	550
0,30	500	500

**Protocole expérimental :** 100  $\mu$ L de chaque solution étalon ou extrait (éponge, gorgone, concombre de mer) ont été mélangés avec 500  $\mu$ L de réactif de Folin-Ciocalteu dilué au 1/10<sup>e</sup>. Après homogénéisation, 1 mL de solution de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  à 20 % a été ajouté. Les tubes ont été incubés pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière. L'absorbance a été mesurée à 760 nm contre un blanc (éthanol + réactifs). Les mesures ont été réalisées en triplicata.

### 2.7 Caractérisation spectrale par FTIR des polysaccharides extraits

La spectroscopie FTIR (infrarouge à transformée de Fourier) a été utilisée pour la caractérisation spectrale des polysaccharides extraits. Les analyses ont été réalisées sur un appareil Jasco FTIR-4X, avec une résolution de 4  $\text{cm}^{-1}$  et une plage spectrale de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Cette technique non destructive fournit des informations sur la structure chimique et les groupes fonctionnels des polysaccharides, notamment la région des empreintes digitales (950-1200  $\text{cm}^{-1}$ ) pour l'identification des glucides (Bartošová A. et al, 2015).

### 2.8 Séparation des Pigments par Chromatographie sur Colonne

La séparation des pigments de *Holothuria tubulosa* a été effectuée par chromatographie sur colonne de silice, basée sur les principes de l'adsorption différentielle et de la polarité (Snyder et al, 2010). Cette technique permet de distinguer les différentes familles de pigments en utilisant un gradient de solvants.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

**Préparation de la colonne :** Une boulette de coton a été placée au fond de la colonne, qui a ensuite été pré-remplie d'hexane. 10 g de gel de silice 60 ont été introduits progressivement pour former un lit homogène.

**Solvants d'éluion :** Une série de solvants à polarité croissante a été utilisée :

- Fraction 1 : Hexane pur (100 %, 20 mL)
- Fraction 2 : Mélange hexane/acétate d'éthyle (8:2 v/v, 16 mL hexane + 4 mL acétate d'éthyle)
- Fraction 3 : Acétate d'éthyle pur (100 %, 20 mL)
- Fraction 4 : Mélange acétate d'éthyle/méthanol (9:1 v/v, 9 mL acétate d'éthyle + 1 mL méthanol)

**Procédure d'éluion et collecte :** L'extrait pigmentaire brut a été déposé sur la colonne. L'éluion a été réalisée séquentiellement avec les solvants, et chaque fraction a été collectée individuellement (CM brute, CM1, CM2, CM3, CM4).

**Caractérisation spectrophotométrique :** L'analyse spectrophotométrique de chaque fraction a été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (UV-1800 Series) dans la gamme de longueurs d'onde 380-680 nm.

### 2.9 Évaluation de l'Activité Antioxydante par Test DPPH

L'activité antioxydante des extraits a été évaluée par le test de piégeage du radical DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) (Brand-Williams et al, 1995). Ce test colorimétrique mesure la capacité des composés à réduire le radical DPPH, entraînant une diminution de l'absorbance à 517 nm.

**Conditions expérimentales :**

- Longueur d'onde : 517 nm
- Blanc : Méthanol
- DO contrôle DPPH : 0,7 - 1,0
- Temps d'incubation : 30 minutes
- Température : Ambiante
- Conditions : Obscurité
- Volume de DPPH : 4 mL
- Concentration DPPH : 6 mg/60 mL méthanol

**Calcul du pourcentage d'inhibition :**

$$\% \text{ Inhibition} = [(\text{DO contrôle} - \text{DO échantillon}) / \text{DO contrôle}] \times 100$$

Où : DO contrôle = Absorbance de la solution DPPH seule ; DO échantillon = Absorbance de la solution DPPH + extrait.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 3 Résultats et Discussion

#### 3.1 Teneur en Lipides

##### 3.1.1 Résultats Analytiques

Les teneurs en lipides ont été calculées selon la formule :

$$\text{Teneur en lipides (\%)} = [(P_1 - P_0) / P_0] \times 100$$

où  $P_0$  est le poids du ballon vide et  $P_1$  est le poids du ballon avec l'extrait lipidique sec.

**Tableau 10.** Teneur en lipides des échantillons de *Eunicella singularis* et *Holothuria tubulosa*

Espèce	Extrait lipidique sec (g)	Teneur en lipides (%)
<i>Eunicella singularis</i>	0,50	0,386
<i>Holothuria tubulosa</i>	0,43	0,385

##### 3.1.2 Discussion

Les teneurs en lipides observées chez *Eunicella singularis* (0,386%) et *Holothuria tubulosa* (0,385%) sont relativement faibles mais cohérentes avec la littérature scientifique sur les invertébrés marins (Custódio, 2024). Cette similitude, malgré l'appartenance à des embranchements différents (Cnidaria vs Echinodermata), suggère une adaptation métabolique commune aux conditions environnementales méditerranéennes spécifiques de l'échantillonnage (février 2025, température 16°C, pH 8,0, salinité 36,4 psu, oxygène dissous 10,24 mg/L). Ces conditions hivernales peuvent influencer le métabolisme lipidique, favorisant le stockage plutôt que la mobilisation des réserves (Rossi, 2008).

Chez *E. singularis*, la faible teneur lipidique est liée à son mode de vie sessile et à son métabolisme de filtration, moins efficace à basse température (Hughes, 2020). Les lipides présents sont probablement des acides gras structuraux essentiels à l'intégrité membranaire. Pour *H. tubulosa*, la teneur reflète son statut d'organisme détritivore ingérant des sédiments riches en matière organique, même en hiver (Belbachir, 2014). Les lipides extraits incluent des composés structuraux et des métabolites issus de l'alimentation sédimentaire.

Ces lipides marins, même en faibles quantités, présentent un intérêt biotechnologique, notamment les AGPI oméga-3/6, les stérols marins et les phospholipides, reconnus pour leurs applications en santé cardiovasculaire et comme anti-inflammatoires (Singh, 2015). Les lipides d'*E. singularis* pourraient contenir des précurseurs de diterpènes bioactifs (Rocha, 2011), tandis que ceux d'*H. tubulosa* complètent son profil bioactif global, déjà valorisé pour le collagène et les polysaccharides (Somaida, 2024).

#### 3.2 Matières Azotées Totales (MAT)

##### 3.2.1 Résultats Analytiques

Les résultats du titrage sont présentés dans le tableau suivant :

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

**Tableau 11.** Résultats analytiques de la détermination des matières azotées totales (MAT) par la méthode Kjeldahl

Échantillon	Essai 1 (mL)	Essai 2 (mL)	Essai 3 (mL)
Blanc	0,1	0,6	0,7
Concombre de mer ( <i>H. tubulosa</i> )	17,7	18,8	19,6
Gorgone ( <i>E. singularis</i> )	25,9	26,3	32,4

Les analyses par la méthode de Kjeldahl ont donné les résultats suivants :

**Tableau 12.** Résultats des analyses de Matières Azotées Totales (MAT) par la méthode de Kjeldahl

Échantillon	Moyenne (mL) H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> N/50	Écart-type	N (%)	MAT (%)
Blanc	0,47	0,32	-	-
<i>Holothuria tubulosa</i>	18,70	0,95	1,28	8,0
<i>Eunicella singularis</i>	28,20	3,69	1,94	12,1

### 3.2.2 Discussion

Une différence significative est observée entre les deux espèces : *Eunicella singularis* présente une teneur en MAT de 12,1%, supérieure à celle d'*Holothuria tubulosa* (8,0%). Cette différence s'explique par des facteurs biologiques et écologiques. La richesse en protéines d'*E. singularis* est due à la densité de ses polypes actifs et à la présence d'algues symbiotiques (Allemand, 2018). Les conditions environnementales hivernales pourraient également favoriser l'accumulation de protéines structurales et enzymatiques en préparation reproductive (Dyson, 2000).

La teneur modérée en MAT d'*H. tubulosa* est cohérente avec son rôle de détritivore et de bioturbateur (Zmemlia, 2020). La variabilité saisonnière peut influencer ces résultats, l'échantillonnage hivernal correspondant à une période de moindre activité métabolique.

Les teneurs en MAT, bien que modérées, présentent un intérêt biotechnologique. Pour *E. singularis*, la teneur de 12,1% suggère la présence de protéines bioactives, incluant potentiellement des toxines, enzymes, peptides antimicrobiens ou facteurs de croissance (Modica, 2024). Pour *H. tubulosa*, malgré une teneur plus faible, cette espèce est une source de collagène de haute qualité, de protéines bioactives et de polysaccharides aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques (Custódio, 2024).

Les conditions d'échantillonnage (température 16°C, salinité 36,4 psu, oxygène dissous 10,24 mg/L) correspondent aux paramètres hivernaux méditerranéens et peuvent induire des adaptations métaboliques, comme l'accumulation de protéines de stress. L'écart-type plus élevé pour *E. singularis* (3,69) par rapport à *H. tubulosa* (0,95) suggère une plus grande hétérogénéité dans la composition des tissus de gorgone, potentiellement due à sa structure coloniale complexe (Coma, 1995).

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

### 3.3 Caractérisation Spectrale par FTIR des extraits de polysaccharides marins

#### 3.3.1 Rendements d'extraction

Le rendement d'extraction des polysaccharides a été calculé comme suit :

$$\text{Rendement (\%)} = (\text{Masse de polysaccharides extraits} / \text{Masse initiale de tissu sec}) \times 100.$$

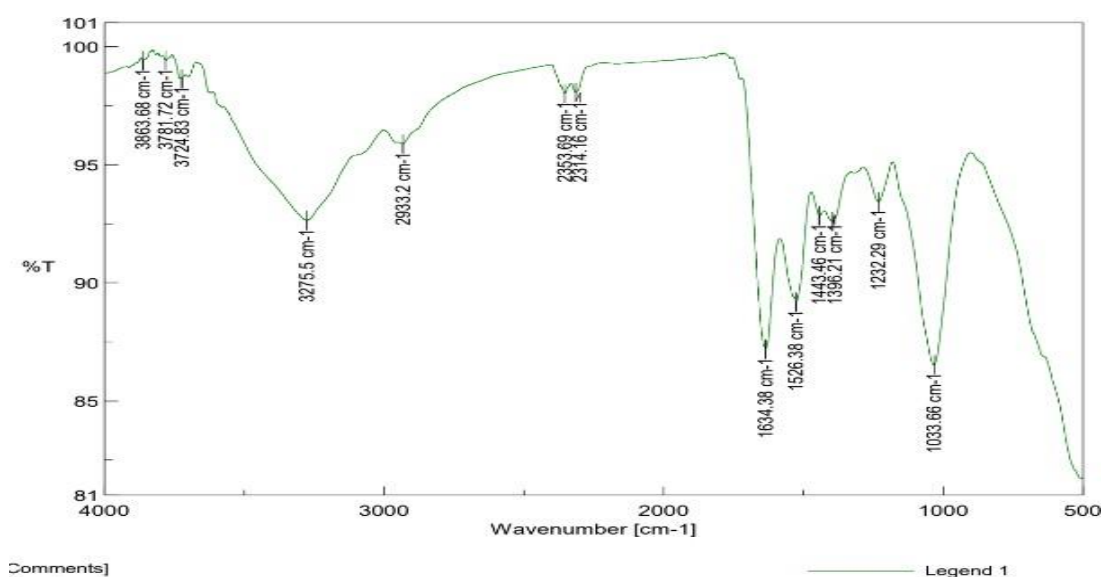
**Tableau 13.** Rendements d'extraction des polysaccharides de *Eunicella singularis* et *Holothuria tubulosa*

Espèce	Masse initiale de tissu sec (g)	Masse de polysaccharides extraits (g)	Rendement (%)
<i>Eunicella singularis</i>	20	0,0328	0,164
<i>Holothuria tubulosa</i>	20	0,4796	2,398

Le rendement d'extraction des polysaccharides de *Holothuria tubulosa* (2,398 %) est environ 15 fois supérieur à celui d'*Eunicella singularis* (0,164 %). Cette différence significative peut s'expliquer par la structure anatomique distincte des holothuries (échinodermes) et des gorgones (cnidaires), ainsi que par la composition spécifique de leur matrice extracellulaire et l'adaptation de la méthode d'extraction à certains types de polysaccharides (Ustyuzhanina, 2022).

#### 3.3.2 Analyse Spectroscopique FTIR

**Spectre d'*Eunicella singularis* (Gorgone blanche) :**



**Figure 14.** Spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique sec d'*Eunicella singularis*

Le spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique d'*Eunicella singularis* révèle des bandes d'absorption caractéristiques :

- **3863,68 - 3596,59  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation O-H des groupes hydroxyles, indiquant la présence de liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires, typique des polysaccharides.
- **3289  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation N-H, suggérant la présence d'aminosucres.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

- **2883,06 - 2820,38  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongations C-H des groupes méthyle et méthylène.
- **1728,87  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation C=O des groupes carboxyliques ou esters, caractéristique des acides uroniques dans les polysaccharides.
- **1633,41  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformation H-O-H de l'eau liée et vibrations C=O des amides.
- **1525,42  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformation N-H des amides II.
- **1443,46 - 1398,14  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformations C-H et C-O-H.
- **1081,87  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation C-O des alcools secondaires et C-O-C des liaisons glycosidiques.
- **650,858 - 589,147  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformations hors du plan, possibles vibrations C-S (polysaccharides sulfatés).

Ce profil spectral suggère la présence d'un polysaccharide de structure complexe, potentiellement apparenté aux glycosaminoglycanes ou aux mucopolysaccharides typiques des matrices extracellulaires des cnidaires (Antonio, 2001).

### Spectre d'*Holothuria tubulosa* (Concombre de mer) :

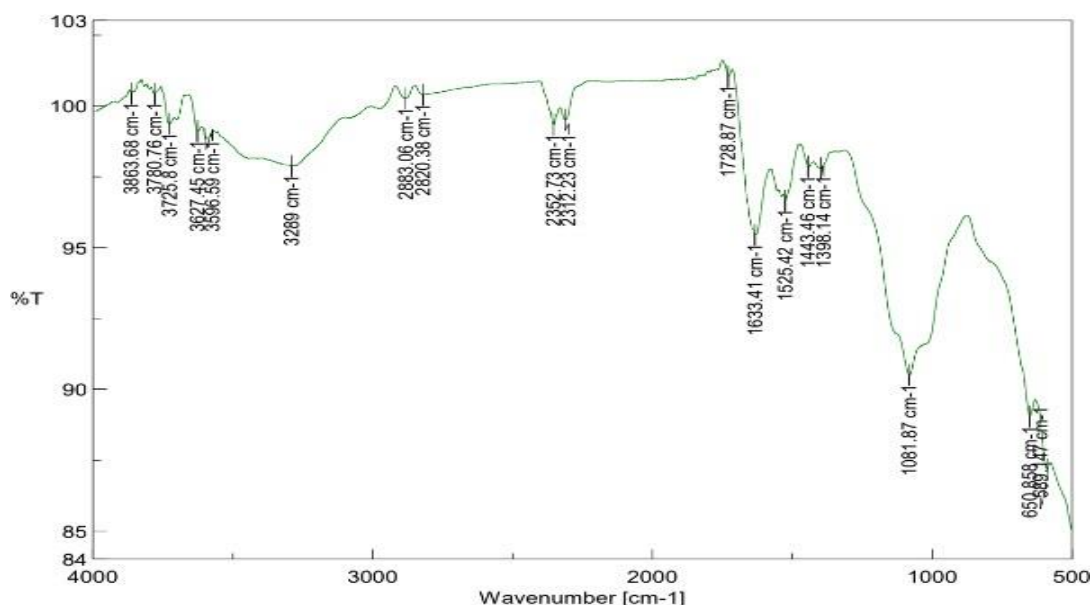


Figure 15. Spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique sec d'*Holothuria tubulosa*

Le spectre FTIR de l'extrait polysaccharidique d'*Holothuria tubulosa* révèle les bandes d'absorption suivantes :

- **3863,68 - 3781,72  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation O-H des groupes hydroxyles.
- **3724,83  $\text{cm}^{-1}$**  : O-H libre ou faiblement lié.
- **3275,5  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongation N-H (aminosucres) ou O-H lié par liaison hydrogène.
- **2933,2  $\text{cm}^{-1}$**  : Élongations C-H asymétriques des groupes  $\text{CH}_2$ .
- **2353,69 - 2314,16  $\text{cm}^{-1}$**  : Vibrations de déformation O-H ou impuretés.
- **1634,38  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformation H-O-H de l'eau liée et vibrations amides.
- **1526,38  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformation N-H des amides II.
- **1443,46 - 1396,21  $\text{cm}^{-1}$**  : Déformations C-H et C-O-H.

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

- **1232,29 cm<sup>-1</sup>** : Élongation S=O des groupes sulfates, une bande caractéristique des polysaccharides sulfatés.
- **1033,66 cm<sup>-1</sup>** : Élongation C-O des alcools secondaires et liaisons glycosidiques.

Le profil spectral indique la présence de fucosane sulfaté, en particulier la bande sulfate à 1232 cm<sup>-1</sup>, mettant en évidence la nature hautement sulfatée du polysaccharide, caractéristique des holothuries (Ustyuzhanina, 2020).

### 3.3.3 Analyse détaillée des profils polysaccharidiques

**Tableau 14.** Caractérisation spectroscopique FTIR des polysaccharides d'*Eunicella singularis*

Bande (cm <sup>-1</sup> )	Attribution	Signification Biologique	Référence
3275,5	O-H polysaccharidiques	Polysaccharides hydratés de structure	(Matulja et al., 2019)
1232,29	C-O sulfate	Polysaccharides sulfatés (défense)	(Ismail et Amer, 2020)
1033,66	C-O-C squelette	Structure polysaccharidique simple	(Martins et al., 2023).
1526,38	N-H protéines	Glycoprotéines associées	(Nunes et Coimbra, 2019)

**Tableau 15.** Caractérisation spectroscopique FTIR des polysaccharides de *Holothuria tubulosa*

Bande (cm <sup>-1</sup> )	Attribution	Signification Biologique	Référence
3289	O-H complexes	Polysaccharides hautement hydratés	(Ustyuzhanina et al., 2019)
1728,87	C=O acides uroniques	Fucosylated Chondroitin Sulfate (FCS)	(Pomin, 2014)
1081,87	C-O-C intense	Réseau polysaccharidique dense	(Soares et al., 2018)
3627,45-3596,59	O-H fucose	Chaînes fucosylées ramifiées	(Ustyuzhanina et al., 2019).

### 3.3.4 Détermination du Type de Polysaccharides et Implications

**Pour *Eunicella singularis*** : Le polysaccharide identifié est un polysaccharide complexe mixte, caractérisé par des groupes hydroxyles abondants, des acides uroniques, des composés aminés possibles et une structure glycosidique confirmée. La présence potentielle de groupes sulfates suggère une structure apparentée aux glycosaminoglycanes ou mucopolysaccharides typiques des matrices extracellulaires des cnidaires (Antonio, 2001).

**Pour *Holothuria tubulosa*** : Le polysaccharide identifié est le fucosane sulfaté, avec des groupes hydroxyles caractéristiques et une bande sulfate très nette à 1232,29 cm<sup>-1</sup>. La présence d'aminosucres et une structure glycosidique confirmée, sans groupes carboxyliques marqués, correspondent aux résultats d'études sur les polysaccharides sulfatés dérivés d'organismes marins (Ustyuzhanina, 2020).

### 3.3.5 Contexte Écologique et Conditions d'Échantillonnage

L'échantillonnage en février 2025 dans la baie d'Aïn Bénian (Alger) à 20 mètres de profondeur, avec une température de 16 °C, un pH de 8,0, une salinité de 36,4 psu et un oxygène dissous de 10,24 mg/L, correspond aux paramètres hivernaux méditerranéens. Ces conditions peuvent influencer le métabolisme des organismes, potentiellement menant à des concentrations plus élevées de métabolites de réserve et favorisant l'accumulation de polysaccharides.

#### Analyse comparative

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

Les différences entre *Holothuria tubulosa* (échinoderme) et *Eunicella singularis* (cnidaire) s'expliquent par leur phylogénie, leur anatomie et leur écologie. *H. tubulosa* possède une paroi riche en glycosaminoglycanes sulfatés (Custódio, 2024), tandis que *E. singularis* présente une structure protéique et calcaire, avec des polysaccharides localisés. En tant que détritivore benthique, *H. tubulosa* développe des polysaccharides bioactifs jouant un rôle dans la défense, la cicatrisation et la régulation osmotique (Zmemlia, 2020), contrairement à *E. singularis*, suspensivore fixé, qui privilégie les protéines structurales (Hughes, 2020). Ces différences reflètent la richesse biochimique des invertébrés marins algériens, favorisée par les conditions stables de la Méditerranée occidentale. Les polysaccharides sulfatés de *H. tubulosa* présentent un fort potentiel biotechnologique, notamment pour leurs activités anticoagulantes, immunomodulatrices, antioxydantes et anti-inflammatoires (Yang, 2020)

### 3.4 Dosage des Polyphénols Totaux dans les Extraits de Saponines

#### 3.4.1 Courbe d'Étalonnage de l'Acide Gallique

La courbe d'étalonnage de l'acide gallique a été établie à 760 nm. L'équation de régression linéaire est

$$Y = 4,9163X - 0,0159$$

avec un coefficient de détermination  $R^2 > 0,995$ , indiquant une bonne fiabilité de la méthode. Le domaine de linéarité est de 0,03 à 0,30 mg/mL.

#### 3.4.2 Résultats d'Absorbance et Concentrations en Polyphénols Totaux

Les concentrations en polyphénols totaux (exprimées en mg EAG/mL d'extrait) ont été calculées à partir de l'équation de la courbe d'étalonnage.

**Tableau 16.** Concentrations en polyphénols totaux dans les extraits des organismes marins

Organisme	Concentration en polyphénols totaux (mg EAG/mL d'extrait)
Éponge ( <i>Chondrosia reniformis</i> )	0,294 ± 0,110
Gorgone ( <i>Eunicella singularis</i> )	0,241 ± 0,035
Concombre de mer ( <i>Holothuria tubulosa</i> )	0,080 ± 0,019

#### 3.4.3 Interprétation des Résultats

Les résultats révèlent des différences significatives dans les teneurs en polyphénols totaux. L'éponge (*Chondrosia reniformis*) présente la concentration la plus élevée (0,294 mg EAG/mL), suivie par la gorgone (*Eunicella singularis*) (0,241 mg EAG/mL), tandis que le concombre de mer (*Holothuria tubulosa*) affiche la teneur la plus faible (0,080 mg EAG/mL). Cette hiérarchie reflète les différences métaboliques et écologiques entre ces groupes taxonomiques (Pawlik, 2011).

Les éponges et les cnidaires (gorgones), en tant qu'organismes filtreurs sessiles, développent des stratégies de défense chimique sophistiquées, incluant la production de composés phénoliques (Blunt, 2018). En revanche, les échinodermes comme *H. tubulosa* disposent de stratégies défensives alternatives, principalement basées sur leurs saponines triterpéniques, ce qui peut réduire leur dépendance aux défenses chimiques (Bordbar, 2011). Les conditions

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

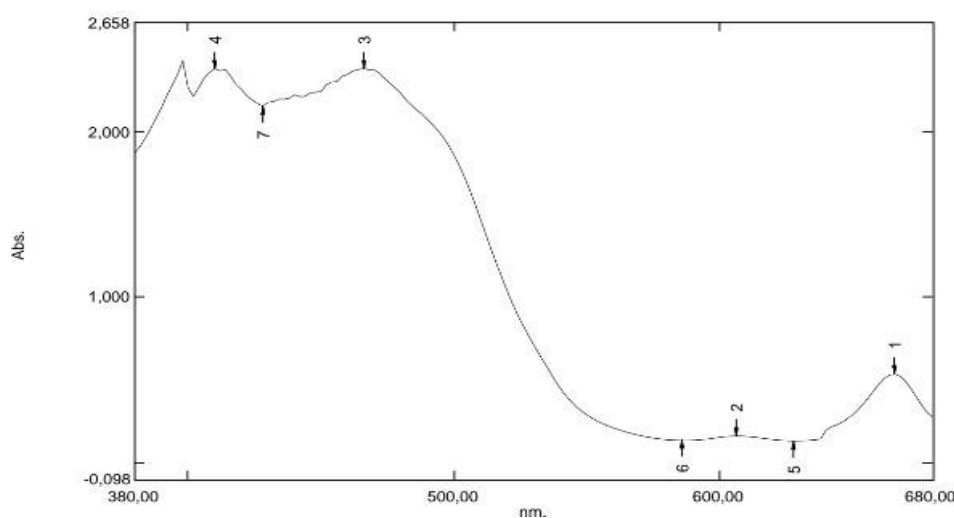
environnementales hivernales peuvent également stimuler la synthèse de composés de défense chez les organismes benthiques.

### 3.5 Séparation des Pigments par Chromatographie sur Colonne

#### 3.5.1 Analyse des Profils Chromatographiques

**Extrait brut (CM brute) : Richesse pigmentaire confirmée**

Data Set: CMBRUTE\_174724 - Manipulated



**Figure 16.** Spectre d'absorption avec pic principal à 420 nm et structure secondaire à 650 nm

L'échantillon brut (fig. 16) présente une forte absorption dans le bleu-violet avec des pics majeurs à 410 nm (Abs = 2,380), 428 nm (Abs = 2,155) et 466 nm (Abs = 2,381). Cette intense absorption indique la présence de chromophores étendus conférant une coloration orangée-rouge à l'échantillon.

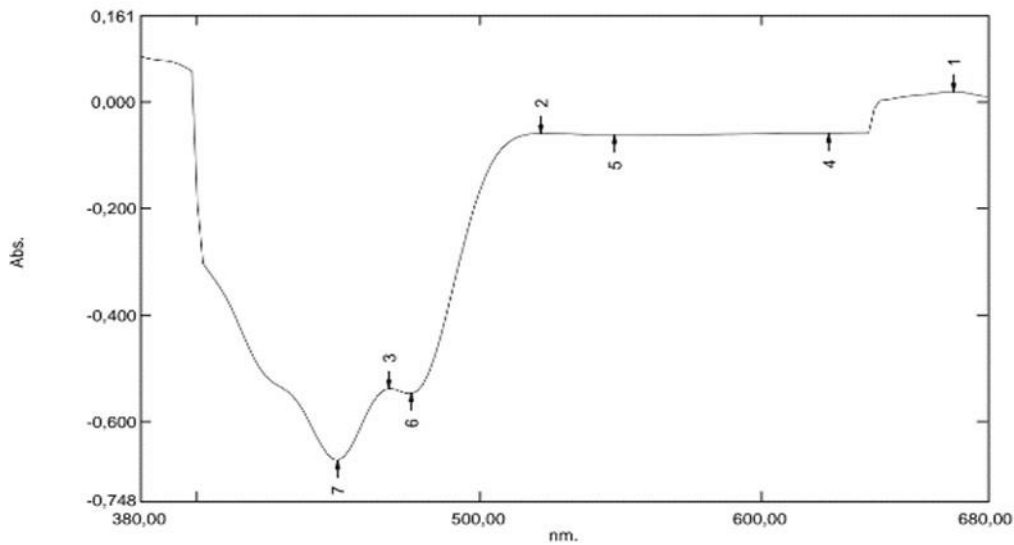
L'analyse spectrophotométrique de l'extrait brut (fig. 16) révèle un profil typique des caroténoïdes marins avec des pics d'absorption majeurs à :

- 410 nm (Abs = 2,380) et 428 nm (Abs = 2,155) : caractéristiques des  $\beta$ -carotènes et dérivés (Catanzaro et al., 2020)
- 466 nm (Abs = 2,381) : signature spectrale des xanthophylles (Patil et al., 2022)

Ces résultats confirment la présence de "pigments bioactifs" mentionnés dans les généralités, notamment les "caroténoïdes" répertoriés chez les échinodermes (Kimura et al., 2017 ; Lee et al., 2019). Les absorptions dans le rouge (666 nm, 606 nm, 628 nm, 586 nm) suggèrent également la présence de spinochromes, pigments spécifiques aux échinodermes ayant des propriétés "antioxydantes, photoprotectrices, antibactériennes, cytotoxiques" (Catanzaro et al., 2020).

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

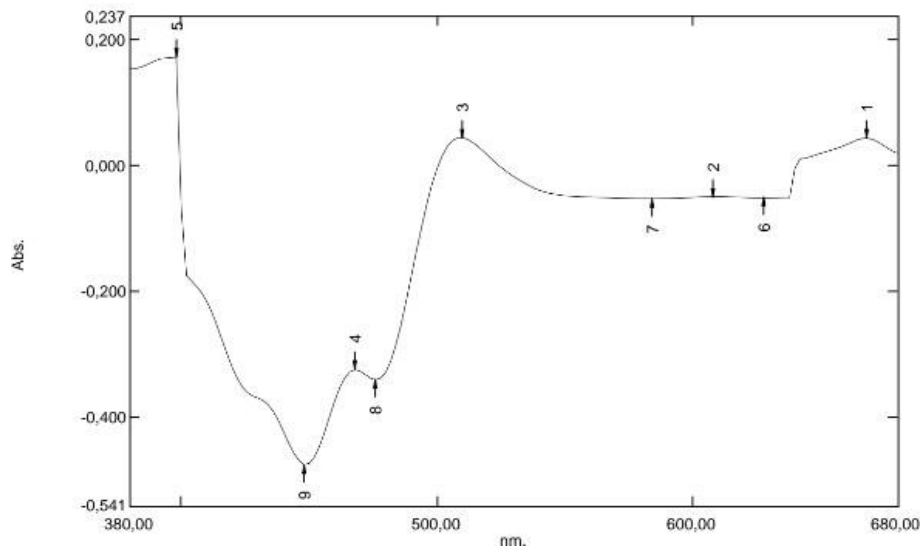
Data Set: CM1\_174753 - Manipulated



**Figure 17.** Spectre d'absorption présentant un minimum profond à 460 nm

L'échantillon CM1 (fig. 17) montre des absorptions majoritairement négatives, notamment à 450 nm (Abs = -0,673) et 476 nm (Abs = -0,548). Ces valeurs indiquent une élimination quasi-complète des chromophores initiaux, suggérant un traitement très efficace.

Data Set: CM2\_174845 - Manipulated



**Figure 18.** Spectre d'absorption avec minimum à 460 nm et pic secondaire à 520 nm

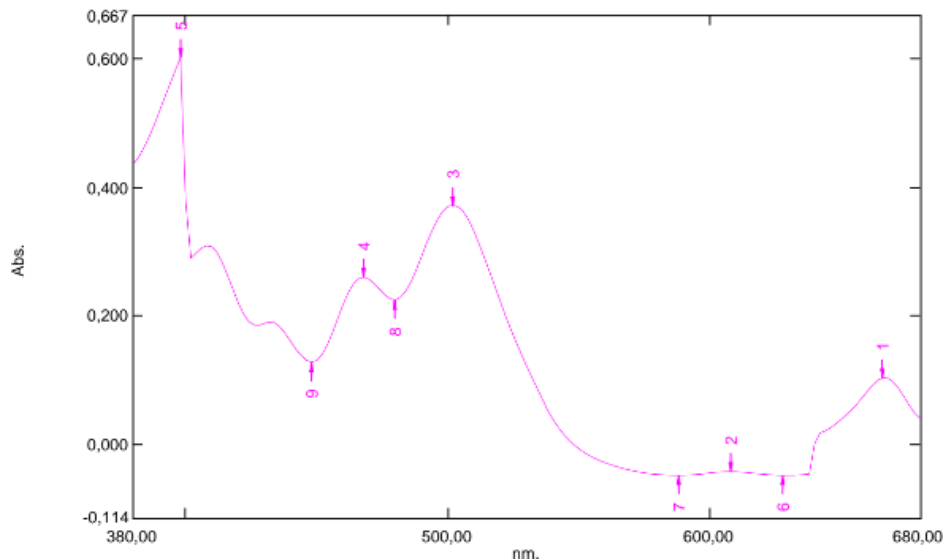
L'échantillon CM2 (fig. 18) présente un profil intermédiaire avec une absorption modérée à 398 nm (Abs = 0,172) et des valeurs encore négatives dans la région 440-480 nm. Ceci suggère une récupération partielle des chromophores avec modification de leur nature.

Les valeurs d'absorbance majoritairement négatives dans ces fractions indiquent que les solvants peu polaires (hexane pur et mélange hexane/acétate d'éthyle 8:2) ne permettent pas une élution efficace des pigments. Cette observation suggère que les pigments d'*H. tubulosa* présentent une polarité intermédiaire à élevée, probablement due à Glycosylation : Comme

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

mentionné dans les généralités, les invertébrés marins produisent souvent des polysaccharides aux propriétés antioxydantes (Custódio et al., 2024; Somaida et al., 2024) ou Complexation avec des protéines : Les pigments peuvent être associés aux "protéines bioactives" également présentes chez cette espèce

Data Set: CM3\_174947 - Manipulated



**Figure 19.** Spectre d'absorption montrant un pic intense à 380 nm et une structure à 520 nm

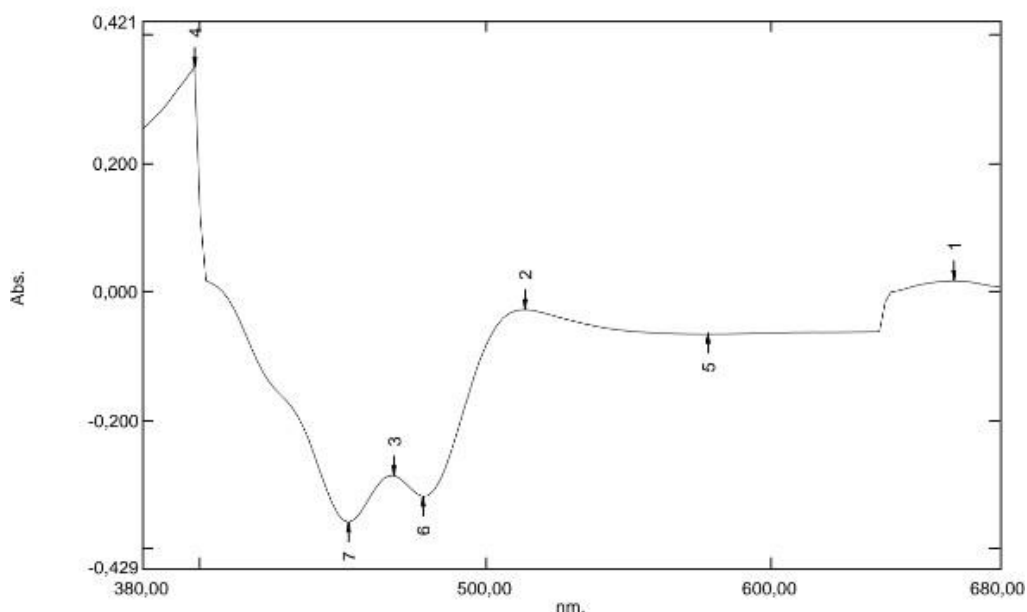
L'échantillon CM3 (fig. 19) montre une récupération significative avec un maximum à 398 nm (Abs = 0,602) et des absorptions positives à 502 nm (Abs = 0,372) et 468 nm (Abs = 0,260). Cette évolution indique une régénération contrôlée des chromophores.

L'acétate d'éthyle pur révèle le profil le plus informatif avec :

- **398 nm** (Abs = 0,602) : caroténoïdes libres (Matsuno, 1992)
- **468 nm** (Abs = 0,260) et **502 nm** (Abs = 0,372) : xanthophylles et dérivés oxygénés (Fernández-Marín et al., 2018).

Cette fraction correspond probablement aux caroténoïdes de polarité intermédiaire, libérés de leurs associations avec d'autres biomolécules. L'efficacité de cette élution confirme que les pigments d'*H. tubulosa* nécessitent des conditions d'extraction spécifiques

Data Set: CM4\_175053 - Manipulated



**Figure 20.** Spectre d'absorption avec pic initial à 380 nm et minimum à 460 nm

L'échantillon CM4 présente un profil stabilisé avec une absorption principale à 398 nm (Abs = 0,350) et des valeurs négatives persistantes dans la région 450-480 nm. Ceci suggère un équilibre atteint dans le processus de traitement.

Le mélange acétate d'éthyle/méthanol (9:1) élue des composés plus polaires (pic à 398 nm, Abs = 0,350), suggérant la présence de caroténoïdes glycosylés ou de complexes pigment-polysaccharide. Cette observation est cohérente avec la capacité d'*H. tubulosa* à produire des polysaccharides aux propriétés antioxydantes et nutraceutiques mentionnés dans les généralités.

### 3.5.2 Implications Écologiques et Fonctionnelles

Les conditions environnementales hivernales (16°C, forte oxygénation) peuvent intensifier la production de pigments antioxydants chez *H. tubulosa* pour faire face au stress oxydatif (Zmemlia, 2020). La composition pigmentaire révélée s'inscrit dans le potentiel biotechnologique de l'espèce, où les saponines triterpéniques peuvent interagir avec les pigments caroténoïdes, expliquant la nécessité de solvants de polarité intermédiaire pour leur extraction efficace (Bordbar, 2011).

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

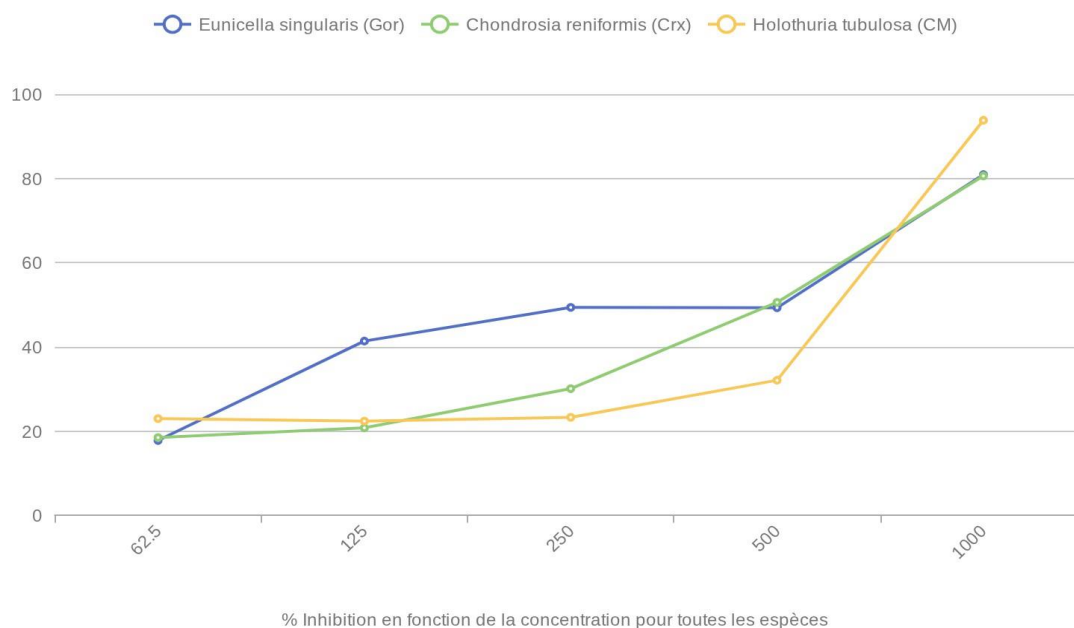
### 3.6 Activité Antioxydante par Test DPPH

#### 3.6.1 Résultats

**Tableau 17.** Activité antioxydante des extraits de *Eunicella singularis*, *Chondrosia reniformis* et *Holothuria tubulosa* par le test DPPH

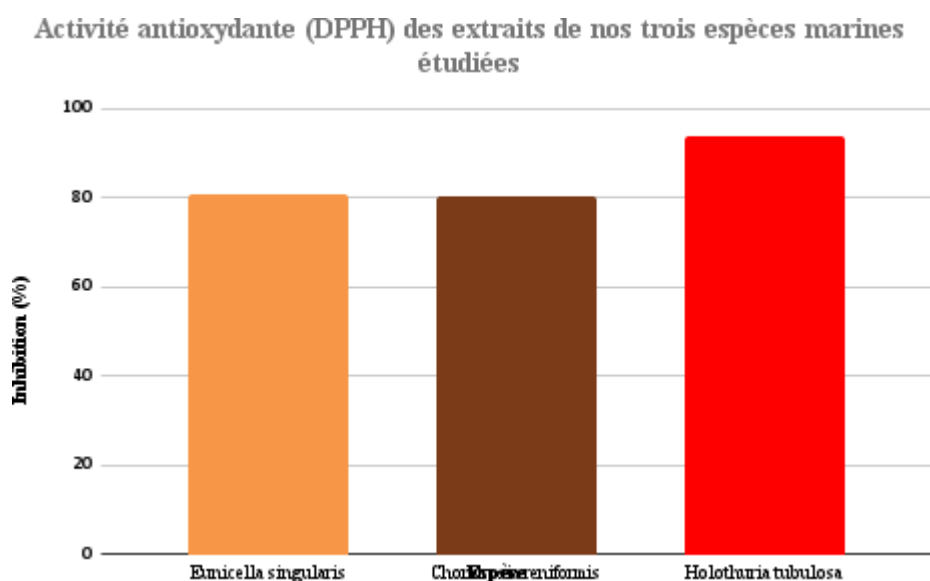
Échantillon	Concentration (ppm)	% Inhibition	Observation
<i>Eunicella singularis</i> (Gor)	62,5	17,8	Activité faible
	125	41,4	Activité modérée
	250	49,4	Activité modérée
	500	49,3	Plateau d'activité
	1000	80,9	Activité élevée
<i>Chondrosia reniformis</i> (Crx)	62,5	18,5	Activité faible
	125	20,8	Activité faible
	250	30,1	Activité modérée
	500	50,6	Activité modérée
	1000	80,6	Activité élevée
<i>Holothuria tubulosa</i> (CM)	62,5	23,0	Activité faible
	125	22,4	Activité faible
	250	23,3	Activité faible
	500	32,1	Activité modérée
	1000	93,8	Activité très élevée

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins



**Figure 21.** Graphe représentant l'activité antioxydante (test DPPH) des extraits de *Eunicella singularis* (Gor), *Chondrosia reniformis* (Crx) et *Holothuria tubulosa* (CM) en fonction de la concentration (µg/mL).

### 3.6.2 Interprétation des Résultats



**Figure 22.** Diagramme en bâtons représentant l'activité antioxydante (test DPPH) des extraits de *Eunicella singularis* (Gor), *Chondrosia reniformis* (Crx) et *Holothuria tubulosa* (CM), exprimée en pourcentage d'inhibition (%), à la concentration maximale testée (µg/mL).

Les résultats du test DPPH révèlent des différences significatives dans l'activité antioxydante entre les extraits des trois espèces étudiées (Fig. 22)

Les résultats du test DPPH révèlent des différences significatives dans l'activité antioxydante. L'extrait d'*Eunicella singularis* présente l'activité la plus élevée (jusqu'à 80,9%), suggérant une

## Chapitre IV. Analyse Biochimique des Échantillons Marins

richesse en métabolites secondaires bioactifs (Modica, 2024). L'extrait de *Chondrosia reniformis* montre une activité modérée (jusqu'à 80,6 %), cohérente avec la production de composés bioactifs diversifiés par les éponges marines (Blunt, 2018). L'extrait d'*Holothuria tubulosa* présente un profil particulier, atteignant le pourcentage d'inhibition le plus élevé (93,8%) à la concentration maximale, ce qui pourrait être lié à la présence de saponines ou d'autres composés spécifiques aux échinodermes (Bordbar, 2011).

Une relation dose-effet positive est observée pour tous les extraits, confirmant que l'augmentation de la concentration en métabolites bioactifs améliore la capacité de piégeage des radicaux libres. La différence de comportement chez *H. tubulosa* pourrait être liée à la nature spécifique des métabolites secondaires (triterpènes glycosylés/saponines) qui nécessitent des concentrations plus élevées pour exprimer pleinement leur potentiel antioxydant (Bordbar, 2011).

### 4 Conclusion Générale

Cette étude a permis une analyse biochimique approfondie de trois espèces d'invertébrés marins du littoral algérien : *Eunicella singularis*, *Holothuria tubulosa* et *Chondrosia reniformis*. Les résultats ont mis en évidence des profils distincts en lipides, protéines, polysaccharides, pigments et polyphénols, reflétant les adaptations écologiques et les stratégies de défense propres à chaque espèce. Les conditions environnementales hivernales de la baie d'Aïn Bénian ont été identifiées comme un facteur influençant la composition biochimique des organismes, soulignant l'importance d'une approche contextuelle dans l'interprétation des données.

La méthode de Folch s'est avérée efficace pour l'extraction lipidique, révélant des teneurs faibles mais cohérentes avec la littérature. La méthode de Kjeldahl a permis de quantifier les matières azotées totales, montrant une richesse protéique notable chez *E. singularis*. L'extraction des saponines et des polysaccharides a mis en lumière des rendements et des structures distincts, avec la confirmation de fucosane sulfaté chez *H. tubulosa* par FTIR. Le dosage des polyphénols a révélé une concentration plus élevée chez l'éponge et la gorgone, tandis que la chromatographie a caractérisé les pigments d'*H. tubulosa*.

L'activité antioxydante, évaluée par le test DPPH, a démontré le potentiel bioactif de ces extraits, avec une relation dose-effet positive pour toutes les espèces. Ces découvertes renforcent l'intérêt biotechnologique de ces invertébrés marins pour le développement de nouveaux agents thérapeutiques, nutraceutiques et cosmétiques. L'intégration de ces données dans la base de données nationale BANBIOM contribuera à la valorisation durable de la biodiversité marine algérienne.

## **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

## Conclusion et perspectives

La présente étude a entrepris une exploration approfondie du potentiel biotechnologique et de l'identification génétique d'invertébrés marins collectés le long de la côte algérienne. Dans un contexte de pression croissante sur les écosystèmes marins et de recherche de nouvelles ressources bioactives, ce travail s'est avéré crucial pour la valorisation durable et la conservation de la biodiversité méditerranéenne. En intégrant des approches de biologie moléculaire et de biochimie, on a cherché à établir une base de connaissances solide pour la bioprospection marine et la conservation des espèces. Les résultats obtenus, bien que confrontés à des défis méthodologiques inhérents à la complexité des échantillons marins, ont permis de confirmer l'importance de ces organismes en tant que sources de molécules d'intérêt et de souligner la nécessité d'une identification taxonomique rigoureuse.

## Synthèse des résultats clés

### Apports de l'identification moléculaire

L'intégration des techniques d'identification moléculaire, notamment le séquençage Sanger basé sur les gènes 18S ARNr et COI, a enrichi notre compréhension de la diversité taxonomique des invertébrés marins algériens. Cette approche a permis de confirmer l'identité de plusieurs espèces et de résoudre des ambiguïtés que la seule morphologie ne pouvait lever. Les cas de discordance entre identification morphologique et moléculaire, comme celui de *Paracentrotus lividus* et *Genocidaris maculata*, ou la détection d'ADN symbiotique chez *Eunicella singularis*, soulignent la complexité des écosystèmes marins et la nécessité d'outils d'identification précis pour éviter les erreurs et les confusions (Knowlton, 1993; Baker et al., 2003). Le succès de l'amplification et du séquençage pour certaines espèces, malgré les défis, valide l'approche moléculaire comme un pilier essentiel de la bioprospection marine (Hebert et al., 2003).

### Potentiel biochimique révélé

La caractérisation biochimique a mis en évidence la richesse et la diversité des métabolites secondaires produits par les invertébrés marins étudiés. Les analyses ont révélé des profils distincts en lipides, protéines, polysaccharides, pigments et polyphénols, chacun avec des propriétés biologiques spécifiques. Les faibles teneurs en lipides, influencées par les conditions environnementales hivernales, n'ocultent pas leur potentiel en tant que précurseurs de composés bioactifs (Singh et al., 2015). Les teneurs en protéines, notamment chez *Eunicella singularis*, suggèrent la présence de biomolécules d'intérêt pharmaceutique (Modica et al., 2024). La découverte de fucosane sulfaté chez *Holothuria tubulosa* et de polysaccharides complexes chez *Eunicella singularis* confirme leur rôle en tant que sources de polysaccharides sulfatés aux activités anticoagulantes, immunomodulatrices et antioxydantes (Ustyuzhanina et al., 2020; Raimundo et al., 2016). Enfin, la présence de pigments caroténoïdes et de polyphénols, associée à une activité antioxydante significative, renforce le potentiel de ces organismes pour le développement de produits nutraceutiques et cosmétiques (Kimura et al., 2017; Rice-Evans et al., 1997).

## Conclusion et perspectives

### Défis et limites

Malgré les avancées significatives, cette étude a rencontré plusieurs défis inhérents à la recherche sur les organismes marins. L'extraction d'ADN de haute qualité à partir de tissus riches en inhibiteurs, tels que les polysaccharides et les polyphénols, reste un obstacle majeur, nécessitant des protocoles d'optimisation spécifiques (Cao et al., 2012; Sharma et al., 2014). Les taux de succès variables des étapes de séquençage, ainsi que la qualité parfois insuffisante des séquences obtenues, ont limité la portée de certaines analyses génétiques. La disponibilité des bases de données publiques pour les espèces marines algériennes est également un facteur limitant, rendant l'identification moléculaire plus complexe pour les espèces peu étudiées (Costello et al., 2013).

Sur le plan biochimique, les méthodes d'extraction et de quantification, bien que validées, peuvent être influencées par la saisonnalité et les conditions environnementales, ce qui souligne la nécessité d'études complémentaires pour évaluer la variabilité des métabolites secondaires. La complexité des extraits bruts, avec la co-extraction de différentes classes de composés, rend parfois difficile l'attribution d'une activité biologique spécifique à une seule molécule (Vincken et al., 2007).

### Perspectives

Les résultats de cette étude ouvrent de nombreuses perspectives pour la recherche future et la valorisation des ressources marines algériennes :

- Extension de la base de données génétique : Poursuivre l'échantillonnage et l'identification moléculaire d'un plus grand nombre d'espèces marines algériennes, en explorant de nouveaux marqueurs génétiques pour une résolution taxonomique plus fine (Avisé, 2004).
- Optimisation des protocoles : Développer et optimiser des protocoles d'extraction d'ADN et d'amplification PCR spécifiques pour les espèces marines difficiles, en explorant de nouvelles méthodes de lyse ou de purification pour surmonter les problèmes d'inhibiteurs (Ivanova et al., 2006).
- Analyse phylogénétique approfondie : Utiliser les séquences obtenues pour des analyses phylogénétiques plus poussées, en intégrant un plus grand nombre de séquences de référence et en utilisant des méthodes d'inférence plus sophistiquées (Felsenstein, 2004).
- Applications biotechnologiques : Exploiter les espèces identifiées pour la recherche de biomolécules à fort potentiel pharmaceutique, cosmétique ou agroalimentaire. L'identification génétique précise est une étape clé pour la traçabilité et la valorisation durable de ces ressources (Jiménez et al., 2018).
- Conservation et gestion : Utiliser les données génétiques pour évaluer la diversité génétique des populations marines algériennes, identifier les espèces menacées et informer les stratégies de conservation et de gestion des ressources marines (Frankham et al., 2002).
- Caractérisation approfondie des composés bioactifs : Réaliser des analyses phytochimiques plus poussées (HPLC-MS, RMN) pour identifier et quantifier spécifiquement les métabolites responsables des activités biologiques observées. Mener des tests d'activité biologique *in vitro* et *in vivo* pour valider le potentiel thérapeutique et cosmétique des extraits purifiés.
- Études de saisonnalité et d'environnement : Approfondir l'impact des variations saisonnières et des conditions environnementales sur la production et la composition des métabolites secondaires, afin d'optimiser les périodes de récolte et les protocoles d'extraction.

## **RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

## Références Bibliographiques

- **Pawlik, J. R. (2011).** The chemical ecology of sponges: an overview. *Marine Ecology Progress Series*, 443, p.p. 225-238.
- **Abad, M.J., Bedoya, L.M., Bermejo, P., & Zaragoza, F. (2011).** Natural marine anti-inflammatory products. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(14), p.p. 1245-1270.
- **Ajjabi, L. C., & Boufi, S. (2024).** Extraction and Purification of Biopolymers from Marine Origin: Conventional Versus Modern Techniques. *Journal of Polymers and the Environment*. [en ligne]. [Consulté le 14/04/2025]. Disponible sur le web: <https://doi.org/10.1007/s10924-024-03217-5>
- **Allemand, D., & Grover, R. (2018).** Coral Reefs: An Ecosystem in Transition. USA: Springer.
- **Allemand, D., & Grover, R. (2018).** Molecular mechanisms of cnidarian-algalsymbiosis and coral bleaching. In *Coral Bleaching* (p.p. 31-46). USA: Springer.
- **Allendorf, F. W., Luikart, G., & Aitken, S. N. (2010).** *Conservation and the Genetics of Populations*. United States: Wiley-Blackwell.
- **Alsmark, C., Strese, Å., Wedén, C., & Backlund, A. (2012).** Microbial diversity of *Alcyonium digitatum*. *Phytochemistry Reviews*, 12(3), p.p. 531-542. [en ligne]. [consulté le 22/04/2025]. Disponible sur le site web: <https://doi.org/10.1007/s11101-012-9229-5>
- **Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), p.p. 403-410.
- **Aminin, D. L., Menchinskaya, E. S., Pislugin, E. A., & Silchenko, A. S. (2015).** Antitumor activity of sea cucumber triterpene glycosides. *Marine drugs*, 13(4), p.p. 2208-2255. [en ligne]. [consulté le 23/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3390/md13042208>
- **Anchordoquy, T. J., & Molina, M. C. (2007).** Preservation of DNA. *Cell Preservation Technology*, 5(4), p.p. 180-188.
- **Andrew, N. L., & Mapstone, B. D. (1987).** Sampling and the description of spatial pattern in marine ecology. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 25, p.p. 39-90.
- **Antonio, S., & Iozzo, R. V. (2001).** Glycosaminoglycans and proteoglycans in cnidarians. *Journal of Experimental Zoology*, 290(1), p.p. 1-10.
- **Applied Biosystems Trouble shooting Guide. (n.d.).** *Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol*.
- **APS. (2022, 18 avril).** Biodiversité marine: bientôt une base de données nationale. *Algérie Presse Service*. [en ligne]. [Consulté le 02/05/2025] Disponible sur le site web : <https://www.aps.dz/economie/138693-biodiversite-marine-bientot-une-base-de-donnees-nationale>
- **Ardura, A., Linde, A. R., Moreira, J. C., & Garcia Vazquez, E. (2010).** DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biological Conservation*, 143(6), p.p. 1438-1443.
- **Arrieta, J. M., Arnaud-Haond, S., & Duarte, C. M. (2010).** What lies underneath: conserving the oceans' genetic resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), p.p. 18318-18324.
- **Bahrami, Y., & Zhang, W. (2014).** Bioactive compounds from sea cucumbers and their therapeutic applications. *Structure and function of food engineering*, p.p. 1-28.
- **Baker, M. S., & Wolff, M. (2009).** Selecting sites for marine protected areas in the Galapagos Islands: A case study. *Ocean & Coastal Management*, 52(10), p.p. 566-575.
- **Ballesteros, E. (2006).** Mediterranean coralligenous assemblages: A synthesis of present knowledge. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44, p.p. 123-195.

- **Bartošová, A., Velebný, M., & Bartoš, M. (2015).** FTIR spectroscopy in polysaccharide analysis. *Carbohydrate Polymers*, p.p. 123, 1-10.
- **Belbachir, M., Mezali, K., & Slimane-Tamacha, S. (2014).** Feeding ecology of *Holothuria tubulosa* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Bay of Algiers (Algeria). *Journal of Marine Biology & Oceanography*, 3(1), p.p. 1-7.
- **Belbachir, N., Mezali, K., & Soualili, D. L. (2014).** Ecological distribution of holothurians in the bay of Annaba (Northeast Algeria). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 34, p.p. 18-25.
- **Belkacem, N. (2016).** *Extraction verte et caractérisation des molécules bioactives dans les coproduits marins*. [Mémoire de maîtrise. Biotechnologie. Canada : Université Laval].
- **Ben Daoued, H., Baccour, J., Abed, A., & Miled, N. (2023).** Étude des saponines isolées d'une espèce d'holothurie (*Holothuriapoli*) (Delle Chiaje, 1823) des côtes tunisiennes. *Bulletin de l'Institut National des Sciences et Technologies de la Mer*, 50, p.p. 1-10.
- **Ben Ismail, H., Ouanes, Z., Gazquez, A., & Abed, A. (2010).** Caractérisation biochimique de quelques espèces d'holothuries des côtes tunisiennes. *CIESM Congress 2010, Venice*. [en ligne]. [Consulté le 13/04/2025]. Disponible sur le site web : [https://www.researchgate.net/publication/340682329\\_CHARACTERISATION\\_BIOCHIMIQUE\\_DE\\_QUELQUES\\_ESPECES\\_D\\_HOLOTHURIES\\_DES\\_COTES\\_TUNISIENNES](https://www.researchgate.net/publication/340682329_CHARACTERISATION_BIOCHIMIQUE_DE_QUELQUES_ESPECES_D_HOLOTHURIES_DES_COTES_TUNISIENNES)
- **Ben Rebah, F., & Miled, N. (2013).** Fatty acid composition in two sea cucumber species, *Holothuria scabra* and *Holothuria polii*. *Journal of Food Biochemistry*, 37(4), p.p. 418-423.
- **Benallal, A. M., Kerfouf, A., Becheker, A., de los Ríos-Escalante, P. R., & Françoise, D. (2024).** An ecological study on *Posidonia oceanica* (Linnaeus) Delile, 1813 meadow in Rachgoun Island (Algerian west coast, Mediterranean Sea). *Journal of the Black Sea/Mediterranean Environment*, 30(3), p.p. 169-182. [en ligne]. [Consulté le 29/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://blackmeditjournal.org/vol-30-2024/vol-30-2024-no-3/an-ecological-study-on-posidonia-oceanica-linnaeus-delile-1813-meadow-in-rachgoun-island-algerian-west-coast-mediterranean-sea/>
- **Soft corals (Cnidaria: Octocorallia) from southern Taiwan: IV.** The genera *Lobophytum*, *Sarcophyton*, and *Sinularia*. *Zoological Studies*, 47(4), p.p. 142-161.
- **Benedetti, P., et al. (2019).** *Bioactive Metabolites from Echinoderms: Potential for Pharmaceutical Applications*. *Marine Drugs*, 17(9), p.p. 478.
- **Bensari, B., Bahbah, L., Lounaouci, A., Fahci, S.E., Bouda, A., & Bachari, N.E.I. (2020).** First records of non-indigenous species in port of Arzew (Algeria : southwestern Mediterranean). *Mediterranean Marine Science*. [en ligne]. [Consulté le 01/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.12681/mms.21927>
- **Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., & Sayers, E.W. (2013).** GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), p.p. 36-42.
- **Bergmann, M., Gutow, L., & Klages, M. (2009).** *Marine anthropogenic litter*. USA: Springer.
- **Blunt, J. W., Carroll, A. R., & Copp, B. R. (2018).** *Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 35(1), p.p. 8-53.
- **Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H., & Prinsep, M.R. (2017).** Marine natural products. *Natural product reports*, 34(3), p.p. 235-294. [en ligne]. [Consulté le 20/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1039/C6NP00124F>
- **Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H., & Prinsep, M.R. (2017).** Marine natural products. *Natural product reports*, 34(3), p.p. 235-294. [en ligne]. [Consulté le 20/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1039/C6NP00124F>
- **Blunt, J. W., et al. (2018).** *Marine natural products*. *Natural Product Reports*, 35(1), p.p. 8-53.

- **Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011).** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—a review. *Marine drugs*, 9(10), p.p.1761-1805.
- **Bordbar, S., Anwar, F., & Saari, N. (2011).** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods—A review. *Marine Drugs*, 9(10), p.p.1761-1805.
- **Bordbar, S., Anwar, S. H., & Saari, N. (2011).** High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods. *Journal of Functional Foods*, 3(3), p.p. 171-180.
- **Borrell, Y. J., Miralles, L., DoHuu, H., Mohammed-Geba, K., & Garcia-Vazquez, E. (2020).** DNA in a bottle—Rapid metabarcoding survey for early alerts of invasive species in ports. *PLoS ONE*, 15(9), p.p. 238-557.
- **Boudouresque, C. F., Bernard, G., Bonhomme, P., Charbonnel, E., Diviacco, G., Meinesz, A., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Ruitton, S., & Tunesi, L. (2006).** *Préservation et conservation des herbiers à Posidonia oceanica*. USA : RAMOGE Publication.
- **Boudouresque, C.F. et al., 2012 –** *Protection et conservation des herbiers de Posidonia oceanica*.
- **Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995).** Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), p.p. 25-30.
- **Broggi, F., & Buck, M. (2014)** . Bioprospecting under the Nagoya Protocol: a conservation booster?. *IDDRI Policy Brief*, (14). [en ligne]. [Consulté le 13/05/2025]. Disponible sur le site web : [https://www.iddri.org/sites/default/files/import/publications/pb1413\\_cc-rl-rp\\_bioprospecting-nagoya.pdf](https://www.iddri.org/sites/default/files/import/publications/pb1413_cc-rl-rp_bioprospecting-nagoya.pdf)
- **Brusca, R. C., Moore, W., & Shuster, S. M. (2016).** *Invertebrates* (3rd ed.). Sinauer Associates.
- **Bucklin, A. (2000).** Methods for population genetic analysis of zooplankton. In R. P. Harris, P. H. Wiebe, J. Lenz, H. R. Skjoldal, & M. Huntley (Eds.), *ICES Zooplankton Methodology Manual*. p.p. 533-570. USA: Academic Press.
- **Bucklin, A., Steinke, D., & Blanco Bercial, L. (2011).** DNA barcoding of marine metazoa. *Annual Review of Marine Science*, 3, p.p. 471-508.
- **Budd, G. C. (2008).** *Alcyonium digitatum*. Dead man's fingers. Marine Life Information Network: Biology and Sensitivity Key Information Reviews. Plymouth: Marine Biological Association of the United Kingdom.
- **Budd, G. E., & Jensen, S. (2000).** A critical reappraisal of the fossil record of the bilaterian phyla. *Biological Reviews*, 75(2), p.p. 253–295.
- **Bulleri, F., Benedetti-Cecchi, L., & Cinelli, F. (1999).** Grazing by the sea urchins *Arbacia lixula* L. and *Paracentrotus lividus* Lam. in the Northwest Mediterranean. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 241(1), p.p. 81-95.
- **Bulti, T., & Šuput, D. (1997).** Toxic effects of equinatoxin, acetylolytictoxin from the sea anemone *Actinia equina*, on the compound action potential in isolated sciatic nerve. *Toxicon*, 35(11), p.p. 1709-1716. [en ligne]. [Consulté le 12/05/2025]. Disponible sur le site web : [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(97\)00058-X](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(97)00058-X)
- **Campos, P. F., Craig, O. E., Turner-Walker, G., Peacock, E., Willerslev, E., & Gilbert, M. T. P. (2012).** DNA in ancient bone - Where is it located and how should we extract it? *Annals of Anatomy*, 194(1), p.p. 7- 16.
- **Carroll, A. R., et al. (2021).** Marine natural products. *Natural Product Reports*, 38(1), p.p. 1–58.
- **Cartwright, P., & Collins, A. G. (2007).** Fossils and phylogenies: integrating multiple lines of evidence. *Integrative and Comparative Biology*, 47(5), p.p. 744–751.
- **Catanzaro, R., & Greco, V. (2020).** Carotenoids from marine organisms: sources, biological activities, and applications. *Marine Drugs*, 18(11), p.560.

- **Caulier, G., Flammang, P., Gerbaux, P., & Eeckhaut, I. (2011).** Preservation of the bioactives aponins of *Holothuria scabra* through the processing of trepang. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, (31), p.p. 48-51 [en ligne]. [Consulté le 30/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://www.vliz.be/imisdocs/publications/ocrd/257884.pdf>
- **Cerrano, C., Bavestrello, G., Bianchi, C.N., Cattaneo-Vietti, R., Bava, S., Morganti, C., ... & Sponga, F. (2000).** A catastrophic mass-mortality episode of gorgonians and other organisms in the Ligurian Sea (North-western Mediterranean), summer 1999. *Ecology Letters*, 3(4), p.p. 284-293.
- **Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., & Omar, M. (1995).** Antioxidant and antibacterial activity of leaves of *Etlingera* species (Zingiberaceae) in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, 104(4), p.p. 1586-1593.
- **Coelho, A. V., Vieira, H., Almeida, M., Gonçalves, L. G., Silva, T. H., Rocha, M. S., ... & Romano, G. (2024).** Bioprospecting and marine 'omics': surfing the deep blue sea for novel bioactive proteins and peptides. *Frontiers in Marine Science*, 11, p.p. 136-2697.
- **Coll, J. C., Bowden, B. F., Tapiolas, D. M., Willis, R. H., Djura, P., Streamer, M., & Trott, L. (1987).** Studies of Australian soft corals. XXXV. The terpenoid chemistry of soft corals and its implications. *Tetrahedron*, 43(6), p.p. 1177-1192. [en ligne]. [Consulté le 13/06/2025]. Disponible sur le site web : [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)90242-8](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)90242-8)
- **Coma, R., Ribes, M., & Gili, J. M. (1995).** Growth and production of the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso, 1826). *Marine Ecology Progress Series*, 121, p.p. 173-182.
- **Coma, R., Ribes, M., Zabala, M., & Gili, J. M. (1995).** Reproduction and cycle of gonadal development in the Mediterranean gorgonian *Paramuricea clavata*. *Marine Ecology Progress Series*, 117, p.p. 173-183.
- **Costello, M. J., Coll, M., Danovaro, R., Halpin, P., Ojaveer, H., & Miloslavich, P. (2010).** A census of marine biodiversity knowledge, resources, and future challenges. *PLoS ONE*, 5(8), p.p. 12-110.
- **Cowart, D. A., Pinheiro, M., Mouchel, O., Maguer, M., Grall, J., Miné, J., & Arnaud-Haond, S. (2015).** Metabarcoding is powerful yet still blind: A comparative analysis of morphological and molecular surveys of seagrass communities. *PLoS ONE*, 10(2), p.p. 117-562.
- **Cristescu, M. E. (2014).** From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: Towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10), p.p. 566-571.
- **Custódio, M. R., & Costa, P. M. (2024).** *Marine Invertebrates: Biochemical Composition and Biotechnological Potential*. USA: Springer.
- **Custódio, M. R., & Costa, P. M. (2024).** *Marine Invertebrates: Biochemical Composition and Biotechnological Potential*. USA: Springer.
- **Daly, M., et al. (2007).** The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity. *Zootaxa*, 1668, p.p. 127-182.
- **Das, A., et al. (2020).** *Immunomodulatory Effects of Saponins Derived from Echinoderms: A Review*. *Marine Drugs*, 18(11), p.562.
- **Dawson, M.N., Raskoff, K.A., & Jacobs, D.K. (1998).** Field preservation of marine invertebrate tissue for DNA analyses. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(2), p.p. 145-152.
- **Decroo, A., De Winter, B. Y., & Decroo, T. (2017).** Optimisation des protocoles d'extraction de métabolites secondaires. USA : Presses Universitaires.

- **Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983).** A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1(4), p.p. 19-21.
- **Delsuc, F., Brinkmann, H., Chourrout, D., & Philippe, H. (2006).** Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature*, 439(7079), p.p. 965–968.
- **Demesye, J., Marquet, N., Sobel, S., & Pruvost, J. (2013).** Extraction and purification of DNA from complex biological samples: The case of molluscs. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), p.p. 915-924.
- **Di Pizzo, F., Russo, T., D'Amora, U., Tarricone, E., Ronca, A., Gloria, A., ... & Laurienzo, P. (2024).** The Characterization and Cytotoxic Evaluation of Chondrosia reniformis Collagen-Based Scaffolds Enriched with Bioactive Fucoidan. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), p1497.
- **Dorta, G., et al. (2021).** Marine Echinoderm Products: Perspectives in Pharmacology and Biotechnology. *Pharmacological Research*, 167, p.p. 105-556.
- **Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19(1), p.p. 11-15.
- **Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956).** Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), p.p. 350-356.
- **Dyson, A. (2000).** Reproductive Biology of Marine Invertebrates. England: Blackwell Science.
- **Eärn, J. E., Carlsson, J., & Olsson, J. (2013).** Effects of sample size and freezing on genotype scoring reliability and estimates of genetic diversity. *Conservation Genetics Resources*, 5(4), p.p. 1073-1081. English,
- **S., Wilkinson, C., & Baker, V. (1997).** Survey manual for tropical marine resources. Australian Institute of Marine Science.
- **Edgecombe, G. D., et al. (2011).** Higher-level metazoan relationships: recent progress and remaining questions. *Organisms Diversity & Evolution*, 11(2), p.p. 151–172.
- **Erwin, D. H., et al. (2011).** The Cambrian conundrum: early divergence and late recolonization success. *Science*, 334(6059), p.p. 1091–1097.
- **Exposito, J. Y., Cluzel, C., Garrone, R., & Lethias, C. (2002).** Evolution of collagens. *The Anatomical Record*, 268(3), p.p. 302-316. [en ligne]. [Consulté le 20/06/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1002/ar.10162>
- **Fabricius, K., & Alderslade, P. (2001).** *Soft corals and sea fans: A comprehensive guide to the tropical shallow water genera of the central-west Pacific, the Indian Ocean and the Red Sea*. Australia: Australian Institute of Marine Science.
- **FAO. (2020).** *La situation mondiale des pêches et de l'aquaculture 2020. La durabilité en action*. Rome. [en ligne]. [Consulté le 22/03/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.4060/ca9229fr>
- **Fernández-Marín, B., García-Plazaola, J. I., Hernández, A., & Esteban, R. (2018).** Plant photosynthetic pigments: Methods and Tricks for correct quantification and identification. In *Springer Books*. p.p. 29– 50.
- **Fischer, W., Bauchot, M. L., & Schneider, M. (1987).** Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche. Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertébrés. Italy: FAO.
- **Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), p.p. 497-509.

- **Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), p.p. 294-299.
- **Fontaneto, D., Herniou, E. A., Boschetti, C., Caprioli, M., Melone, G., Ricci, C., & Barraclough, T. G. (2009).** Independently evolving species in asexual bdelloid rotifers. *PLoS Biology*, 7(4), e1000056.
- **Frankham, R. (2005).** Genetics and extinction. *Biological Conservation*, 126(2), p.p. 131–140.
- **Franks, F. (1990).** Freeze drying: From empiricism to predictability. *Cryo-Letters*, 11, p.p. 93-110.
- **Fredalina, B. D., Ridzwan, B. H., Abidin, A. A. Z., Kaswandi, M. A., Zaiton, H., Zali, I., ... & Kiew, P. L. (1999).** Fatty acid composition in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*. *General Pharmacology: The Vascular System*, 33(4), p.p. 337-340. [en ligne]. [Consulté le 14/06/2025]. Disponible sur le site web : [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(99\)00026-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(99)00026-0)
- **Galasso, C., Corinaldesi, C., & Sansone, C. (2017).** Carotenoids from marine organisms: A review. *Marine Drugs*, 15(9), 270. [en ligne]. [Consulté le 01/06/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3390/md15090270>
- **Ganley, A. R., & Kobayashi, T. (2007).** Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: Total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research*, 17(2), p.p. 184-191.
- **García-Arrarás, J. E., & Dolmatov, I. Y. (2010).** Echinoderms: Potential model systems for studies on muscle regeneration. *Current Pharmaceutical Design*, 16(8), p.p. 942-955. [en ligne]. [Consulté le 20/03/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.2174/138161210790883426>
- **García-Arrarás, J. E., & Greenberg, M. J. (2001).** Visceral regeneration in holothurians. *Microscopy Research and Technique*, 55(6), p.p. 438-451.
- **García-Raso, J. E., Gofas, S., Salas, C., Manjón-Cabeza, E., Urra, J., & García Muñoz, J. E. (2006).** Estudio de la biodiversidad (macrofauna) y caracterización de las comunidades marinas del litoral occidental de Málaga (Mediterráneo español). Informe Final. Consejería de Medio Ambiente, España: Junta de Andalucía.
- **Gimpel, A., Stelzenmüller, V., Töpsch, S., Galparsoro, I., Gubbins, M., Miller, D., ... & Koundouri, P. (2015).** A spatially explicit risk assessment approach for aquaculture–environment interactions. *ICES Journal of Marine Science*, 72(2), p.p. 516-529.
- **Glaser, J. A. (1995).** Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*, 18(1), p.p. 62-63.
- **Glaser, J. A. (1995).** Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*, 18(1), p.p. 62-63.
- **Haddad, S., & El Aihar, Y. (2021).** *Inventaire et Systématique de quelques Invertébrés et Vertébrés Marins de la côte Algérienne*. Thèse de Master. Aquaculture. Alger : ENSSMAL.
- **Hall, T. A. (1999).** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, p.p. 95-98.
- **Han, H., Li, L., Yi, Y. H., Wang, X. H., & Pan, M. X. (2017).** Bioactive triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Journal of natural products*, 80(8), p.p. 2317-2328. [en ligne]. [Consulté le 23/06/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00376>
- **Hanke, M., & Wink, M. (1994).** Direct DNA sequencing of PCR-amplified vector inserts following enzymatic degradation of primer and dNTPs. *BioTechniques*, 17(5), p.p. 858-860.

- **Harley, C.D., Randall Hughes, A., Hultgren, K.M., Miner, B.G., Sorte, C.J., Thornber, C.S., Rodriguez, L. F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006).** The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology Letters*, 9(2), p.p. 228-241.
- **Harvey, A. L. (2010).** High Throughput Extraction of Plant, Marine and Fungal Specimens for Preservation in a Natural Product Extract Library. *Molecules*, 15(7), p.p. 4526-4548. [en ligne]. [Consulté le 08/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3390/molecules15074526>
- **Haszprunar, G. (2000).** Is the Aplousobranchia monophyletic? *American Malacological Bulletin*, 15(2), p.p. 115–130.
- **Hawkins, T. L., O'Connor-Morin, T., Roy, A., & Santillan, C. (1994).** DNA purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic Acids Research*, 22(21), p.p. 4543-4544.
- **Hayward, P. J., & Ryland, J. S. (1995).** Handbook of the marine fauna of North-West Europe. USA: Oxford University Press.
- **He, J., et al. (2021).** Bioactive Toxins from Cnidarians: Recent Advances in Research and Potential Therapeutic Applications. *Marine Drugs*, 19(1), p.32.
- **Hebert, P.D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003).** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1512), p.p. 313–321.
- **Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., & deWaard, J.R. (2003).** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), p.p. 313- 321.
- **Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., & deWaard, J.R. (2003).** Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), p.p. 313- 321.
- **Heinemann, S., Ehrlich, H., Douglas, T., Heinemann, C., Worch, H., Schatton, W., & Hanke, T. (2007).** Ultra structural studies on the collagen of the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo. *Biomacromolecules*, 8(11), p.p.3452-3457.
- **Hooper, J. N.A., & van Soest, R. W. M. (Eds.). (2002).** *Systema Porifera: A Guide to the Classification of Sponges*. USA: Springer.
- **Howell, K. L., Bullimore, R. D., & Foster, N. L. (2014).** Quality assurance in the identification of deep-sea taxa from video and image analysis: Response to Henry and Roberts. *ICES Journal of Marine Science*, 71(4), p.p. 899-906. [en ligne]. [Consulté le 09/06/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1038/srep12505>
- **Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008).** Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6), p.p. 609–623.
- **Hughes, D.J., & Gili, J.M. (2020).** *Gorgonian Corals: Biology, Ecology, and Conservation*. USA: CRC Press.
- **Husni, A., Ustadi, U., & Nugroho, R. A. (2018).** Antioxidant activity of ethanolextract and fractions of sea cucumber *Holothuria scabra*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21(3), p.p. 486-493.
- **Ifremer, 2023**– Fichesur *Posidonia oceanica*.
- **Innis, M.A., & Gelfand, D.H. (1990).** Optimization of PCRs. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 3-12). the United States: Academic Press.
- **Ioannou, E., Vagias, C., & Roussis, V. (2009)** . Secondary metabolites from the gorgonian octocorals *Eunicella cavolinii* and *Eunicella singularis*. *Marine drugs*, 7(4), p.p. 513-533. [en ligne]. [Consulté le 02/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3390/md7040513> .

- **Jaspars, M., DePascale, D., Andersen, J. H., Reyes, F., Crawford, A. D., & Ianora, A. (2016).** The marine bio discovery pipeline and ocean medicines of tomorrow. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 96(1), p.p. 151-158.
- **Jimeno, A., Faircloth, G., FernándezSousa-Faro, J. M., Scheuer, P., & Rinehart, K. (2004).** Newmarine anticancer agents. *Marine Drugs*, 2(1), p.p. 14-29. [en ligne]. [Consulté le 25/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3390/md2010014>
- **Karel, M. (1973).** Protein-lipid interactions. *Journal of Food Science*, 38(5), p.p. 756-763.
- **Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., & Drummond, A. (2012).** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), p.p. 1647-1649.
- **Kermekchiev, M. B., Kirilova, L. I., Vail, E. E., & Barnes, W. M. (2009).** Mutants of Taq DNA polymerase resistant to PCR inhibitors allow DNA amplification from whole blood and crude soil samples. *Nucleic Acids Research*, 37(5), e40.
- **Keskin, E., & Atar, H. H. (2013).** DNA barcoding commercially important fish species of Turkey. *Molecular Ecology Resources*, 13(5), p.p. 788-797.
- **Kim, Y. A., et al. (2019).** *Conotoxins: Mechanisms and Potential Uses in Pain Management*. *Marine Drugs*, 17(5), p. 287.
- **Kimura, S., & Lee, J. C. (2017).** Spinochromes from sea urchins: chemical structures, biological activities, and applications. *Marine Drugs*, 15(10), p.300.
- **Kingsford, M., & Battershill, C. (1998).** Studying temperate marine environments: A handbook for ecologists. New Zealand's : Canterbury University Press.
- **Kjeldahl, J. (1883).** Neue Methode zur Bestimmung des Stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift für Analytische Chemie*, 22(1), p.p. 366-382.
- **Knoll, A. H., & Carroll, S. B. (1999).** Early animal evolution: emerging views from comparative biology and geology. *Science*, 284(5423), p.p. 2129–2137.
- **Knowlton, N. (1993).** Siblings pecies in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), p.p. 189-216.
- **Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012).** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, e3923.
- **Knowlton, N. (1993).** Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), p.p. 189- 216.
- **Kong, D., et al. (2021).** *Photoprotective Compounds from Marine Invertebrates: Potential Use in Skincare and Sunscreens*. *Marine Biotechnology*, 23(4), p.p. 506-518.
- **Leal, M. C., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, N. C., & Calado, R. (2012).** Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting ?. *PloS one*, 7(1), e30580. [en ligne]. [Consulté le 09/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030580>
- **Leal, M. C., Puga, J., Serôdio, J., Gomes, N. C., & Calado, R. (2012).** Trends in the discovery of new marine natural products from invertebrates over the last two decades—where and what are we bioprospecting?. *PloS one*, 7(1), e30580. [en ligne]. [Consulté le 09/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030580>
- **Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C. Y., & Kim, Y. H. (2012).** Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments*, 62, e3923.
- **Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J. T., & Machida, R. J. (2013).** A new versatile primer set targeting a short fragment of the

mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10(1), p. 34.

- **Lewis, R. J., & Garcia, M. L. (2003).** Therapeutic potential of venom peptides. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 790-802. <https://doi.org/10.1038/nrd1197>
- **Linares, C., Coma, R., & Zabala, M. (2008).** Restoration of threatened red gorgonian populations: An experimental and modelling approach. *Biological Conservation*, 141(2), p.p. 427-437.
- **Linares, C., Coma, R., Diaz, D., Zabala, M., Hereu, B., & Dantart, L. (2005).** Immediate and delayed effects of a mass mortality event on gorgonian population dynamics and benthic community structure in the NW Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 305, p.p.127-137.
- **Lopes, C. M., Sasso T., et al. (2017).** DNA metabarcoding in diet analysis: current best practices and future directions. *Molecular Ecology Resources*, 17(5), p.p. 973–989.
- **López-Legent, M. et al. (2020).** *Marine Natural Products from Sponges: A Treasure Trove for the Pharmaceutical Industry.* *Marine Drugs*, 18(8), p.414.
- **Luo, J., et al.(2020).** *Antitumor and Anti-inflammatory Properties of Cnidarian Toxins: A Review of the Latest Research.* *Journal of Natural Products*, 83(2), p.p.162-179.
- **Machida, R. J., Hashiguchi, Y., Nishida, M., & Nishida, S. (2009).** Zooplankton diversity analysis through single-gene sequencing of a community sample. *BMC Genomics*, 10(1), p.438.
- **Mamelona, J., Pelletier, É., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S., & Kermasha, S. (2007).** Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104(3), p.p.1040-1047.
- **Manase, M. J. A. (2013).** *Etude chimique et biologique des aponines isolées de trois espèces d'holothuries de Madagascar* [Thèse de doctorat. Chimie. France : Université de la Réunion].
- **Manier, N., AïtAïssa, S., & Pandard, P. (2023).** Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance des milieux aquatiques en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE. Aquaref.
- **Manuel, R. L.(1988).** British Anthozoa: Keys and notes for the identification of the species. *Synopses of the British Fauna*, 18, p.p. 1-241.
- **Martínez-Poveda, B., Quesada, A. R., & Medina, M. A. (2016).** Hyperforin, a bio-active compound of St. John's Wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *International Journal of Cancer*, 117(5), p.p. 775-780.
- **Martins, A., Vieira, H., Gaspar, H., & Santos, S. (2014)** . Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Marine drugs*, 12(2), p.p. 1066-1101.
- **Mayer, A. M. S., et al. (2010)** .Marine pharmacology in 2007–2008.*Marine Drugs*,8(3), p.p. 498–518.
- **McClintock, J. B., et al. (2020).** *Anticancer Properties of Marine Molluscs and Their Bioactive Compounds.* *Journal of Natural Products*, 83(11), p.p. 2756-2767.
- **Medlin, L., Elwood, H. J., Stickel, S., & Sogin, M. L. (1988).** The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene*, 71(2), p.p. 491-499.
- **Mehub, M. F., et al. (2014).** Marine sponge derived natural products. *Marine Drugs*,12(8), p.p. 4539–4577.
- **Menna, M., Imperatore, C., D'Aniello, F., & Aiello, A. (2013).** Meroterpenes from marine invertebrates: Structures, occurrence, and ecological implications. *Marine Drugs*, 11(5), p.p. 1602-1643.

- **Mezali, K., & Khelili, K. (2021).** Changes in fatty acid profile of *Holothuria forskali* muscle following acute mercury exposure. *Grasas y Aceites*, 72(4), e426. [en ligne]. [Consulté le 12/05/2025]. Disponible sur le site web : <https://doi.org/10.3989/gya.1101202>
- **Modica, M. V., & Costa, P. M. (2024).** Venom composition of *Eunicella singularis*: A proteo- transcriptomic approach. *Toxins*, 16(5), 200.
- **Modica, M. V., Leone, S., Gerdol, M., Greco, S., Aurelle, D., Oliverio, M., Fassio, G., Koulali, K. E., Barrachina, C., & Dutertre, S. (2024).** The proteotranscriptomic characterization of venom in the white sea fan *Eunicella singularis* elucidates the evolution of *Octocorallia* arsenal. *Bio Rxiv (ColdSpringHarbor Laboratory)*. <https://doi.org/10.1101/2024.05.31.596435>
- **Molinski, T. F., et al. (2009).** Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8, p.p. 69–85.
- **Monteiro, L., Bonnemaïson, D., Vekris, A., Petry, K.G., Bonnet, J., Vidal, R., Cabrita, J., & Mégraud, F. (1997).** Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(4), p.p. 995-998.
- **Mooi, R., & David, B. (1997).** Skeletal homologies of echinoderms. *Paleontological Society Papers*, 3, p.p. 305–335.
- **Mora, C., Tittensor, D. P., Adl, S., Simpson, A. G., & Worm, B. (2011).** How many species are there on Earth and in the ocean ? *PLoS Biology*, 9(8), e1001127.
- **Moreira, D. A., Oliveira, C. D., Oliveira, C. J., & Hanner, R. (2011).** DNA barcoding of commercially important freshwater fish species from north-eastern Brazil. *Mitochondrial DNA*, 22(sup1), p.p. 97-106.
- **Muller, W. E. G., et al (2018).** *Cnidarian Toxins : Applications in Biomedical and Pharmaceutical Research. Marine Drugs*, 16(7), p. 214.
- **Nagy, Z. T. (2010).** A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms Diversity & Evolution*, 10(1), p.p. 91-105.
- **NCBI (National Center for Biotechnology Information). (2024).** *GenBank Overview*. [Consulté le 10/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>
- **Nielsen, C. (2012).** *Animal Evolution : Interrelationships of the Living Phyla* (3rd ed.). Oxford University Press.
- **NOAA Diving Manual. (2017).** *Diving for science and technology* (6th ed.). Best Publishing Company.
- **Norton, R. S., Bobek, G., Ivanov, J. O., Howden, M.E., Edmonds, O.P., Gage, P. W., & Heinemann, S. H. (1982).** Partial characterization of polypeptide toxins from two sea anemones. *Toxicon*, 20(6), 1043- 1048. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(82\)90073-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(82)90073-7)
- **Nurilmala, M., Safithri, M., Pertiwi, R. M., & Ochiai, Y. (2020).** Extraction and characterization of collagen from sand sea cucumber (*Holothuria scabra*). *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 23(1), p.p. 16-25 [Consulté le 09/04/2025]. Disponible sur le site web : <https://journal.ipb.ac.id/index.php/JIPI/article/download/30443/21862/>
- **Oldham, P., Hall, S., & Burton, G. (2012).** Will the Nagoya Protocol restrict access to genetic resources ?. *Ecological Economics*, 82, p.p. 120-122. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2012.07.011>
- **Opel, K. L., Chung, D., & McCord, B. R (2010).** A study of PCR inhibition mechanisms using realtime PCR. *Journal of Forensic Sciences*, 55(1), p.p. 25-33.
- **Östman, C. (2000).** A guide book to the cnidae of *Actinia equina* (Cnidaria:Actiniaria). *Scientia Marina*, 64(2), p.p. 133-143.
- **Paithankar, K.R., & Prasad, K.S. (1991).** Precipitation of DNA by poly-ethylene glycol and ethanol.

- **Palumbi, S.R. (2003).** Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, 13(1), S146–S158.
- **Pante, E., Schoelinck, C., & Puillandre, N. (2015).** From integrative taxonomy to species description : One step beyond. *Systematic Biology*, 64(1), 152-160.
- **Pardo, L. M., Ampuero, D., & Veliz, D. (2014).** Using morphological and molecular tools to identify megalopae larvae collected in the field : The case of sympatric Cancer crabs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 94(7), p.p. 1451-1458.
- **Paul, V.J., et al. (2020).** *Marine Natural Products: Bioactive Molecules and Bioactive Compounds from Sponges. Marine Drugs*, 18(5), p. 271.
- **Pawlowski, J., Audic, S., Adl, S., Bass, D., Belbahri, L., Berney, C., Bowser, S. S., et al. (2012).** CBOL protist working group: Barcoding eukaryotic richness beyond the animal, plant, and fungal kingdoms. *PLoS Biology*, p. 10(11), e1001419.
- **Pechenik, J. A. (2015).** *Biology of the Invertebrates* (7th ed.). McGraw-Hill.
- **Pergent, G., et al., (2015) – Status of Posidonia oceanica meadows in the Mediterranean.** Consulté sur
- **Piel, J. (2009).** Metabolites from symbiotic bacteria. *Nature Product Reports*, p.p. 26(3), 338–362.
- **Pinsino, A., Russo, R., Celi, M., Vaccaro, M. C., Arizza, V., & Matranga, V. (2012).** Toxicity and signalling role of naphthoquinone-(polyketide)-pigments in sea urchin embryos. *FEBS Journal*, 279(8), p.p. 1475-1489. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08530.x>
- **PlanBleu. (2019).** State of the Environment and Development in the Mediterranean. UNEP/MAP.
- **Ponder, W. F., & Lindberg, D. R. (2008).** *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press.
- **Porebski, S., Bailey, L.G., & Baum, B. R. (1997).** Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Molecular Biology Reporter*, p.p. 15(1), 8-15.
- **Pozzolini, M., Millo, E., Oliveri, C., Mirata, S., Salis, A., Damonte, G., ... & Cerrano, C. (2020).** Identification, Purification and Molecular Characterization of Chondrosin, a New Protein with Anti- tumoral Activity from the Marine Sponge *Chondrosia Reniformis* (Nardo, 1847). *Marine Drugs*, p.p. 18(7), 358. <https://doi.org/10.3390/md18070358>
- **Pozzolini, M., Scarfi, S., Gallus, L., Castellano, M., Vicardi, R., Cortese, K., ... & Cerrano, C. (2016).** Extraction of Collagen/Gelatin from the Marine Demosponge *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) Using Water Acidified with Carbon Dioxide–Process Optimization. *Marine drugs*, p.p. 14(6), 109. <https://doi.org/10.3390/md14060109>
- **Pozzolini, M., Sturla, L., Cerrano, C., Bavestrello, G., & Benatti, U. (2018).** Molecular characterization of a nonfibrillar collagen from the marine sponge *Chondrosia reniformis* Nardo 1847 and its role in the formation of the sponges skeleton. *Marine Biotechnology*, 20(3), p.p. 371-384. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9800-4>
- **Prendini, L., Hanner, R., & DeSalle, R. (2002).** Obtaining, storing and archiving specimens and tissue samples for use in molecular studies. In R. DeSalle, G. Giribet, & W. Wheeler (Eds.), *Techniques in molecular systematics and evolution* (pp. 176-248). Birkhäuser.
- **Proksch, P., et al. (2022).** *Bioactive Compounds from Marine Sponges: Chemistry, Biology and Applications. Marine Drugs*, 20(1), 1-12.
- **Queiroz, C., Lopes, M. L. M., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008).** Polyphenol oxidase: Characteristics and mechanisms of browning control. *Food Reviews International*, 24(4), p.p. 361-375.

- **Rabei, M. (2024).** *La faune et la flore associée aux herbiers de Posidonia oceanica dans la côte Algérienne.* Mémoire de fin d'études, ENSSMAL. [en ligne]. [Consulté le 14/04/2025] disponible sur: <https://virtuallibrary.enssmal.edu.dz/collection/item/13599-la-faune-et-la-flore-associee-aux-herbiers-de-posidonia-oceanica-dans-la-cote-algerienne>
- **Rabei, M. (2024).** *Vers une base de données génétiques pour la biodiversité marine en Algérie.* Conférence nationale sur la biotechnologie marine, Alger.
- **Ramos-Silva, P., Dubois, M., Genta-Jouve, G., & Thomas, O. P. (2021).** Omics-based molecular analyses of adhesion by aquatic invertebrates. *Biological Reviews*, 96(4), p.p. 1549-1575. <https://doi.org/10.1111/brv.12691>
- **Ransome, E., Geller, J. B., Timmers, M., Leray, M., Mahardini, A., Sembiring, A., Collins, A. G., & Meyer, C. P. (2017).** The importance of standardization for biodiversity comparisons: A case study using autonomous reef monitoring structures (ARMS) and metabarcoding to measure cryptic diversity on Mo'orea coral reefs, French Polynesia. *PLoS ONE*, 12(4), e0175066.
- **Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007).** BOLD: The Barcode of Life Data System. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), p.p. 355–364.
- **Reyes, A., Evseev, A., Mahn, A., Bubnovich, V., Bustos, R., & Scheuermann, E. (2007).** Effect of operating conditions in freeze-drying on the nutritional properties of blueberries. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3), p.p. 303-306.
- **Ridzwan, B. H., Kaswandi, M. A., Azman, Y., & Fuad, M. (2014).** Screening for antibacterial agents in three species of sea cucumbers from coastal areas of Sabah. *General Pharmacology: The Vascular System*, 25(7), p.p. 1597-1602.
- **Robinson, R. S., et al. (2019).** *Peptides and Secondary Metabolites from Marine Sponges: Potential Applications in Cancer Therapy.* *Marine Biotechnology*, 21(2), p.p. 145-161.
- **Rocha, J., Peixe, L., & Calado, R. (2011).** Diterpenes from gorgonian corals: chemical diversity and biological activities. *Marine Drugs*, 9(12), p.p. 2794-2821.
- **Rocha, J., Peixe, L., Gomes, N. C., & Calado, R. (2015).** Cnidarians as source of marine bioactive compounds—An overview of the last decade and future steps for bioprospecting. *Marine Drugs*, 9(10), p.p. 1860-1886. <https://doi.org/10.3390/md9101860>
- **Roe, B. A., Crabtree, J. S., & Khan, A. S. (2005).** *DNA isolation and sequencing.* John Wiley & Sons.
- **Romano, G., Almeida, M., Coelho, A. V., Cutignano, A., Gonçalves, L. G., Hansen, & Genevière, M. (2022).** Biomaterials and Bioactive Natural Products from Marine Invertebrates: From Basic Research to Innovative Applications. *Marine Drugs*, 20(4), 219. <https://doi.org/10.3390/md20040219>
- **Ronaghi, M., Uhlén, M., & Nyérén, P. (1998).** A Sequencing Method Based On Real-time pyrophosphate. *Science*, 281(5375), p.p. 363-365.
- **Rossi, S., Tsounis, G., & Gili, J. M. (2008).** *Eunicella singularis* (Esper, 1791): A review of its biology, ecology, and conservation. *Marine Ecology Progress Series*, 367, 255-268.
- **Rossi, S., Tsounis, G., Orejas, C., Padrón, T., Gili, J. M., Bramanti, L., ... & Teixidó, N. (2008).** Survey of deep-dwelling red coral (*Corallium rubrum*) populations at Cap de Creus (NW Mediterranean). *Marine Biology*, 154(3), p.p. 533-545. <https://doi.org/10.1007/s00227-008-0947-6>
- **Rouse, G. W., & Pleijel, F. (2001).** *Polychaetes.* Oxford University Press.
- **Sala, E., Boudouresque, C. F., & Harmelin-Vivien, M. (1998).** Fishing, trophic cascades, and structure of algal assemblages: Evaluation of an old but untested paradigm. *Oikos*, 82(3), p.p. 425-439. <https://doi.org/10.2307/3546364>

- **Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).** Molecular cloning: A laboratory manual (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Sanamyan, N., Sanamyan, K., & McDaniel, N. (2012).** The genera *Urticina* and *Cribrinopsis* in the North Pacific (Cnidaria: Actiniaria). *Invertebrate Zoology*, 9(1), p.p. 25-46.
- **Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), p.p. 5463-5467.
- **Sarà, M., & Vacelet, J. (1973).** Écologie des Démosponges. In P. P. Grassé (Ed.), *Traité de Zoologie* (p.p. 462-576).
- **Satoh, N., Rokhsar, D., & Nishikawa, T. (2014).** Chordate Evolution And The Three-phyllum system. *Proceedings Of the Royal Society B*, 281 (1794), p.p. 2014-1729.
- **Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012).** PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), p.p. 1014-1026.
- **Schram, F. R., & Koenemann, S. (2004).** Developmental genetics and arthropod evolution. *Evolution & Development*, 6(5), p.p. 303-312.
- **Sekkat, N., Guerbet, M., & Jouany, J. M. (2001).** Étude comparative de huit bioessais à court terme pour l'évaluation de la toxicité de dix produits de déchets urbains et industriels. *Revue Sciences De L'eau / Journal of Water Science*, 14(1), p.p. 63-72. <https://doi.org/10.7202/705409ar>
- **Seutin, G., White, B. N., & Boag, P. T. (1991).** Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Canadian Journal of Zoology*, 69(1), p.p. 82-90.
- **Sharma, R., Mahla, H. R., Mohapatra, T., Bhargava, S. C., & Sharma, M. M. (2014).** Isolating plant genomic DNA without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21(1), p.p. 43-50.
- **Shirsat, R. N., & Goswami, D. (2024).** A Generalized Review on Extraction of Biomolecules. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 84(1), 180-187. [en ligne]. [Consulté le 14/04/2025] (Consulté sur ResearchGate: [https://www.researchgate.net/publication/368818046\\_A\\_Generalized\\_Review\\_on\\_Extraction\\_of\\_Biomolecules](https://www.researchgate.net/publication/368818046_A_Generalized_Review_on_Extraction_of_Biomolecules))
- **Silva, T. H., Alves, A., Ferreira, B. M., Oliveira, J. M., Reys, L. L., Ferreira, R. J., ... & Reis, R. L. (2012).** Materials of marine origin: A review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*, 57(5), p.p. 276-306. <https://doi.org/10.1179/1743280412Y.0000000002>
- **Singh, S., & Singh, P. (2015).** Marine natural products: chemical diversity and therapeutic potential. *Natural Product Research*, 29(15), p.p. 1385-1402.
- **Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999).** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods Enzymology*, 299, p.p. 152-178.
- **Sipkema, D., Franssen, M. C., Osinga, R., Tramper, J., & Wijffels, R. H. (2005).** Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7(3), p.p. 142-162. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-0405-5>
- **Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010).** Introduction to Modern Liquid Chromatography. John Wiley & Sons.
- **Somaida, A., & Custódio, M. R. (2024).** *Holothuria tubulosa*: A promising source of bioactive compounds. *Journal of Marine Biotechnology*, 10(2), p.p. 45-58.
- **Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., Harvey, E. S., & Bunce, M. (2017).** Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7(1), p. 12240.

- **Stein, E. D., White, B. P., Mazor, R. D., Miller, P. E., & Pilgrim, E. M. (2013).** Evaluating ethanol as a preservative for benthic invertebrates in stream bioassessment programs. *Journal of the North American Benthological Society*, 32(4), 1358-1365.
- **Stoeckle, M. Y., & Thaler, D. S. (2014).** DNA barcoding works in practice but not in (neutral) theory. *PLoS ONE*, 9(7), e100755.
- **Taberlet, P., Coissac, E., Pompanon, F., Brochmann, C., & Willerslev, E. (2012).** Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21(8), p.p. 2045-2050.
- **Tang, C. Q., Leasi, F., Obertegger, U., Kieneke, A., Barraclough, T. G., & Fontaneto, D. (2012).** The widely used small subunit 18S rDNA molecule greatly underestimates true diversity in biodiversity surveys of the meiofauna. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(40), p.p. 16208-16212.
- **Telesca, L. et al., (2015)** – *Seagrass Meadows (Posidonia Oceanica) distribution and trajectories of change*, *Scientific Reports*.
- **Thomas, N. V., & Kim, S. K. (2013).** Marine Bioprospecting—An Approach to Discover Drugs. *Advances in Food and Nutrition Research*, 69, p.p. 1-17.
- **Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P., & LokaBharathi, P. A. (2010).** Marine drugs from sponge–microbe association. *Marine Drugs*, 8(4), p.p. 1417–1468.
- **Tripoteau, L. (2015).** *Valorisation des coproduits de l'holothurie Cucumaria frondosa par l'extraction de molécules bioactives et l'étude de leurs activités biologiques* [Thèse de doctorat, Université du Québec À Rimouski]. [en ligne]. [Consulté le 14/01/2025] (Consulté via HAL theses: <https://theses.hal.science/tel01297042v1/file/2015theseTripoteauL.pdf>)
- **Truong, L., Suthers, I. M., Cruz, D. O., & Smith, J. A. (2019).** Plankton-based diet of larval fish in an urbanised estuary in the Sydney Basin. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 222, p.p. 86-98.
- **Tyler, P. A., & Young, C. M. (2003).** Dispersal at hydrothermal vents: a summary of recent progress. *Hydrobiologia*, 503, p.p. 9–19.
- **Underwood, A. J., & Chapman, M. G. (1996).** Scales Of Spatial Patterns Of Distribution Of Intertidal invertebrates. *Oecologia*, 107(2), p.p. 212-224.
- **UNEP/MAP, (2019)** – *State of the Environment and Development in the Mediterranean*. [en ligne]. [Consulté le 14/04/2025] Consulté sur : <https://planbleu.org/en/publications/state-of-environment-and-development-in-the-mediterranean-2019/>
- **Ustyuzhanina, N. E., & Nifantiev, N. E. (2019).** Glycosylated carotenoids from marine organisms: structure, biological activity, and applications. *Marine Drugs*, 17(12), p. 650.
- **Ustyuzhanina, N. E., & Nifantiev, N. E. (2020).** Fucosylated chondroitin sulfates from sea cucumbers: structure, biological activity, and applications. *Marine Drugs*, 18(10), p. 500.
- **Ustyuzhanina, N. E., & Nifantiev, N. E. (2022).** Sulfated polysaccharides from marine invertebrates: structure, biological activity, and applications. *Marine Drugs*, 20(1), p. 45.
- **Uthicke, S., & Purcell, S. (2004).** Preservation of genetic diversity in restocking of the sea cucumber *Holothuria scabra* investigated by allozyme electrophoresis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(4), p.p. 519-528.
- **Valentine, J. W., Collins, A. G., & Meyer, C. P. (1999).** Morphological complexity increase in metazoans. *Paleobiology*, 25(2), p.p. 131–142.
- **Van Dyck, S., Van Dyck, R., & Van Dyck, M. (2008).** *Méthodes d'extraction des saponines*. Éditions Scientifiques.
- **Vasta, G. R., et al. (1997).** Biotechnology of Marine Invertebrates: Current Approaches and Future Directions. *Journal of Marine Biotechnology*, 5(2-3), p.p. 141-157. [en ligne].

[Consulté le 14/10/2024] (Consulté via ResearchGate

[:https://www.researchgate.net/publication/268187436 Biotechnology of Marine Invertebrates Current Approaches and Future Directions](https://www.researchgate.net/publication/268187436_Biotechnology_of_Marine_Invertebrates_Current_Approaches_and_Future_Directions))

- **Verlaque, M., & Nédélec, H. (1983).** Biologie de *Paracentrotus lividus* (Lamarck) sur substrat rocheux en Corse (Méditerranée, France): Alimentation des adultes. *Vie et Milieu*, 33(3-4), p.p. 191-201.
- **Vonnahme, L. A., et al. (2021).** *Marine Molluscs in Cosmeceuticals: A Review of Their Bioactive Compounds and Therapeutic Potential.* *Marine Drugs*, 19(7), p.p. 372.
- **Wares, J.P., Gaines, S.D., & Cunningham, C.W. (2001).** A Comparative Study Of Asymmetric Migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*, 55(2), p.p. 295-306.
- **Webster, N. S., & Hill, R. T. (2001).** The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeide sodorabile* is dominated by  $\alpha$ -Proteobacterium. *Marine Biology*, 138(4), p.p. 843-851. <https://doi.org/10.1007/s002270000503>
- **Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Völker, M., & Fiehn, W. (1994).** Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22(20), p.p. 4354-4355.
- **White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.
- **Wilfinger, W. W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997).** Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *BioTechniques*, 22(3), p.p. 474-481.
- **Williams, L.S., et al. (2021).** *Conotoxins and Their Application in Neurobiology: Insights and Progress in Pain Management.* *Journal of Pain Research*, 14, p.p. 221-232.
- **Wilson, I.G. (1997).** Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), p.p. 3741-3751.
- **Wood, A.C. L., & Probert, P. K. (2013).** Bryozoan-dominated benthos of Otago Shelf, New Zealand: Its associated fauna, environmental setting and dynamics. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 43(2), p.p. 67-83.
- **Wu, M., Xu, L., Yang, L., Chen, S., Lin, H., & Zhao, X. (2022).** Fucosylated Chondroitin Sulfate From Sea cucumber: A review on structures, preparation and biological activities. *Carbohydrate Polymers*, 291, p.p. 119548. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119548>
- **Yang, Y., & Li, Y. (2020).** Fucoidan from *Holothuria tubulosa* improves metabolic inflammation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(40), p.p. 11111-11120.
- **Yesson, C., Taylor, M. L., Tittensor, D. P., Davies, A. J., Guinotte, J., Baco, A., Black, J., Hall Spencer, J.M., & Rogers, A.D. (2015).** Global habitat suitability of cold-water octocorals.
- **Zhang, Y., Xie, Z., Wang, Y., & Zhao, Y. (2024).** A review on marine collagen: sources, extraction methods, colloids, and applications. *Journal of Leather Science and Engineering*, 6(1), p.p. 1-20. <https://doi.org/10.1186/s42825-024-00152-y>
- **Zmemlia, N., Bejaoui, S., Khemiri, I., Bouriga, N., Louiz, I., El-Bok, S., Ben-Attia, M., & Souli, A. (2020).** Biochemical composition and antioxidant potential of the edible Mediterranean sea cucumber “*Holothuria tubulosa*”, 71(3), e364. <https://doi.org/10.3989/gya.0452191>
- **Zmemlia, S., Mezali, K., & Belbachir, M. (2020).** Ecological role of *Holothuria tubulosa* (Echinodermata: Holothuroidea) in sediment bioturbation and nutrient recycling in the Bay of Algiers (Algeria). *Oceanography & Fisheries Open Access Journal*, 12(3), p.p. 555-837.
- **Zou, Y., Yi, Y., Li, L., Liu, Z., Cui, J., & Han, H. (2016).** Terpenoids from the South China Sea Gorgonian *Eunicella*. *Marine drugs*, p. 14(11), 203. <https://doi.org/10.3390/md14110203>

## ANNEXE I

Matériel utilisé pour l'échantillonnage, le prétraitement et le conditionnement des échantillons

Catégorie	Élément	Usage Principal
<b>Biologique</b>	8 espèces d'invertébrés marins (liste détaillée en Résultats)	Sujet de l'étude
<b>Chimique</b>	Éthanol (70 % et $\geq 95$ %)	Rinçage et conservation (ADN)
	Carboglace (CO <sub>2</sub> solide)	Maintien T °C très basse durant transport (échantillons génétiques)
<b>Appareillage</b>	Équipement de plongée SCUBA complet	Intervention subaquatique sécurisée
	Valise multiparamètre (T °C, Salinité, pH, Profondeur)	Mesure des paramètres environnementaux in situ
	Microscope optique / Loupe binoculaire	Aide à l'identification taxonomique
	Congélateur -20 °C	Conservation initiale et stockage (biochimie)
	Congélateur -80 °C	Stockage long terme (génétique)
	Lyophilisateur	Déshydratation optimale (biochimie)
	Étuve réglable	Séchage alternatif (biochimie)
	Ciseaux de plongée, poignard	Collecte d'organismes fixés
	Glacières	Transport réfrigéré des échantillons
	Balance de précision	Pesée des échantillons
	Broyeur / Homogénéisateur	Réduction des échantillons en poudre
<b>Consommable</b>	Sacs de prélèvement et filets	Contention des spécimens sous l'eau
	Gants (Nitrile, Latex)	Protection et prévention de contamination
	Piluliers	Aliquotage et stockage à -80 °C (génétique)
	Tubes Falcon (15/50 mL)	Stockage échantillons / extraits
	Flacons divers (verre, plastique)	Stockage échantillons secs/lyophilisés
	Étiquettes résistantes (eau, froid, alcool)	Identification et traçabilité
	Marqueurs indélébiles	Marquage des étiquettes et contenants

## ANNEXE II

### Matériel utilisé lors des analyses génétiques et bio-moléculaires

Catégorie	Éléments
Réactifs chimiques	<ul style="list-style-type: none"><li>- Tampon CTAB (Bromure de cétyltriméthylammonium)</li><li>- Chloroforme</li><li>- Alcool isoamylique</li><li>- Isopropanol</li><li>- Éthanol (70 % et absolu)</li><li>- Tampon TE (Tris-EDTA)</li><li>- Poudre d'agarose</li><li>- Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA)</li><li>- Bromure d'éthidium ou SYBR Safe</li><li>- Eau ultrapure (qualité biologie moléculaire)</li></ul>
Kits et enzymes	<ul style="list-style-type: none"><li>- Kit d'extraction d'AND AIONA</li><li>- Kit de purification enzymatique post-PCR (ExoSAP-IT™, Applied Biosystems)</li><li>- Kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing</li><li>- Billes magnétiques</li><li>- Taq polymérase thermostable</li><li>- dNTPs (mélange de désoxynucléotides triphosphates)</li><li>- MgCl<sub>2</sub></li><li>- NaCl</li></ul>
Amorces PCR	<ul style="list-style-type: none"><li>- Amorces universelles ARNr 18S</li></ul>
Appareillage	<ul style="list-style-type: none"><li>- Microcentrifugeuse réfrigérée</li><li>- Bain-marie</li><li>- Vortex</li><li>- Spectrophotomètre UV-Vis (NanoDrop 2000)</li><li>- Électrophorèse gel agarose</li><li>- Visualisation gel UV</li><li>- Thermocycleur</li><li>- Pipettes de précision</li><li>- Agitateur magnétique chauffant</li><li>- Séquenceur capillaire (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer)</li></ul>
Consommables	<ul style="list-style-type: none"><li>- Tubes Eppendorf (1.5 mL)</li><li>- Tubes PCR</li><li>- Cryotubes (stockage ADN)</li><li>- Parafilm®</li><li>- Gants nitrile sans poudre</li></ul>

### ANNEXE III

#### Le matériel et les réactifs utilisés pour les analyses biochimiques

Catégorie	Élément	Spécifications/Utilisation
Équipement	Bécher	Préparation des échantillons, mélanges
	Centrifugeuse	Séparation des phases liquide/solide
	Ballon taré	Récupération des extraits secs
	Évaporateur rotatif	Évaporation des solvants sous vide
	Matras de minéralisation	250 mL, pour la digestion des échantillons (Kjeldahl)
	Hotte aspirante	Protection contre les vapeurs toxiques
	Bloc digesteur	Chauffage des matras de minéralisation
	Appareil de distillation Büchi	Distillation de l'ammoniac (Kjeldahl)
	Erlenmeyer	Réception du distillat (Kjeldahl)
	Spectrophotomètre UV visible	UV-1800 Series, pour l'analyse des pigments et polyphénols
	Spectrophotomètre FTIR	Jasco FTIR-4X, résolution 4 cm <sup>-1</sup> , pour l'analyse des polysaccharides
	Colonne de chromatographie	Séparation des pigments
Réactifs/ Consommables	Chloroforme	Solvant pour l'extraction lipidique (Folch)
	Méthanol	Solvant pour l'extraction lipidique (Folch), saponines, pigments
	Papier Whatman	Filtration des extraits
	Acide sulfurique concentré (98 %)	Minéralisation (Kjeldahl)
	Catalyseur (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaSO <sub>4</sub> , Sélénium)	Minéralisation (Kjeldahl)
	Eau distillée	Dilution, rinçage
	Soude concentrée (NaOH, d = 1,33)	Libération de l'ammoniac (Kjeldahl)
	Acide borique (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> à 2 %)	Capture de l'ammoniac (Kjeldahl)
	Indicateur coloré (rouge de méthyle, vert de	Titrage (Kjeldahl)

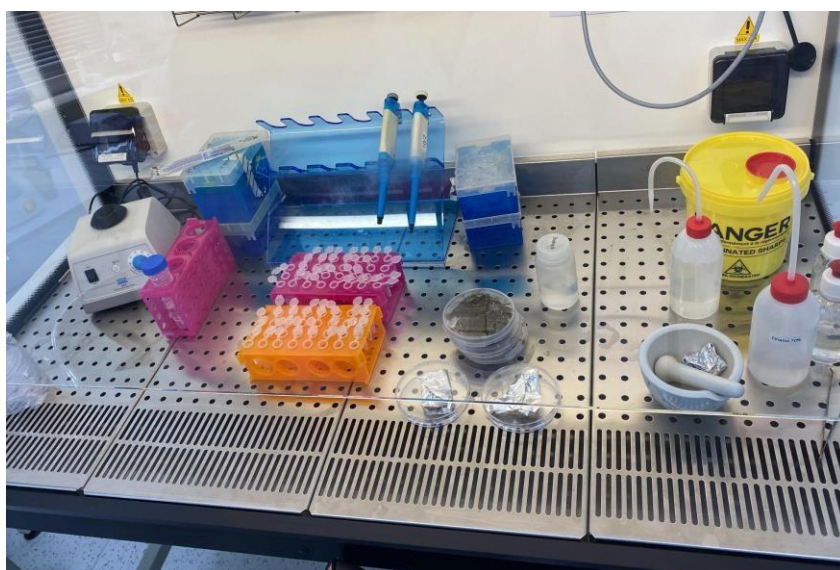
## ANNEXES

bromocrésol)	
Acide sulfurique H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> N/50	Titration (Kjeldahl)
n-hexane	Solvant pour l'extraction des saponines et pigments
Dichlorométhane	Solvant pour l'extraction des saponines
Acétone	Solvant pour l'extraction des pigments
Gel de silice 60	Phase stationnaire pour chromatographie
DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle)	Réactif pour le test d'activité antioxydante
Acide gallique	Étalon pour le dosage des polyphénols
Éthanol absolu	Solvant pour la précipitation des polysaccharides, préparation de l'acide gallique
Carbonate de sodium (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Réactif pour le dosage des polyphénols

## ANNEXES

---

### ANNEXE IV



Poste de travail lors de l'extraction de l'ADN génomique avec le kit AIONA

## ANNEXES

---

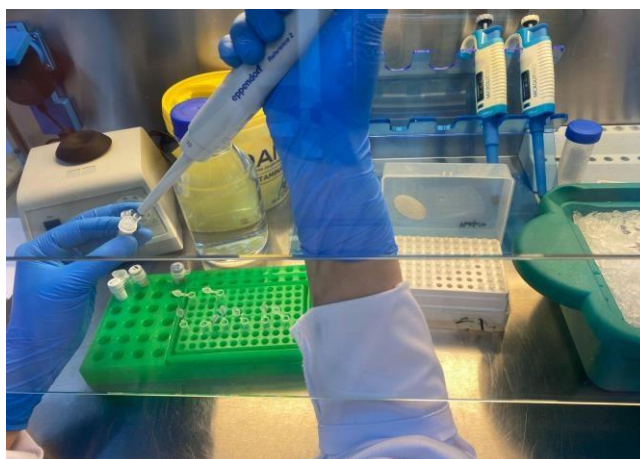


Récupération de surnageant après extraction organique

Résultat de la précipitation overnight à l'isopropanol après centrifugation

## ANNEXES

---



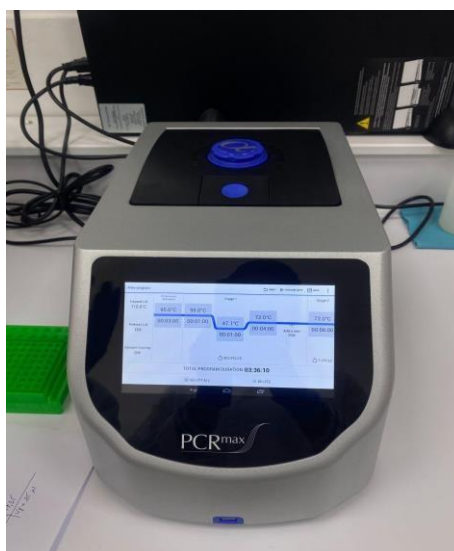
Préparation du mélange PCR pour l'amplification du gène 18S rRNA



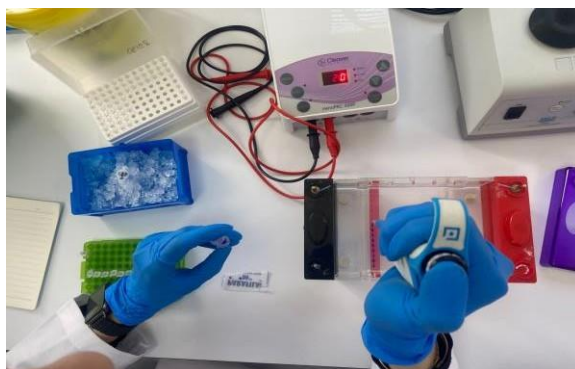
Affichage des cycles d'amplification PCR du gène 18S rRNA sur le thermocycleur SimpliAmp™

## ANNEXES

---



. Affichage des cycles de la réaction de la PCR BigDye sur thermocycleur PCRmax



Réalisation de l'électrophorèse sur gel d'agarose : dépôt des produits PCR

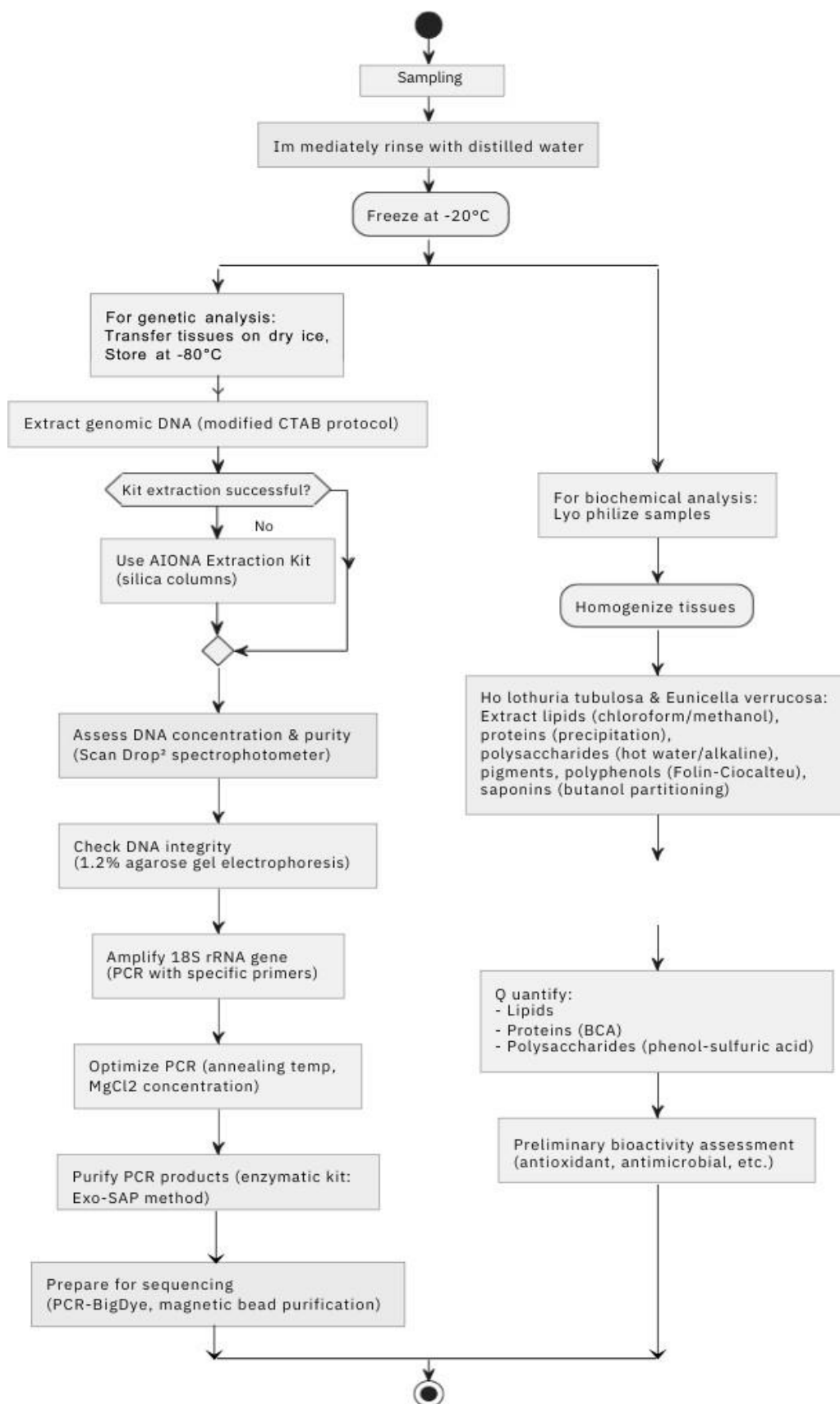
## ANNEXES

---

### ANNEXE V

# ANNEXES

## Diagramme général





## Biotechnological Valorization of Marine Biomolecules and Genetic Identification of animal marine Species along the Algerian Coast

OMANI Ilhami, BENSALEM Selma, BOUKHAROUBA Ayaz, GRIMES Samir, BRAKNA Chaima Nailas, BOUZIDI Souheira, BENDIDA Kelthoum, MERZOUG Mouhameds

1. National School of Marine Sciences and Coastal Management (ENSSMAL)

2. Laboratory for the Conservation and Valorization of Marine Resources (LCVRM), BP 19, Dely Brahim University Campus, Algiers.

3. Genomics Technology Platform, Higher School of Biological Sciences of Oran, Oran, Algeria

### ABSTRACT

The sustainable valorization of Algeria's rich marine biodiversity faces dual challenges: accurate species identification and effective biomolecule extraction. This research addresses both aspects by pioneering the molecular identification of marine species along the Algerian coast while simultaneously exploring their biochemical potential. We optimized a DNA extraction protocol for challenging invertebrates, obtaining high-quality DNA from 9 animal species and achieving successful gene amplification for some. This genetic work, a first for many targeted species in this region, aims to contribute to Algeria's national BAMBIO initiative and emerging biotechnology sector. Concurrently, preliminary biochemical analyses target valuable compounds (lipids, proteins, polysaccharides, saponins) with pharmaceutical and cosmetic potential. Although current sequencing attempts face constraints requiring further optimization, this study establishes robust molecular protocols and provides vital preliminary data, laying the groundwork for future genetic characterization and supporting the development of marine biotechnology in Algeria through an integrated approach.

### INTRODUCTION

Algeria's vast coastline harbors a rich marine biodiversity, estimated at over 3,000 species, representing a significant yet largely underutilized resource for biotechnological innovation (CBD Profile). Marine invertebrates, in particular, are known producers of unique bioactive compounds with potential pharmaceutical and cosmetic applications (Costa et al., 2023; Blunt et al., 2018). However, realizing this potential is hindered by two key challenges: the lack of comprehensive genetic data for accurate species identification and conservation, and the need for optimized protocols to extract and characterize their biomolecules. While DNA barcoding is a standard tool globally (Hebert et al., 2003; Bucklin et al., 2011), its application to Algerian marine fauna remains limited. This collaborative study between ENSSMAL and ESSBO aims to address these gaps by pursuing three primary objectives:

- Optimize and validate DNA extraction and 18S rRNA amplification protocols specifically for challenging Algerian marine invertebrate taxa.
- Generate foundational genetic identification data for selected species to contribute towards the national BAMBIO initiative (AFS, 2022).
- Conduct preliminary biochemical screening (lipids, proteins, polysaccharides, saponins, etc.) to assess the biotechnological potential of these genetically characterized organisms.

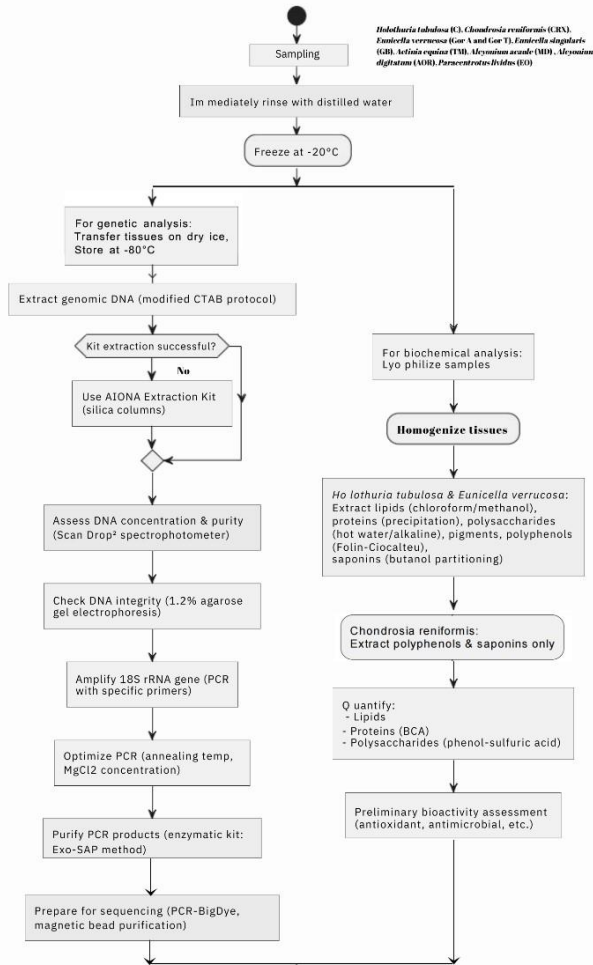
### Methodology



Figure1: Sampling Area:Rechgoun (Ain Témouchent)



Figure2: Sampling Area: Ain El Brian (Algiers)



### Results and Discussion

#### Genetic Analysis

The optimized CTAB-based protocol successfully yielded genomic DNA from all 9 marine animal species studied. However, quantification revealed significant variability in both DNA yield and purity (Table 1). Concentrations ranged widely from 50.41 ng/µl (AGR) to a high of 572.3 ng/µl (Gor T), likely reflecting species-specific differences. DNA purity (A260/A280 ratio) also varied; while several samples showed optimal ratios (~1.8), others indicated potential protein/phenolic (C, GB: ~1.4) or RNA (CRX, TM: >2.0) contamination. Despite these variations, PCR amplification of the 18S rRNA gene was successful for 7 species (Figure 1), demonstrating PCR primers specificity. Nevertheless, PCR products quality variations might contribute to the subsequent negative Sanger sequencing results, a major constraint requiring further optimization (e.g., purification, alternative primers/platforms).

DNA Sample ID	DNA Purity*	dsDNA Concentration (ng/µl)
CRX	2.1	63.67
C	1.41	76.06
EO	1.9	211.77
Gor A	1.83	256.7
Gor T	1.9	572.3
MD	1.82	300
AGR	1.88	50.41
GB	1.4	60.43
TM	2.3	345.98

Table 1: Quantification and Purity of Genomic DNA from Marine Animal Species.

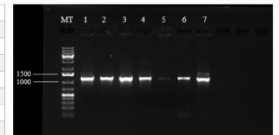


Figure 3: Visualization of 18S rRNA PCR amplicons of marine animal species on a 1.2% agarose gel. MT: DNA size marker (GeneRuler 1kb DNA Ladder). Lanes: 1 - CRX; 2 - C; 3 - EO; 4 - Gor A; 5 - Gor T; 6 - MD; 7 - AGR.

#### Lipid Content And Protein Content

Sample Type	1 (%)	2 (%)	3 (%)	Mean (%)
CM	19.35	20.56	21.44	20.45
GOR	28.33	28.81	35.40	30.84

Table 2: Protein Content (%) of CM and GOR Samples

Sample Type	1 (%)	Mean (%)
CM	0.34	0.34
GOR	0.39	0.39

Table 3: Lipid Content (%) of CM and GOR Samples

The analysis showed a significant difference in the macronutrient content between CM and GOR samples. The protein content was higher in GOR (mean: 30.84%) compared to CM (mean: 20.45%), indicating a richer protein profile in GOR. Similarly, the lipid content, although lower in both samples, was slightly higher in GOR (0.39%) than in CM (0.34%).

These results suggest that GOR may have greater nutritional value, particularly in terms of protein. This could be attributed to its origin, processing method, or composition.

#### Total Polysaccharide Content And Total Polyphenol Content

CM samples (aqueous extract) show the highest polysaccharide content, up to 0.218%, which is expected due to the hydrophilic nature of these compounds. However, their polyphenol content is low (below 0.012%), indicating poor extraction of phenolics in water.

GOR samples (methanolic extract) have low polysaccharide levels (max 0.041%) but significantly higher polyphenol content, reaching up to 0.043%, demonstrating that methanol is more effective for extracting phenolic compounds.

CRX samples (methanolic extract) also show a good amount of polyphenols (up to 0.029%), with slight variation across dilutions.

This study successfully integrates genetic and biochemical approaches for marine resource assessment. While resolving the sequencing bottleneck is critical for definitive species identification, the optimized extraction/PCR protocols are valuable achievements. The biochemical results strongly indicate that these Algerian marine invertebrates are rich sources of potentially novel bioactive compounds. Linking these biochemical findings to accurately identified species through robust genetic data is paramount. This ensures traceability, enables sustainable sourcing strategies, and maximizes the value derived from Algeria's marine biodiversity, aligning conservation goals with biotechnological development.

### Conclusion

This collaborative study successfully advanced the groundwork for marine biotechnology in Algeria by establishing optimized molecular protocols for challenging invertebrate species. The integration of genetic analysis, despite current sequencing limitations requiring further work, with preliminary biochemical screening provides a robust framework for future research. Our findings confirm the rich bioactive potential of Algerian marine fauna and highlight the critical need for accurate genetic identification to ensure sustainable resource management and traceability. This work contributes essential methodologies and data, paving the way for future discoveries and the responsible valorization of Algeria's valuable marine biodiversity.

### Key References

Scan the QR Code



## ANNEXE VII

### Laboratoire BioGenius

Laboratoire d'analyses génétiques et biochimiques

#### 1. Introduction

BioGenius est un laboratoire privé d'analyses génétiques et biochimiques appliquées à la biodiversité marine et terrestre. Il répond à une forte demande en traçabilité, conformité réglementaire (APA, non-OGM) et valorisation scientifique des ressources biologiques.

#### 2. Présentation du projet & valeur ajoutée

- **Nom** : BioGenius – SARL (Société à responsabilité limitée)
- **Domaine** : Biotechnologies environnementales
- **Valeur ajoutée** : analyses fiables, expertise en génétique marine, accompagnement R&D, conformité au Protocole de Nagoya
- **Lieu d'implantation** : Zone industrielle de Oued Smar (Alger)  
Avantages : proximité académique et industrielle, accès facile aux partenaires et au marché national.

#### 3. Objectifs du projet

- Devenir un référent national en analyses génétiques liées à la biodiversité
- Proposer des services spécialisés et accessibles
- Soutenir la recherche et l'innovation dans la bioéconomie algérienne

#### 4. Activités clés & services offerts

- Extraction ADN/ARN
- PCR classique
- Dosages biochimiques (pigments, protéines...)
- Pré-traitement et conservation des échantillons
- Séquençage
- Chromatographie et spectroscopie
- Rédaction de rapports techniques certifiés
- Formations

## 5. Analyse stratégique du marché

Élément	Détail
Segments visés	Universités, centres R&D, ONG, fermes aquacoles, agro-industries
Canaux	Réseautage pro, site web, réseaux sociaux, conférences
Relations clients	Contrats annuels, packs personnalisés, formations, conseil réglementaire

## 6. Plan d'organisation

### Réalisation des services

- Zones séparées (prétraitement, extraction, biochimie, stockage)
- Gestion par logiciel LIMS
- Traçabilité assurée dès la réception des échantillons

### Besoins humains

- 1 technicien supérieur en génie génétique
- 1 agent d'entretien
- 3 fondatrices ( Directrices administrative, commerciale, technique)

### Partenariats

- Universités, fournisseurs labos, sous-traitants (séquençage, chromatographie)

## 7. Plan de financement

Source	%
Apport personnel	5%
NESDA	25%
Banque	70%

## ANNEXES

<b>Total</b>	100%
--------------	------

### 8. Résultats financiers

<b>Indicateur</b>	<b>Valeur estimée</b>
<b>CA Année 1</b>	101 000 000 DA
<b>Charges totales</b>	4 219 000 DA
<b>Résultat net</b>	96 781 000 DA
<b>VAN (12%)</b>	+228 551 632 DA
<b>Délai de récupération (DR)</b>	0,04 an (≈15 jours)

### 9. Analyse du marché

#### **Clients (Segments de clientèle)**

- Instituts de recherche et universités : laboratoires universitaires, centres de recherche publics et privés (ENSSMAL, CNRDPA, LEM, ESSBO, CRSP, IPA), chercheurs indépendants.
- Entreprises des secteurs agroalimentaire et pharmaceutique.
- Entreprises agricoles et aquacoles.
- Organismes de conservation et de gestion de l'environnement.

#### **Proposition de valeur**

- Positionnement unique : Premier laboratoire privé en Algérie entièrement dédié à l'analyse génétique et biochimique de la biodiversité marine, en dehors du secteur médical.
- Spécialisation rare en dehors du domaine de la santé humaine.
- Services destinés non seulement à la recherche académique mais aussi à l'industrie et aux besoins appliqués.
- Réponse à des problématiques concrètes pour les entreprises, les chercheurs, les pêcheurs et les agriculteurs.

#### **Canaux de distribution**

## ANNEXES

---

- Service direct au laboratoire, plateforme de commande en ligne, téléphone et email dédiés, réseaux sociaux professionnels, campagnes publicitaires ciblées, participation à des salons professionnels et conférences scientifiques.

### **Relations avec les clients**






- Contrats de service personnalisés, cartes d'abonnement et forfaits d'analyses, support technique et scientifique réactif, ateliers et formations spécialisées, communication ciblée avec contenu informatif de valeur et présence active lors d'événements professionnels.

### **Partenaires clés**

- NESDA, banques.
- Fournisseurs (Labomaster, Numidia, Distrilabo Algérie, Thermo Fisher, Qiagen, Eppendorf, Illumina).
- Ministères (MSPRH, MPPH, MESRS), institutions de recherche (ENSSMAL, CNRDPA, CRSP), établissements d'enseignement et organismes de normalisation.

## **10. Conclusion**

Le projet BioGenius présente une rentabilité immédiate, un modèle clair et structuré, et une forte utilité scientifique et environnementale. Il s'inscrit parfaitement dans les axes stratégiques de soutien à la bioéconomie et à la valorisation de la biodiversité en Algérie.

<p> <b>Principaux partenaires</b></p> <p><b>Financiers :</b> *Partenaires financiers (Apport propre) * NESDA *Banques</p> <p><b>Fournisseurs :</b> *D'équipements de Laboratoire *De réactifs</p> <p>*Locaux : (Labomaster, Numidia, Distrilabo Algérie *Importés : (Thermo Fisher Scientific, Qiagen, Eppendorf, Illumina). *Fournisseurs de Services Essentiels (Transport des échantillons)</p> <p><b>Réglementaires :</b> MSPRH, MPPH, ENSSMAL, CNRDPA, CDE, LEM, MESRES, ESSBO, CRSP</p>	<p> <b>Activités principales</b></p> <p>* Réalisation d'analyses biochimiques avancées * Réalisation d'analyses génétiques spécialisées</p>	<p> <b>Valeur ajoutée</b></p> <p>*Expertise spécialisée en biodiversité : Premier laboratoire privé en Algérie entièrement dédié à l'analyse génétique et biochimique de la biodiversité marine, en dehors du secteur médical. *Services ciblés pour l'industrie et la recherche appliquée : Contrairement aux laboratoires étatiques qui effectuent ces analyses principalement à des fins de recherche académique.</p>	<p><b>Relations clients</b></p> <p>Contrats de Service Personnalisés Cartes d'Abonnement / Forfaits d'Analyses Participation Active aux Foires et Salons Professionnels Support Technique et Scientifique Proactif Ateliers et Formations Spécialisées Communication Ciblée et Contenu de Valeur</p>	<p> <b>Segments de clientèle</b></p> <p>Instituts de Recherche et Universités, centres de recherche publics et privés et chercheurs individuels. Entreprises des Secteurs Agroalimentaire et Pharmaceutique Entreprises Agricoles et Aquacoles Organismes de Conservation et de Gestion de l'Environnement</p>
<p><b>Ressources clés</b></p> <p><b>Physiques :</b> Matériel de laboratoire de base Équipements informatiques et de gestion</p> <p><b>Humaines :</b> Personnel qualifié : fondatrices, ingénieur(e)s de laboratoire, experts en analyses biochimiques et génétiques.</p> <p><b>Financières :</b> Capital d'investissement initial Fonds de roulement Financements externes</p> <p><b>Intellectuelles :</b> Compétences et savoir-faire spécialisés Certifications et normes qualité Réputation et réseau</p>	<p> <b>Les canaux</b></p> <p>Service Direct Plateforme de Commande en Ligne Téléphone et E-mail dédiés Réseaux Sociaux Professionnels Campagnes Publicitaires Ciblées Participation à des Salons Professionnels et Conférences Scientifiques</p>	<p><b>Revenus</b></p> <p>- Services offerts <b>101 000 000 DA</b> - Formations payantes <b>101 000 000 DA</b></p>	<p><b>Coûts</b></p> <p>- Coûts de matériel et produits - Salaires des employés - Autres charges de fonctionnement <b>8 119 000 DA</b></p>	

## Résumé

Face à la richesse encore méconnue de la faune marine algérienne, ce travail s'inscrit dans une approche intégrée visant à concilier exploration biotechnologique et conservation de la biodiversité. Il porte sur l'identification génétique et la caractérisation biochimique de neuf espèces d'invertébrés marins prélevées sur les côtes d'Aïn Beniane (Alger) et de Béni Saf (Aïn Témouchent). L'approche génétique, reposant sur le séquençage des gènes 18S rRNA et COI, a permis de confirmer l'identité moléculaire des espèces, révélant une diversité génétique significative. Parallèlement, une série d'analyses biochimiques a été menée pour quantifier plusieurs classes de biomolécules (lipides, polysaccharides, protéines, polyphénols, saponines, pigments), tout en évaluant leur activité antioxydante. Les résultats mettent en évidence le potentiel biotechnologique prometteur de certaines espèces, notamment *Holothuria tubulosa*, *Eunicella singularis* et *Chondrosia reniformis*, dont les extraits ont présenté des profils bioactifs intéressants. Ce mémoire constitue une contribution originale à la valorisation durable des ressources marines algériennes, soulignant l'importance d'une base de données génétique nationale pour la traçabilité, la préservation et l'exploitation responsable de la biodiversité marine.

---

## Abstract

In light of the underexplored richness of Algerian marine fauna, this study adopts an integrated approach combining biotechnological valorization and biodiversity conservation. It focuses on the genetic identification and biochemical characterization of nine marine invertebrate species collected from the coastal sites of Aïn Beniane (Algiers) and Béni Saf (Aïn Témouchent). Genetic analyses based on 18S rRNA and COI gene sequencing enabled precise molecular identification, revealing notable genetic diversity. Simultaneously, a comprehensive set of biochemical assays was conducted to quantify various classes of bioactive compounds (lipids, polysaccharides, proteins, polyphenols, saponins, pigments), along with evaluations of antioxidant activity. The findings highlight the high biotechnological potential of certain species, particularly *Holothuria tubulosa*, *Eunicella singularis*, and *Chondrosia reniformis*, whose extracts demonstrated significant bioactive profiles. This research provides a novel contribution to the sustainable valorization of Algerian marine resources, emphasizing the urgent need for a national genetic database to ensure traceability, conservation, and responsible bioprospecting.

---

## المخلص

في ظل التنوع البيولوجي البحري الغني وغير المستغل في الجزائر، يتبنى هذا البحث مقاربة تكاملية تهدف إلى الموازنة بين الاستكشاف البيوتكنولوجي والحفاظ على التنوع الأحيائي. يتمحور العمل حول التعريف الجيني والتوصيف البيوكيميائي لتسعة أنواع من اللاقاريات البحرية التي تم جمعها من موقعي عين بنيان (الجزائر العاصمة) وبني صاف (عين تموشنت). أتاح تحليل تحديدًا دقيقًا للأنواع المدروسة، كاشفًا عن تنوع وراثي معتبر. تزامن ذلك مع تنفيذ COI و 18S rRNA التسلسل الجيني لـ 18 تحاليل بيوكيميائية شاملة لقياس محتوى عدة فئات من الجزيئات الحيوية (الدهون، عديدات السكاريد، البروتينات، السابونينات، البوليفينولات، الأصباغ) بالإضافة إلى تقييم النشاط المضاد للأوكسدة. أظهرت النتائج إمكانات واعدة لبعض الأنواع، التي أظهرت مستخلصاتها *Holothuria tubulosa*، *Eunicella singularis* و *Chondrosia reniformis* خاصة خصائص بيولوجية فعالة. يشكل هذا العمل مساهمة علمية جديدة في تعزيز استغلال الثروات البحرية الجزائرية بشكل مستدام، مع التأكيد على ضرورة إنشاء قاعدة بيانات جينية وطنية لضمان التتبع والحماية والاستخدام المسؤول لهذا التنوع الفريد.