

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

المدرسة الوطنية العليا لعلوم البحر وتهيئة الساحل

École Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral



MEMOIRE DE FIN D'ETUDES EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR EN SCIENCES DE LA MER

OPTION : Aquaculture

Thème :

**Extraction des métabolites secondaires de l'éponge
cultive *Crambe crambe* (port el djamila, 2017)**

Réalisé par : BOUNAIL Souhila

Soutenu le 31/10/2017 devant le jury composé de :

M. MAZOUAR .	Maître-assistant B	ENSSMAL	Président
Mme AMROUCHE .	Attachée de recherche	CNRDPA	Examinatrice
M. LOURGUIOUI .	Maître-assistant B	ENSSMAL	Examineur
Mme IZITI .			Invité
Mme AISSOU .	Maître-assistante B	ENSSMAL	Promotrice
Mme HENDA .	Maître-assistant B	ENSSMAL	Co- promotrice

Année universitaire : 2016 / 2017

Remerciements

« Quelques plongées profondes ont révélé la vie là où on la pensait impossible, mais ce n'est qu'un début ; quelque chose de beaucoup plus grand réside dans ces ténèbres, qui nous attend silencieusement. »

Hugo Verlomme, Coups de folie en mer.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience d'achever mon mémoire.

J'adresse mes remerciements et mon respect le plus profond à ma promotrice, Mme AISSOU qui ma encadré. Je lui suis très reconnaissante pour sa gentillesse, son sens de l'écoute et sa volonté d'offrir à ses étudiants les meilleures conditions de travail possibles.

Comme je remercie ma co-promotrice Mme HINDA Assia de m'avoir aider et accompagné tout au long de ce travail.

Je remercie l'ensemble du memebre de jury d'avoir accepter d'examiner mon travail et l'enrechir avec vos recommandations.

Un grand merci à l'ensemble de ma famille, mes parents, mes frères et ma sœur, vous êtes toujours là à la seconde, disponible, à l'écoute. Dieu sait qu'il en faut avec moi.

Je remercie aussi Mr BOUMERAH Yacine et Mr KSIR Mohamed du Institut Criminologie de la Gendarmerie National Bouchaoui pour m'avoir permis de réaliser l'Analyse HPLC-UV- dad au sein de ce prestigieux établissement.

Comme je remercie la police centrale, la police scientifique Mme ISITI Amel et Mmd KASDI Amel du CRAPC pour leur aide.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe de plongé pour leur aide et leur patience Mrs Zahr Yacine, BOUBHADJAR Imad, LEZERD Djamel, LAOUACHERIE Nabil, KIAL Farid, BOUSSOURA Riad, HAMADACHE Boualam.

Je remercie également les ingénieurs de laboratoire d'Aquaculture Mme GUEROUMI Houda , Mme TOUATI Amina, Mr MATOUK Youcef, Mme REFES , Mme CHIOUKH Soraya, Mme ZAIDI Yasmine, Mr BENCHABANE Ahmed et enfin Mr MEKKI Azouz d'avoir participer à la réussite de ce travail

À ne pas oublier mes chers ami(e)s : Amina, Katia, Moufida, Ryma, Marwa, Meriem, Younes de m'avoir soutenu durant toute cette période de travail sans vous je ne pouvais rien faire Merci.

Liste des figures

Liste des figures

Figure 01 : Schéma simplifié d'une éponge.....	08
Figure 02 : Schéma des formes d'une éponge.....	09
Figure 03 : Schéma de la forme la plus simple d'une éponge (type ascon).....	09
Figure 04 : Distribution des substances naturelles marines par Phylum.....	11
Figure 5 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différents types de sources marines, 2001-2010	11
Figure 06 : schéma des quatre axes de recherche développés par le groupe « substances naturelles marines ».....	1
Figure 07 : Bioactivités des nouveaux produits naturels marins (* PHVD : prévention des maladies cardiaques et vasculaires, ** PN / NT : protection des neurones / neurotoxicité).....	13
Figure 08 : Statistiques des nouveaux produits naturels marins bioactivité par année (* PHVD : prévention des maladies cardiaques et vasculaires, ** PN / NT : protection des neurones / neurotoxicité.....	1
Figure 09 : Variation du nombre de nouveaux produits naturels marins entre 1985-2012.....	1
Figure10 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différentes éponges marines et leurs sites de 2001 à 2010	16
Figure 11 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différents ordres des éponges marines entre 2001 et 2010.....	17
Figure 12 : Distribution de nouveaux composés isolés de différents ordres des éponges marines en pourcentage de l'année 2001-2010.....	18
Figure 13 : La distribution de différentes classes chimiques de nouveaux composés isolés des éponges marines de 2001 à 2010.....	18
Figure 14 : Vue schématique du champ chimique entourant l'éponge encroûtante <i>C. crambe</i>	20
Figure 15 : Structures chimiques des crambescins et des crambescidins.....	20
Figure 16 : Image satellitaire de la zone d'échantillonnage (Aïn Benian au niveau de la plage du port el Djamila (Alger) 36° 48' 01" Nord).....	28

LISTE DES FIGURES

Figure 17 : Éponges marines récoltés durant différentes plongées pour effectuer la présente étude (période de juin, juillet et septembre 2017).....	29
Figure 18 : Schéma représentatif de la méthode d'extraction (1).....	31
Figure 19 : :Extraction des métabolites secondaires de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	32
Figure 20 : Schéma représentatif de la méthode d'extraction.....	33
Figure 21 : Préparation des extraits pour être transporté au laboratoire de la police scientifique (département toxicologie) pour l'identification.....	34
Figure 22 : Extraction métabolique de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	35
Figure 23 : Caractéristiques de la surface de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	42
Figure 24 : Profil d'analyse de l'extrait de <i>Crambe crambe</i> par la méthode GC/MS.....	43
Figure 25 : Spectre d'absorption de l'extrait de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	44
Figure 26 : Chromatogramme HPLC-UV- DAD de l'éponges <i>C. crambe</i> étudiée obtenue en suivant le protocole standardisé ECIMAR.....	45
Figure 27 : les spectres d'absorbance UV des différentes molécules de l'extrait d'éponges <i>C. crambe</i> étudiée obtenue par la méthode HPLC-UV- DAD en suivant le protocole standardisé.....	46
Figure 28 : Identification des deux familles des alcaloïdes guanidiniques dans le chromatogramme obtenue de l'extrait étudié de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	47
Figure29 : Identification des molécules correspondants à chaque spectre d'absorption d'éponge étudiée obtenue par la méthode HPLC-UV-DAD.....	48
Figure 30 : Identification des molécules de l' éponges <i>C. crambe</i> étudiée obtenue en comparant avec L'empreinte chimique ECIMAR.....	53
Figure 31 : Comparaison entre les spécimens sauvages et les spécimens cultivés du point de vue qualitatif chez <i>C. Crambe</i>	55

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Tableau 01 : Concentrations des vingt éléments les plus abondants dans l'eau de mer (PATEL, 2010).....	05
Tableau 02 : Masse / charge (M / z) théorique et formule moléculaire associée pour les alcaloïdes guanidiniques polycycliques (PGA) quantifié de C. crambe.....	21
Tableau 03 : alcaloïdes guanidiniques (GA) assimilés à la crambescidin de 1989 à 2015.....	22
Tableau 04 : Résultats de l'identification de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	39
Tableau 05 : Masse / charge de quelques molécules identifiées.....	52
Tableau 06 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la première plongée (Juin).....	53
Tableau 07 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la deuxième plongée (Juillet).....	53
Tableau 08 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la troisième plongée (Août).....	53
Tableau 09 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la quatrième plongée (Septembre)....	

Table des matières

v	Liste des figures	
vii	Liste des tableaux	
viii	Liste des abréviations	
	Introduction.....	0
1		
	Chapitre I : Généralités	
	1. La biodiversité du milieu marin.....	04
	1.1. Le phylum des spongiaires.....	05
	1.2. Biologie des éponges.....	06
	1.2.1. Reproduction.....	07
	1.2.2. Répartition	
	Géographique.....	07
	1.2.3. Habitat.....	07
	1.2.4. Alimentation.....	07
	1.2.5. Prédateur.....	08
	2. Les substances naturelles.....	09
	2.1. Les molécules d'origine marines : source de	
	métabolites.....	10
	2.2. Les spongiaires une riche source en molécules d'origine marine.....	12
	2.3. Les critères du choix de l'espèce.....	20
	3. Généralités sur les méthodes Chromatographie utilisées.....	23
	3.1. Spectrométrie de masse (MS).....	23
	3.1.1. Chromatographie en phase gazeuse.....	23
	3.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (« Gas chromatography-mass spectrometry » ou GC-MS).....	24
	3.2 La spectroscopie infrarouge.....	24
	3.3 La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC).....	25
	Chapitre II : Matériels et Méthodes	
	1. Échantillonnage.....	28
	2. Conditionnement.....	29
	TABLE DES MATIERES	

3. Partie expérimentale.....	30
3.1. Préparations de spicules.....	30
3.2. Extraction.....	31
Chapitre III : Résultats et Discussion	
1. Résultats de l'identification de l'espèce.....	39
2. Résultats de l'identification des métabolites secondaire de l'éponge <i>Crambe crambe</i>	43
2.1. Analyse de l'extrait de l'éponge <i>Crambe crambe</i> par la spectrométrie de masse couplé à la chromatographie gazeuse (GC/MS).....	43
2.2. Analyse par la spectrométrie infrarouge (IR).....	44
2.3. Résultat d'analyse HPLC –UV- DAD.....	45
3. Paramètres physico-chimiques mesurés in situ.....	52
3.1. Influence saisonniers , géographiques et de la profondeur sur les métabolites secondaires spécialisé de <i>C.crambe</i>	54
3.2. Comparaison du contenu métabolique entre les spécimens sauvages étudié et ceux d'élevage en automne (Septembre).....	54
3.3. Influence des facteurs abiotiques sur la production de crambescidin et de crambescin.....	55
Conclusion	5
7	
Références bibliographiques	60
Annexes	66

Introduction

Introduction

L'océan couvre près de 70% de la surface de la planète et offre une énorme biodiversité avec une source inestimable de produits naturels. Les premières extractions systématiques de Paul Scheuer 1990 ont marqués le début de l'étude approfondie de la biodiversité marine. Beaucoup de nouveaux composés d'origine marine ont été isolés grâce aux progrès technologiques de la plongée sous-marine, alors comment expliquer, ce retard de la chimie et de la pharmacologie marine par rapport à la phytochimie et à la phytopharmacie ?

La principale raison réside très certainement dans la difficulté de pénétration du milieu marin par l'homme. Par conséquent, il a fallu attendre les progrès de la plongée sous-marine, au cours de la première moitié du XX^{ème} siècle, pour pouvoir explorer convenablement les fonds marins. La seconde raison, corollaire à la première est que l'ethnobotanique n'a pas d'équivalent dans le milieu marin (GROS, 2013).

En 2012, plus de 17000 des métabolites secondaires marins ont été décrit, dont les éponges qui sont responsables de plus de 5300 des produits différents. Les éponges marines (Porifera) sont la vie métazoaire la plus ancienne forme sur Terre avec une histoire évolutive estimée de 700/800 millions d'années. Ils peuvent contenir des molécules qui peuvent être utilisés comme médicaments thérapeutiques, par exemple les composés anticancéreux, les agents antiviraux et les immunodulseurs, de ce fait sont parmi les sources les plus riches en pharmacologie des composés actifs. Ces éponges ont une grande diversité chimique de leurs métabolites tels que les nucléosides, les terpènes, les stérols, les peptides, les alcaloïdes, les acides gras etc (CACHET, 2009) (SFECCI et al., 2016a) (CROUE, 2014) (Munoz et al., 2011) (Hu et al., 2015a).

Bien que les métabolites d'éponge puisse éventuellement être fabriqué par synthèse chimique et techniques transgéniques, mais l'extraction directe de la biomasse d'éponge semble être l'option la plus simple. Par conséquent, il existe un intérêt croissant dans les méthodes biotechnologiques pour la production de la biomasse d'éponge à grande échelle. Parce que la plupart des éponges poussent lentement ou se trouvent dispersé dans la nature, obtenant les molécules d'intérêt à travers la récolte sauvage de l'éponge de l'habitat naturel généralement n'est pas une pratique viable dans la plupart des cas.

L'aquaculture est actuellement la seule technique capable de fournir la biomasse requise ; pour cela plusieurs recherches sont faites afin d'adapter ces invertébrés marins dans différents systèmes de culture alors ils ont essayé la culture dans les systèmes ouverts qu'est une méthode

qui ne permet pas un contrôle étendu de l'environnement variable et qui influence la croissance en plus elle dépend des variations des conditions climatiques et d'épidémies susceptibles . De ce fait , des systèmes de production mieux définis sont souhaitables comme la culture in vitro (système fermé) et le résultat montre qu' ils ont tendance à croître plus rapidement que l'éponge dans son milieu sauvage (MENDOLA, 2003) (TERNON et al., 2016) (BELARBI et al., 2003) (GARCIA CAMACHO et al., 2006).

Dans ce contexte, le but d'étude consiste à faire une étude chimio taxonomique d' une éponge des côtes algériennes et selon les recherches , l'ordre Poecilosclerida est connue par leur production d'un large éventail de polycycliques bioactifs structurellement diversifiés tels que les alcaloïdes guanidiniques .

Donc , nous avons choisi l'espèce *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) qu'est une éponge rouge, largement diffusée dans la Méditerranée mais et qui marque sa présence dans les côtes algériennes (Sfecci et al., 2016).

Les premières études chimiques sur cette éponge remontent au début des années 90, où les Crambines A, B, C1 et C2 ont d'abord été isolées par les groupes de Braekman , puis le groupe de Rinehart a changé le nom la molécule crambine en crambescine. En même temps, le polycyclique crambescidines 800, 816, 830, 844, isocrambescidine 800 et la crambidine, qui ont été signalés par les groupes de Braekman et Rinehart et brevetés en raison de leur cytotoxicité et leur fonctions antivirales très intéressantes. Ces composés sont donc considérés comme des médicaments anticancéreux potentiels (Pérez-López et al., 2014) (Croué, 2014) (Sfecci et al., 2016a) (Ottinger et al., 2012a) (Bondu *et al.*, 2012) (Martín *et al.*, 2013).

Notre intérêt pour ces composés est également apparu dans le vaste éventail des activités biologiques principalement associées à ces alcaloïdes guanidiniques.

On recommande la culture de cette espèce pour assurer une production durable de ces produits naturels de bioactifs afin de les valoriser dans le domaine médicale.

Chapitre I
Généralités

Chapitre I : Généralités

1. La biodiversité du milieu marin

Les océans lieu de la genèse de la vie, couvrent plus de 70 % de notre planète et abrite quasiment la moitié de sa biodiversité totale. Les experts estiment que cette dernière est supérieure à celle des forêts tropicales. De ce fait, son étude n'a réellement pu commencer qu'avec le développement de la plongée sous-marine il y a quelques décennies (PATEL et al., 2010) (CACHET, 2009).

Encore aujourd'hui, des centaines de nouvelles espèces sont décrites chaque année et les océans sont loin d'avoir livré tous leurs secrets. A une époque où les activités humaines induisent des dérèglements importants sur l'équilibre et la richesse de cette biodiversité. Il est urgent de la décrire sous toutes ses facettes et de la valoriser afin de l'utiliser durablement (PATEL et al., 2010) (CACHET, 2009).

La biodiversité des océans est la conséquence d'une très longue histoire évolutive qui a permis aux êtres vivants d'expérimenter de nombreux modèles moléculaires pour ne garder que les plus adaptés à divers environnements et menaces (CACHET, 2009).

D'après MUNOZ et al., 2011 et PATEL et al., 2010, l'environnement marin, malgré sa spécificité chimique a reçu beaucoup moins d'attention que le terrestre. Le tableau 1 présente les ordres de grandeur des concentrations des 20 éléments les plus abondants dans l'eau de mer après l'hydrogène et l'oxygène. Il montre que tous les halogènes présents sous forme d'ions halogénures dans l'eau de mer sont à différentes concentrations. Par ordre d'abondance, on trouve successivement : Cl>Br>F>I. Cependant les composés halogénés naturels isolés d'organismes sont trouvés, par ordre d'abondance, dans un ordre différent : Br>Cl>I>>F.

Tableau 1 : Concentrations des vingt éléments les plus abondants dans l'eau de mer (PATEL, 2010).

Ordres de grandeur (mg/kg d'eau de mer)	Éléments	ppm	Ordres de grandeur (mg/kg d'eau de mer)	Éléments	ppm

> 10 ³	Cl Na Mg	18980 10560 1275	de 10 à 1	B Si F	5,00 4,00 1,50
de 10 ³ à 10 ²	S Ca K	885 400 380	de 10 à 10 ⁻¹	N Al Rb	0,70 0,50 0,20
de 10 ² à 10	Br C Sr	65 30 15	de 10 ⁻¹ à 10 ⁻²	P Ba, I As	0,10 0,05 0,02

1.1. Le PHYLUM DES SPONGIARES :

Les éponges marines sont des invertébrés multicellulaires qui font partie de la biomasse marine depuis la période du Cambrien inférieur entre -550 et -500 millions d'années. Pendant longtemps la place des éponges et donc du phylum Porifera dans l'arbre généalogique du vivant est restée obscure. Elles sont présentes sur toute la planète et vivent dans de nombreux écosystèmes aquatiques. La plupart des espèces sont marines, mais il existe une cinquantaine d'espèces d'eaux douces.

Les éponges vivent souvent en symbiose avec des microorganismes.

Les relations entre les éponges et les symbiotes sont complexes et on leur attribue plusieurs rôles possibles :

- _ dans la mesure où les éponges se nourrissent de microorganismes
- _ il est possible qu'elles tolèrent une colonie qui leur servirait de garde-manger
- _ il est également possible que ces symbiotes empêchent l'épibiose (colonisation de l'éponge par d'autres espèces comme les pathogènes).

Étant donné les moyens de défense mécaniques et physiques sont rares et rudimentaires chez les éponges au vu du nombre incroyable de métabolites secondaires isolés d'eux, on peut

comprendre que la stratégie de défense chimique est de loin la plus courante (Patel et al., 2010) (MUNOZ et al, 2011) .

1.2. Biologie des éponges

L'embranchement des **spongiaires** ou plus communément appelé les éponges regroupe 3 classes et avoisine les 10 000 espèces.

Ces différentes classes se caractérisent principalement par la nature de leur squelette : calcaire, siliceux ou à base de spongine seule :

- les démosponges
- les éponges de verre ou *hexactinellides*
- les éponges calcaires ou *calcareas*

Les éponges sont considérées comme les animaux les plus simples : ils sont dépourvus de système nerveux, de tube digestif et de système circulatoire. Ils sont constituées de deux couches de cellules, appelées endoderme et ectoderme (PATEL, 2010) , percées d'une multitude de petits pores (les ostioles) (MUNOZ, 2011). Entre ces deux couches se trouve la mésogée dans laquelle évoluent librement les améocytes (Patel, 2010) . Également , la mésogée est constituée d'une matrice de fibres de collagène ainsi que de différents types de cellules qui peuvent se différencier pour produire les éléments minéraux du squelette de l'éponge appelés spicules (MUNOZ, 2011) (figure 1) . La très grande majorité des éponges se nourrissent en filtrant l'eau (PATEL, 2010).

Reproduction

Est généralement sexuée grâce à des larves ciliées qui nagent librement puis se fixent sur le substrat et se métamorphosent. Ces larves sont le résultat de la fécondation d'ovocytes par des spermatozoïdes produits par des individus différents, bien que la plupart des éponges soient hermaphrodites. La fécondation peut avoir lieu dans l'eau : éponges ovipares, ou à l'intérieur (dans la mésogée) de l'éponge femelle. La reproduction asexuée se fait soit par bourgeonnement externe, soit par bourgeonnement interne (ou gemmulation). La gemmulation est caractéristique des éponges d'eau douce (Croué, 2014) (Cachet, 2009) .

Répartition Géographique

Les éponges se rencontrent dans l'ensemble des mers et océans de la planète. Ils colonisent de nombreux milieux aquatiques, du littoral aux abysses et même en eaux douces. Dans tous les océans du globe et mers attenantes, sous tous les climats (Cachet, 2009) .

Habitat

Les éponges sont des animaux benthiques, sédentaires qui vivent fixées sur un substrat (colonisation de la majeure partie du substrat disponible à l'abri d'un trop fort ensoleillement: sous les surplombs, dans les grottes sous-marines, sur les tombants profonds (WEINBERG, 2007) , parfois mobile comme la coquille du bernard l'ermite. Ils se rencontrent à toutes les profondeurs.

De ce fait grâce à cette fixation et le squelette les éponges ont la faculté d'adapter leur forme aux conditions de courants et à la nature du support(Tribalat, 2016) .

Alimentation

Incapables de se déplacer pour aller capturer leur nourriture, les éponges doivent la faire venir jusqu'à elles grâce à un système de circulation et de filtration d'eau. Le mouvement continu des cellules à collerettes flagellées, qui tapissent la paroi intérieure de l'éponge appelées choanocytes, permet de diriger l'eau, les nutriments et l'oxygène à l'intérieur du réseau inhalant de l'organisme. Ce réseau constitué de canaux de plus en plus fins, emporte l'eau de mer jusqu'aux chambres choanocytaires où elle est filtrée. À la sortie de ces chambres, l'eau est ensuite collectée par un réseau de canaux exhalant qui se rejoignent en une ouverture plus large, l'oscule, par où elle est rejetée. Ainsi, une éponge est capable de filtrer son propre volume d'eau en quelques secondes. Cette filtration dépend du rythme biologique de l'éponge, de la température et de la profondeur à laquelle elle vit (MUNOZ, 2011) (Croué, 2014) .

Prédateur

Les principaux prédateurs sont les nudibranches, les étoiles de mer, certains poissons et les tortues de mer.

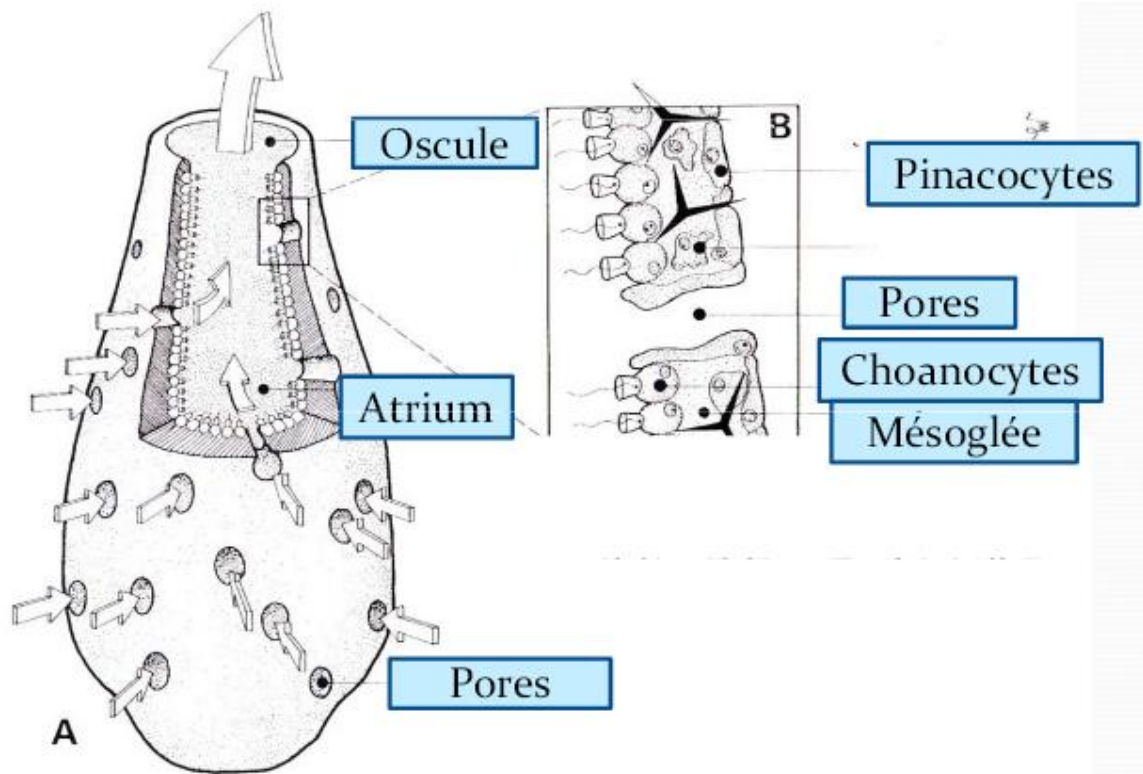


Figure 1_: Schéma simplifié d'une éponge (WEINBERG, 2007)

De la complexité de la circulation de l'eau au travers de la paroi est née une classification en 3 types d'éponges (figure 2, 3) :

- paroi simple : type **Ascon**
- paroi avec réseau simple de canaux de circulation d'eau périphérique : type **Sycon**
- paroi avec réseau complexe de canaux de circulation d'eau périphérique : type **Leucon**

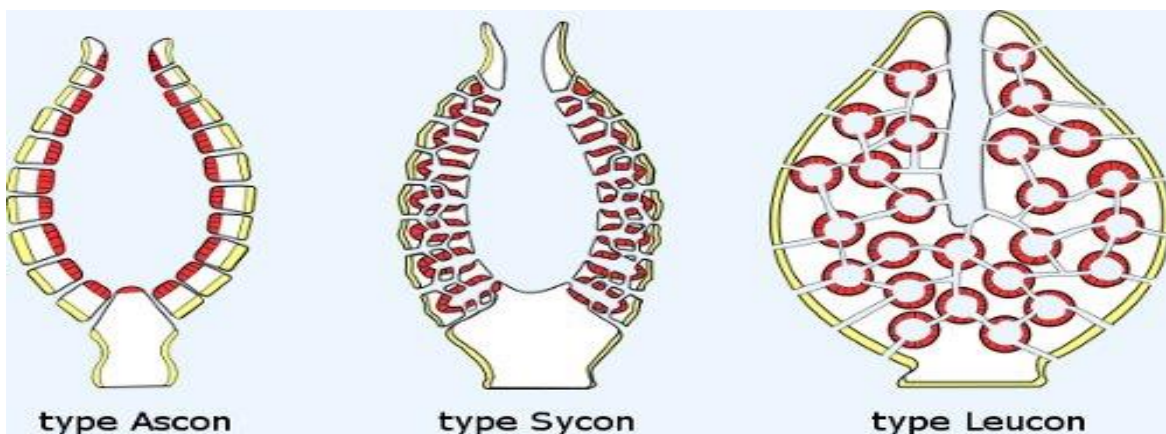


Figure 2: Schéma des formes d'une éponge

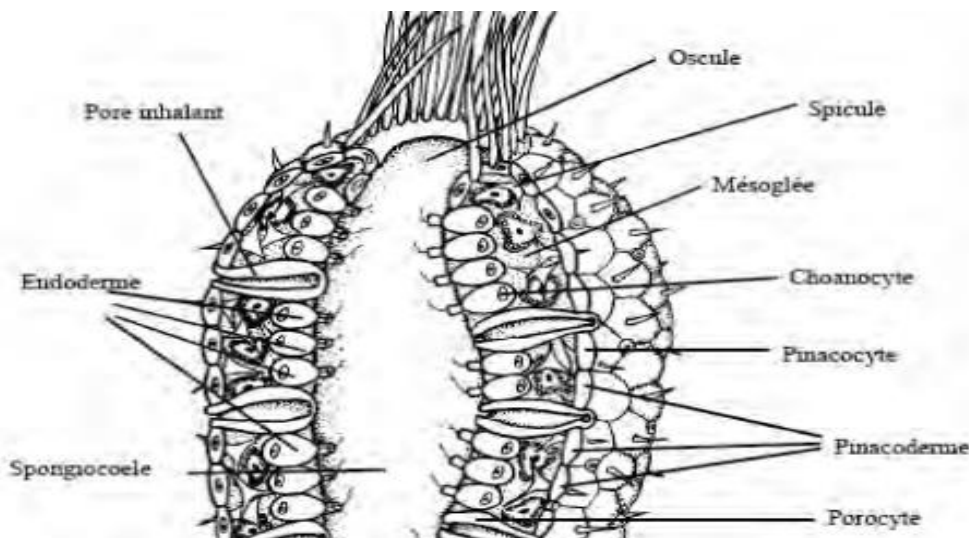


Figure 3 : Schéma de la forme la plus simple d'une éponge (type ascon) (Patel, 2010) .

2. Les substances naturelles

Les substances naturelles représentent depuis des millénaires une source immense et inépuisable de principes actifs importants en écologie chimique et ayant des vertus thérapeutiques (GROS, 2013) (CACHET, 2009) .

Les produits naturels appelés les métabolites secondaires selon (MUNOZ *et al.*, 2011) sont de petites molécules organiques liées aux métabolites primaires. Bien que non essentielles à la vie, le rôle de ces molécules peut être important dans la régulation des fonctions vitales, la communication entre espèces ou la défense contre les prédateurs

Historiquement, les produits naturels et leurs dérivés synthétiques ont souvent été étudiés pour leurs activités biologiques ; ils ont évolué pendant des millions d'années pour acquérir des effets biologiques très ciblés.

Entre 1981 et 2006, 70% des nouvelles molécules introduites comme médicaments étaient soit des produits naturels, soit des mimes de produits naturels. Et beaucoup de ces produits et d'analogues synthétiques ont été développés avec succès pour traiter des maladies humaines dans presque tous les domaines de la santé.

Ainsi, l'étude chimique à partir de sources naturelles permet non seulement de découvrir de nouveaux médicaments, mais aussi, et surtout, de rechercher des outils moléculaires en chimie, biochimie et biologie moléculaire indispensables à la compréhension de nouvelles voies biosynthétiques et de modèles pharmacologiques, pour l'exploration des fonctions biologiques régissant le monde du vivant (la découverte de récepteurs, la compréhension du cycle

Cellulaire, la mise en évidence de cibles comme la tubuline, etc).

En 2013 plus de 60% des médicaments sont issus soit de :

- substances naturelles
- dérivés ou d'analogues
- molécules synthétisées sur le modèle des substances naturelles.

Parmi les anticancéreux approuvés par la Food and Drug Administration (FDA) de 1940 à 2010, 74,9% sont directement issus ou inspirés de la nature (Gros, 2013) (Munoz et al., 2011) (Cachet, 2009) .

2.1 Les molécules d'origine marines : source de métabolites

L'exploration du milieu marin comme source potentielle de substances naturelles bioactives aux structures originales est en plein essor. D'après la base de données MarinLit (version 2009), plus de 16 000 molécules naturelles marines ont été décrites dont 33 % proviennent de spongiaires, 25 % d'algues, 18 % de cnidaires et les 24 % restant ont été isolés d'autres organismes marins (bryozoaires, échinodermes, mollusques, tuniciers, etc.) (**Figure 4**) (Cachet, 2009) .

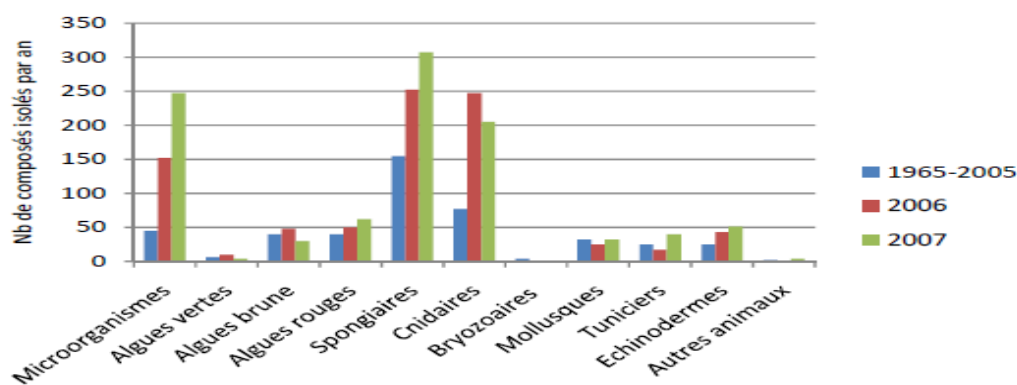


Figure 4 : Distribution des substances naturelles marines par Phylum (Cachet, 2009)

Les produits marins sont utilisés en médecine depuis l'Antiquité, mais leur étude est restée très limitée jusqu'à la seconde moitié du XXème siècle. Dans ce contexte plusieurs projet de recherche sont lancés ; par exemple le projet ECIMAR qui a été lancé pour les raisons suivantes :

- la conservation de nombreux écosystèmes et espèces marines de la mer méditerranée, qui abrite 4 à 18 % de la biodiversité marine afin d'éviter les conséquences dramatiques (dégradation de la biodiversité marine) causés par les perturbations climatiques et anthropiques.
- Comprendre les mécanismes de réponse et d'adaptation à différents stress chez les organismes marins producteurs de molécules bioactives.
- Ce projet s'intéresse essentiellement aux organismes benthiques de la méditerranée dont les taxons sont les plus promoteurs d'un point de vue pharmacologique.

La figure 5 montre le résumé des quatre axes de recherche auteurs de l'isolement des produits naturels marins (collaboration entre ECIMAR, PharmaMar et le groupe « substances naturels marins » du laboratoire LCMBA) (Cachet, 2009).

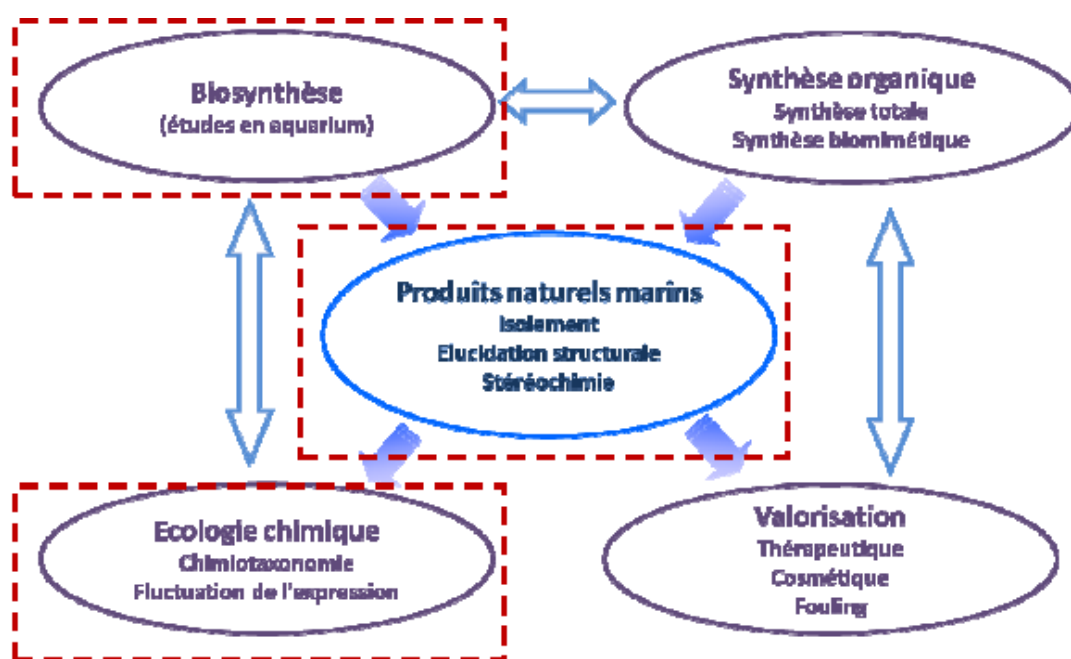


Figure 5 : schéma des quatre axes de recherche développés par le groupe « substances naturels marins »

L'étude des produits marins par les chimistes et les pharmacologues a permis de mettre en évidence leurs activités biologiques variées (antibiotiques, antitumorales, anti-inflammatoires, Analgésiques, anti-allergiques, anti-virales...).

Les recherches en chimie marine se sont effectivement révélées fructueuses puisqu'un certain nombre de molécules sont déjà commercialisées ou sont en dernière phase des essais cliniques.

Dans le domaine des antibiotiques, la Céphalosporine, issue d'un champignon semi-marin, *Cephalosporium acremonium*, aux propriétés antistaphylococques peut être citée.

Dans le domaine des anticancéreux, la squalamine molécule provenant de l'estomac du requin *Squalus acanthias*, inhibe l'angiogenèse et la prolifération de cellules endothéliales. Les didemnines isolées du tunicier *Didemnum solidum* qui, outre leur activité antivirale, inhibent le cycle cellulaire en phase G1 (elles freinent la synthèse de l'ADN et de l'ARN).

Récemment de nouvelles molécules d'origine marine ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) :

- Le ziconitide (Prialt) en 2005, isolé du venin du mollusque *Conus magus*, est utilisé pour le traitement des douleurs chroniques liées au SIDA et aux cancers.
- L'ecteinascidine 743, ET 743 ou Trabectedine (Yondelis) en 2007, isolé de l'ascidie *Ecteinascidia turbinata*, est utilisé dans le traitement de plusieurs types de cancers.
- L'éribuline (E7389) , dérivé simplifié de l'halichondrine B (isolé de l'éponge marine *Halichondra okadai*) a été commercialisé en novembre 2010 et est utilisé dans le traitement du cancer du sein métastasé .

Selon (GROS, 2013) la majorité des molécules marines susceptibles d'être utilisées dans le domaine de la santé sont destinées au traitement des cancers.

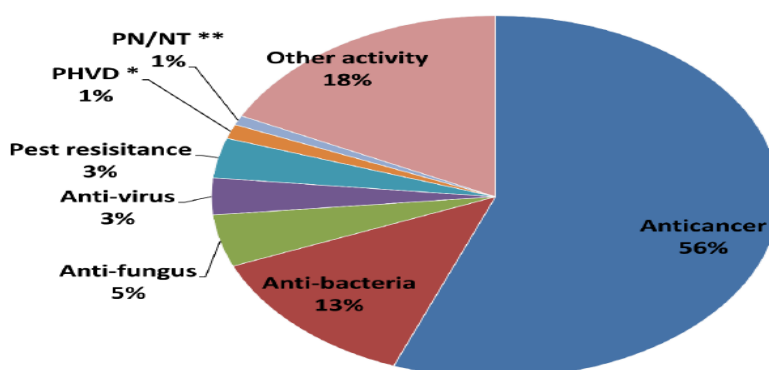


Figure 6 : Bioactivités des nouveaux produits naturels marins (* PHVD: prévention des maladies cardiaques et vasculaires, ** PN / NT: protection des neurones / neurotoxicité) (Hu et al., 2015)

2.2. Les spongiaires une riche source en molécules d'origine marine

Parmi les organismes marins producteurs de métabolites intéressants figurent les spongiaires. Ils fournissent à eux seuls plus du tiers des molécules isolées du milieu marin. Ils sont considérés comme une mine d'or au vu de leur nombre et de la diversité structurale des métabolites secondaires qu'elles produisent.

Ces animaux sessiles (qui vivent accrochés à un substrat dur) ont développé des stratégies de défense et de communication chimique riches et complexes, produisant un grand nombre de composés actifs appelés métabolites secondaires. Ces métabolites ont des activités biologiques qui peuvent être utiles pour la recherche de médicaments originaux pour le traitement de maladies humaines (Patel et al., 2010). En raison de leur biodiversité élevée et de leur ubiquité, ils sont considérés comme une cible de recherche incroyablement attrayante.

Les éponges sont connues pour être des hôtes de micro-organismes symbiontes. Il est prouvé que certains composés présentés à l'origine dans des cellules éponge sont synthétisés par des microorganismes associés aux éponges, car le mésohyl des éponges est habituellement habité par des microbes et de nombreux produits naturels du phylum porifera, ressemblent à des métabolites produits par des microbes marins. Les nombres bactériens dans le tissu éponge dépassent souvent ceux de l'eau de mer environnante de deux à trois ordres de grandeur, car l'éponge mesohyl fournit une niche écologique unique pour des espèces bactériennes particulières. Dans de nombreux cas, l'éponge mesohyl héberge les symbiotes bactériens (30% - 60%) (Croué, 2014).

Les bactéries fournissent à leurs hôtes des produits de leur métabolisme, ce qui confère à l'éponge l'accès à des caractéristiques spécifiques aux bactéries telles que l'autotrophie, la fixation de l'azote et la nitrification. D'autres exemples montrent que les bactéries associées à l'éponge peuvent traiter des composés de déchets métaboliques, stabiliser le squelette éponge et fournir une protection contre les rayonnements UV (Croué, 2014) (Munoz et al., 2011).

Mais malheureusement, l'extraction de ces produits naturels ne permet pas une production utilisable commercialement. De plus, la structure souvent complexe de ces métabolites rend leur synthèse difficile et par conséquent les études pharmacologiques sont retardées voir arrêtées. Malgré ces difficultés, le développement de nouvelles techniques comme l'hémi-synthèse et la culture d'éponge ou de microorganismes symbiotiques permettent d'espérer que les éponges marines deviennent une source de médicaments (PATEL et al., 2010).

Deux articles d'étude rédigés par Hu et al. 2011 et Leal et al. 2012, ont décrit les tendances générales des produits naturels marins, y compris ceux de Porifera, au cours des deux dernières décennies.

La figure 7 montre la croissance presque linéaire de nouveaux composés au cours des trois dernières décennies. On prévoit que si ce taux peut être soutenu, la découverte de produits

naturels marins à partir d'éponges, en particulier, ainsi que d'autres grands organismes marins, apportera des thérapies nouvelles et efficaces contre les maladies humaines (Figure 7,8).

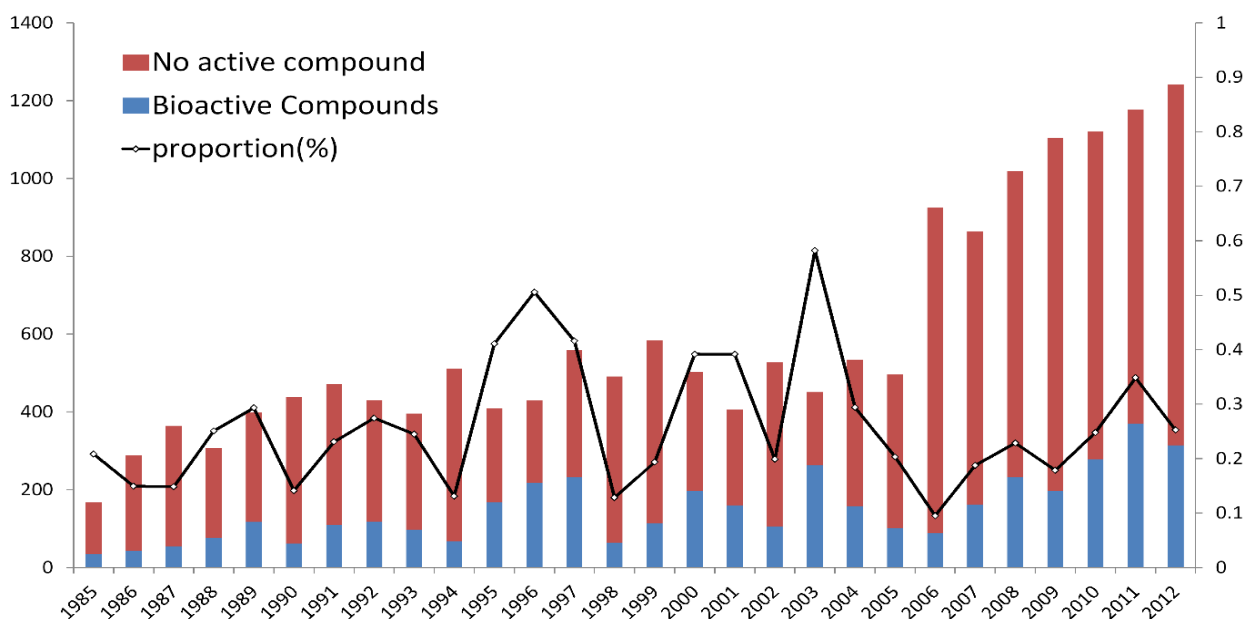


Figure 7 : Variation du nombre de nouveaux produits naturels marins entre 1985-2012 (Hu et al., 2015).

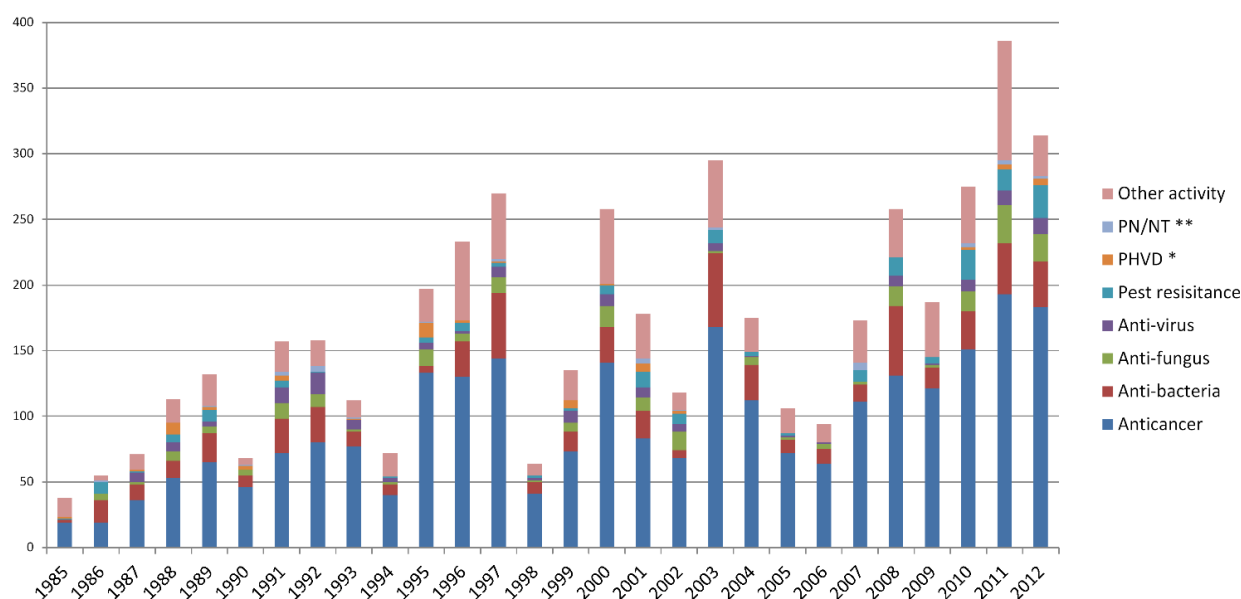


Figure 8 : Statistiques des nouveaux produits naturels marins bioactivité par année (* PHVD: prévention des maladies cardiaques et vasculaires, ** PN / NT: protection des neurones / neurotoxicité (Hu et al., 2015).

Durant la décennie récente, Les éponges recueillies provenaient de 19 commandes connues ainsi que de 12 éponges d'identité inconnue qui fournissaient de nouveaux composés. Il s'agissait notamment d'Agelasida, Astrophorida, Axinellida, Chondrosida, Choristida, Clathrinida,

Dendroceratida, Dictyoceratida, Hadromerida, Halichondrida, Haplosclerida, Homosclerophorida, Leucosolenida, Lithistida, Lyssacinosida, Ocilosclerida, Poecilosclerida, Spirophorida et Verongida (Figure 9).

Soixante-deux pays (avec l'Antarctique) étaient les sources pour les échantillons d'éponges étudiés.

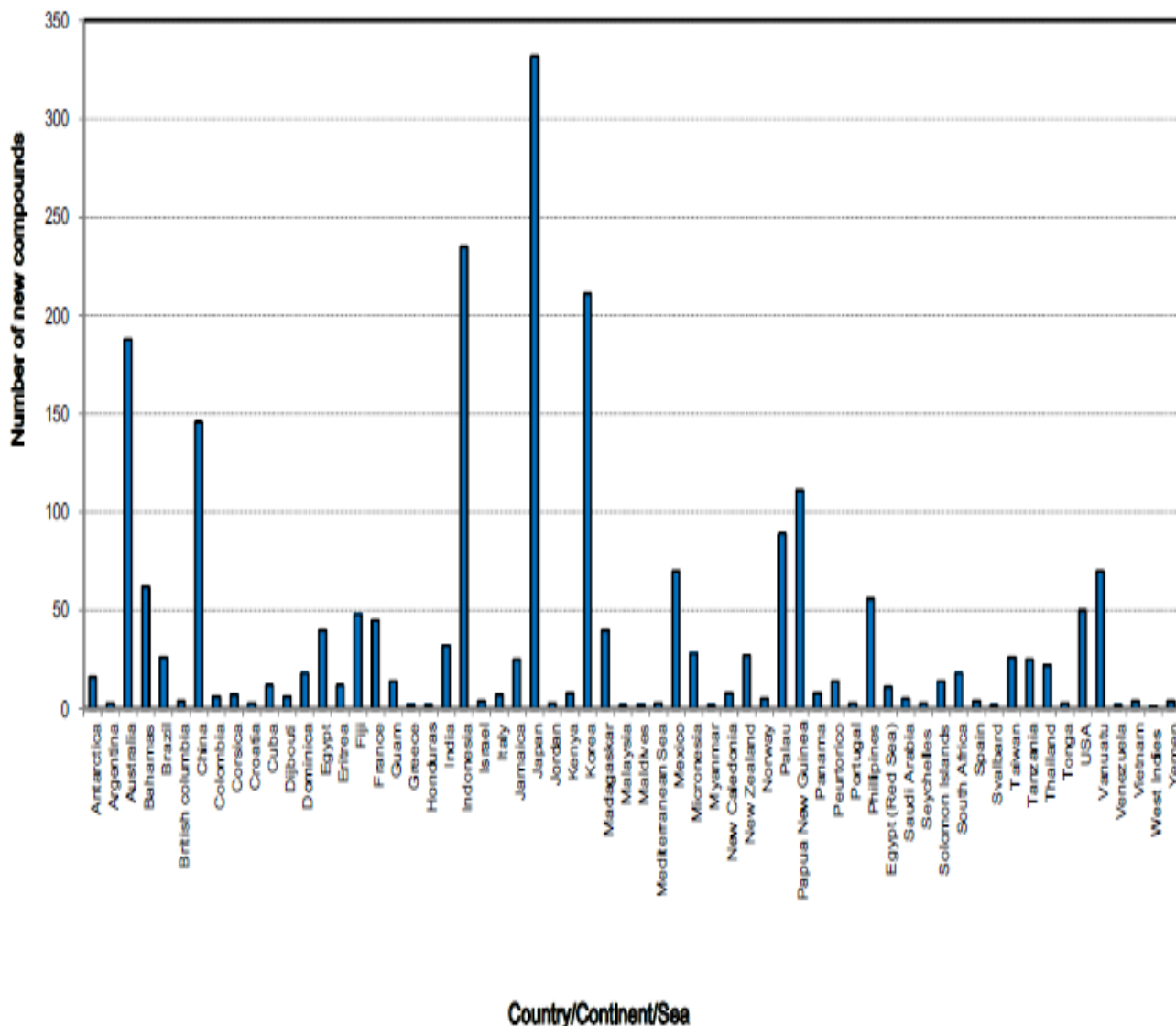


Figure 9 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différentes éponges marines et leurs sites de 2001 à 2010 (Hu et al., 2015b) .

De nouveaux composés et leur distribution 2001-2010 Répartition annuelle de Phyla qui produisent des produits naturels découverts de 2001 à 2010 (Figure 10 , 11) Pour étudier la répartition des sources de NMNP, 12 catégories différentes, y compris un groupe distinct composé de microorganismes marins et de phytoplancton, ont été utilisées pour cette revue (Mehub et al., 2014).

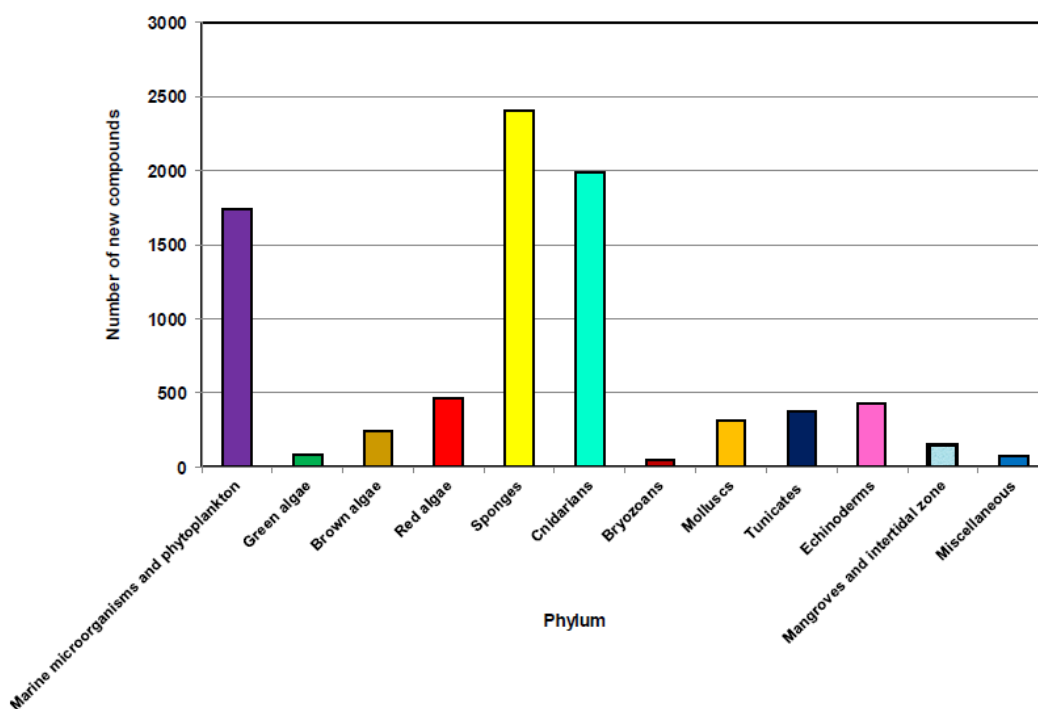


Figure 10 : Nombre total de nouveaux composés isolés de différents types de sources marines, 2001-2010 (Mehbub et al., 2014)

Tous les NMNP découverts depuis 1990 ont été enregistrés dans 64 familles appartenant au phylum Porifera.

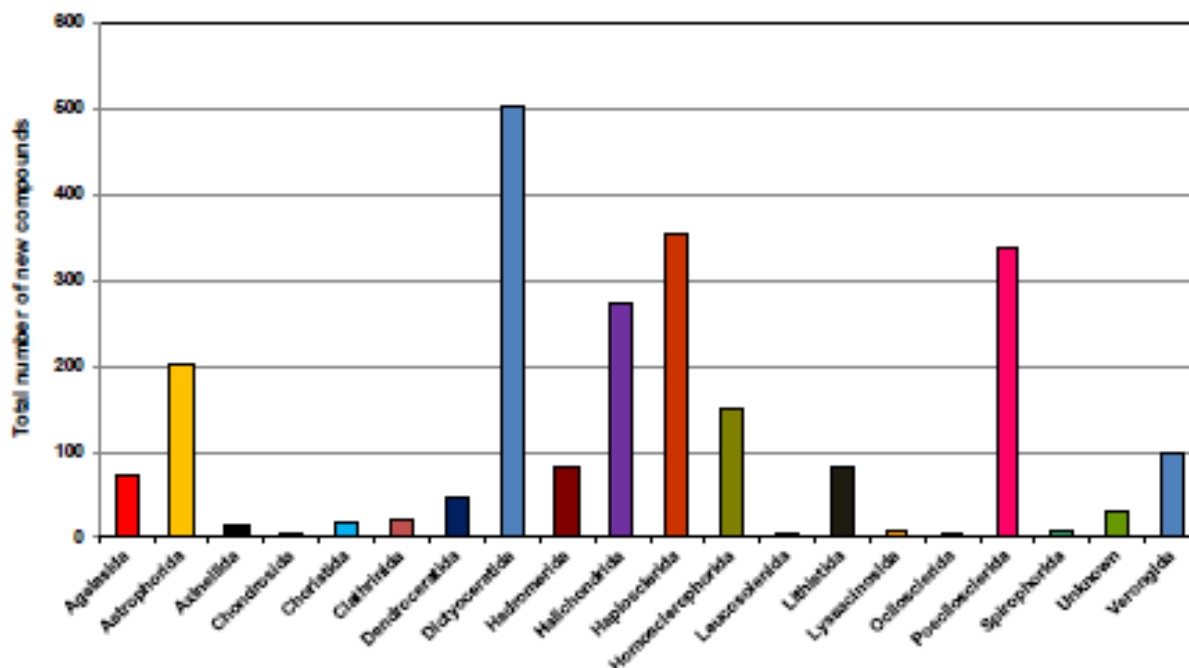


Figure 11: Nombre total de nouveaux composés isolés de différents ordres des éponges marines entre 2001-2010 (Mehbub et al., 2014) .

Éponges (Porifera) en tant que source de nouveaux produits naturels et de drogues pour l'avenir. Une étude réalisée en 2003 a permis de recueillir les composés naturels marins les plus importants qui ont subi des essais cliniques (I, II, III) pour l'activité anticancéreuse. Parmi ceux-ci, les composés des éponges étaient les suivants :

Discodermolide, Hemiasterlins A et B, Halichondrine B modifiée, KRN-7000, Alipkinidine (alcaloïde), Fascaphysines (alcaloïde), Isohomohalichondrine B, Halichondrine B, Laulimalide / Fijianolide, 5-Metoxamphimedine (alcaloïde) et Variolin (alcaloïde) (Figure 12, 13).

Un document de revue a été publié par Sipkema et *al.* 2004 sur les drogues des éponges marines. Les sources naturelles marines comme agents anticancéreux potentiels ont été examinées en 2011 qui ont mentionné 39 agents anticancéreux potentiels dérivés de la marine et parmi eux 18 composés d'éponges avec différents mécanismes d'action. Il est intéressant de noter que, parmi les 16 produits naturels marins qui sont soumis en 2014 à des essais précliniques en tant que nouveaux médicaments candidats, la plupart proviennent d'invertébrés. Parmi ceux-ci, Porifera reste le phylum le plus important, avec six des 16 composés. Un document de revue publié en 2013 a classé les molécules anticancéreuses en fonction de leur état actuel dans les essais de phase clinique (approuvé / phase IV / phase III / phase II / phase I) et mis à jour les données en avril 2012 (Mehbub et al., 2014) (Hu et al., 2015) .

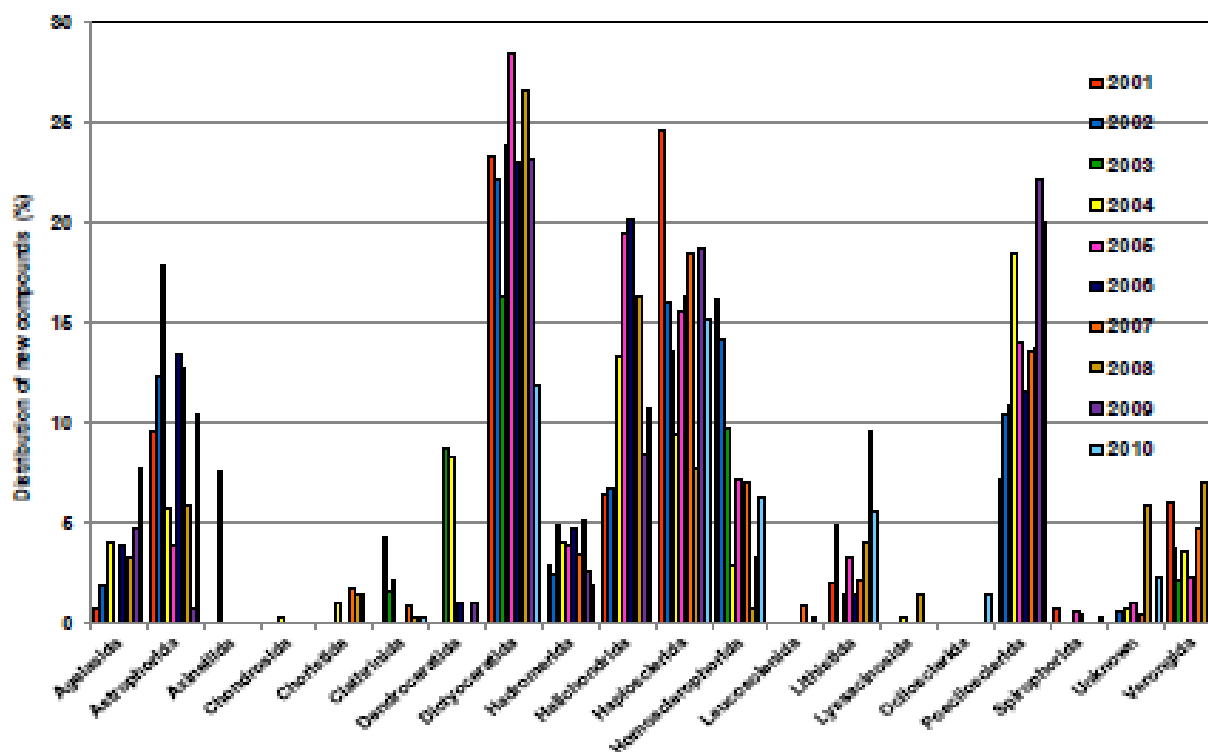


Figure 12 : Distribution de nouveaux composés isolés de différents ordres de éponges marines en pourcentage de l'année 2001-2010 (Mehbub et al., 2014).

Donc, il est à la fois scientifique et industriel de savoir pourquoi et comment les éponges marines possèdent une si grande diversité de nouveaux produits naturels marins.

Enfin, les opportunités et les défis ont été identifiés pour les futures recherches et développements (RD) dans ce domaine à croissance rapide. Les nouveaux composés isolés au cours de la dernière décennie ont été classés en 18 classes chimiques, y compris l'acide, l'alcaloïde, l'ester, l'acide gras, le glycoside, la cétone, les lipides, macrolide, alcool, peptide, peroxyde, polyketide, quinone, stéroïde, stérol, terpène, terpénoïde et les composés non classés, sur la base des données examinées (figure 13) par Blunt et *al.*, 2012.

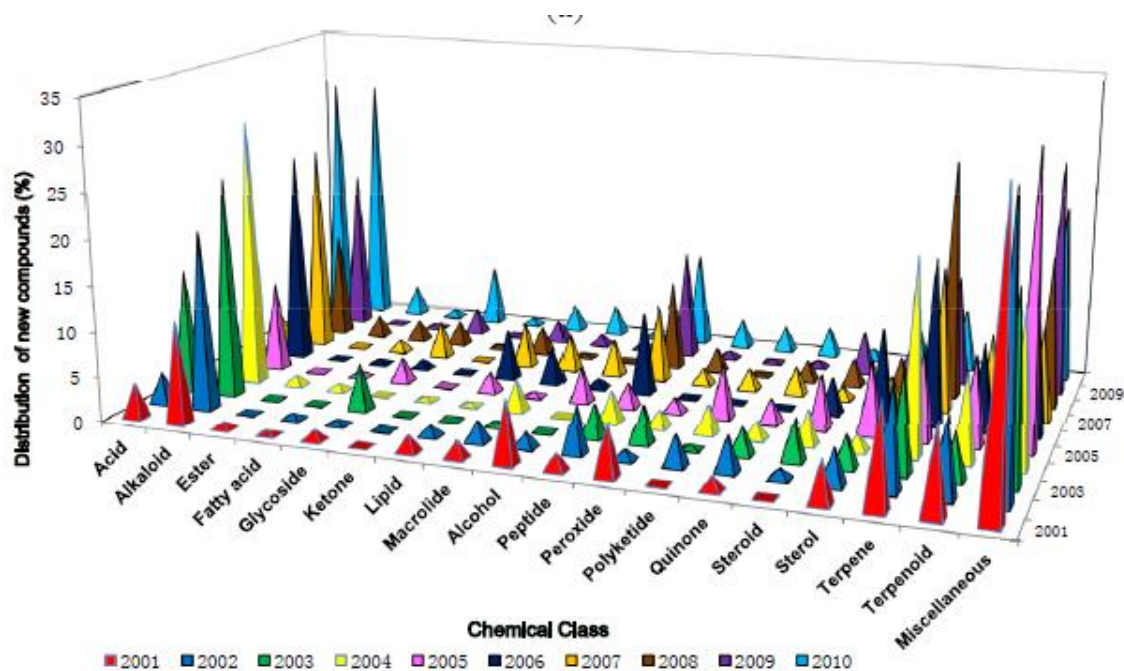


Figure 13 : La distribution de différentes classes chimiques de nouveaux composés isolés des éponges marines de 2001 à 2010 (Mehbub et al., 2014).

2.3. Les critères du choix de l'espèce

L'espèce idéale pour que nous voulions entreprendre devait répondre à un certain nombre de critères à savoir :

- par souci de conservation de la biodiversité, le premier critère correspondait à l'abondance de l'espèce sur le site de la plage el Djamilia (Alger).
- Riche en métabolites secondaires d'intérêt pharmacologique .

- Espèce déjà étudiée et définie par une empreinte chimique (Patel et al., 2010) (Croué, 2014) .

nous avons choisit l'espèces crambe crambe qui est un candidat idéal à notre étude car : *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) est une éponge encroûtante très répandue en Méditerranée. Elle fait partie des éponges les mieux connues d'un point de vue biologique et écologique. L'éponge "toxique" *C. crambe* a été largement étudiée à la fois en termes de contenu chimique.

La position systematique de l'espèce *crambe crambe*.

EMBRANCHEMENT	PORIFERA
CLASSE	Demospongiae
ORDRE	Poecilosclerida
SOUS-ORDRE	Myxillina
FAMILLE	Crambeidae
GENRE	Crambe
ESPÈCE	crambe

Les métabolites spécialisés bio synthétisés par cette éponge sont principalement constitués par une grande diversité d'alkaloïdes de guanidine polycycliques (PGA) bioactifs. Il a été prouvé que ces composés étaient stockés dans des cellules spongieuses (sphériques) et dispersées dans la colonne d'eau après leur libération à travers l'éponge par canaux expirants (oscula), conduisant à un bouclier chimique entourant l'éponge (Bondu et al., 2012) (Sfecci et al., 2016a) (Ternon et al., 2016) (Berlinck et al., 1990) .

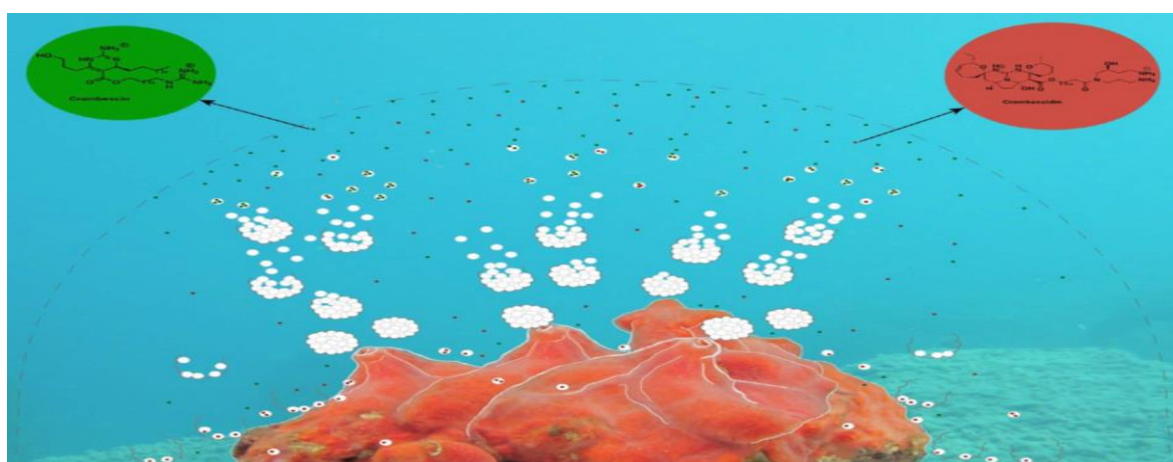


Figure 14 :Vue schématique du champ chimique entourant l'éponge encroûtante *C. crambe* (Ternon et al., 2016) .

Ces composés sont distribués dans deux familles chimiques principales appelées crambescins avec un ou deux cycles et crambescidins avec cinq cycles hétérocycliques.

Plusieurs crambescidins (nommés à partir de leur poids moléculaire: 800, 816 et 830) ont été isolés et caractérisés avec trois sous-familles de crambescines A, B et C qui diffèrent par la présence d'un cycle pyrrolidine (A), d'un spiroaminal (B) et d'une chaîne linéaire 3-hydroxypropyle (C) respectivement (figure 1) (Croué, 2014) (Becerro et al., 1995) (Jares-Erijman et al., 1993) (Ternon et al., 2016) .

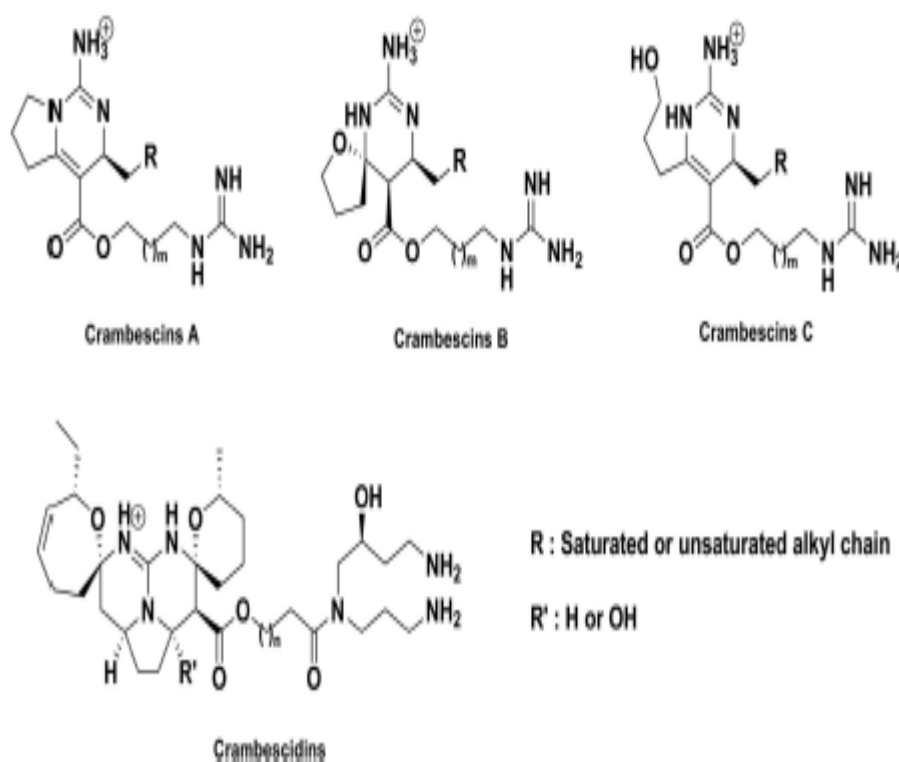


Figure : Structures chimiques des crambescins et des crambescidins avec $m = 14$ pour les crambescidins, $m \geq 4$ et $R = C_6H_{13}$ pour les crambescines A1, B1, C1 et $m = 2$ et $R = C_8H_{17}$ pour les crambescins A2, B2 et C2 (m : la masse , z : la charge) (Ternon et al., 2016) .

Name of PGA	m/z [M+H] ⁺	Molecular Formula	
Crambescin	A2-448	449.3599	C ₂₄ H ₄₀ N ₆ O ₂
	Didehydro A1	461.3599	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₂
	A1/A2-462	463.3755	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₂
	A2-476	477.3912	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₂
	B1/C1-466	467.3704	C ₂₄ H ₄₀ N ₆ O ₃
	B1/C1-480	481.3861	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₃
	B1/C1-494	495.4017	C ₂₂ H ₄₁ N ₆ O ₃
	A3-524	525.3912	C ₂₂ H ₄₀ N ₆ O ₂
	A3-524	539.4068	C ₂₁ H ₄₁ N ₆ O ₂
	B3/C3-542	543.4017	C ₂₀ H ₄₁ N ₆ O ₃
	Didehydro C3	555.4017	C ₂₁ H ₄₁ N ₆ O ₃
	B3/C3-556	557.4174	C ₂₁ H ₄₂ N ₆ O ₃
Crambescidin	800	801.6212	C ₄₀ H ₆₁ N ₆ O ₆
	816	817.6161	C ₄₀ H ₆₁ N ₆ O ₇
	830	831.6318	C ₄₀ H ₆₀ N ₆ O ₇

Tableau 2. Masse / charge (M / z) théorique et formule moléculaire associée pour les alcaloïdes guanidiniques polycycliques (PGA) quantifié de C. crambe (Ternon et al., 2016) .

C. crambe est connue pour sa capacité à empêcher la colonisation de surface (fouling) ;son activité contre des microfoulers ou larves d’invertébrés témoignant de la forte toxicité de cette éponge (Uriz et al,1996) . Les extraies de C.crambe possèdent des activités antimicrobiennes , antifongiques (Burkholder et Ruetzler, 1969 ;Becerro et al.,1994) mais également antinéoplasiques notamment envers des cellules cancéreuses pancréatiques et prostatiques (Ottinger et al.,2012).

En termes d'applications pharmaceutiques, les crambescins et les crambescidins présentent les activités biologiques suivantes :

- les crambescines inhibent la fixation de la glycoprotéine gp120du VIH-1 sur les récepteur CD4(Patil et al., 1995) .Plus récemment , il a été démontré que ces molécules bloquent partiellement les canaux potassiques au sein des neurones corticaux d’embryons de souris (Martin et al., 2013).Cette capacité à bloquer des canaux potassiques peut être utilisé en thérapeutique contre divers troubles tels que la Chorée de Huntington ou encore la maladie d’ Alzheimer .

- Les crambescidines quant à elles ,sont cytotoxiques sur des cellules leucémiques L1210 mais également sur de nombreuses cellules tumorales (Jares-Erijman et al .,1991 ;Berlinck et al .,1993 ;Aoki et al.,2004 ;Rubiolo et al.,2013).Elles sont antivirales vis-à-vis de l'herpès simplex de type 1(HSV-1),antifongiques (crambescidines 800 ,830 et 816) contre *Saccharomyces cerevisiae* (Rubiolo et al.,2013).
- La crambescidine 800 possède également des activités anti-malariales (Lazaro et al.,2006).
- Crambescidin 816 exerce une activité antagoniste de Ca²⁺ dans les neurones28-30, réduit le côlon humain la viabilité des cellules du carcinome30 et ce composé est cytotoxique contre plusieurs lignées cellulaires tumorales humaines30 et corticales neurones (Dash et al., 2009) (Rubiolo et al., 2013) (Roel et al., 2015) (Aoki et al., 2004) (Ottinger et al., 2012b) (Sfecci et al., 2016) .

Ces molécules synthétisées font l'objet de dépôts de brevets (exemple :demande de brevet CA2286738 pour les composés de crambescidines).

Metabolite	Species	Sampling Site	Discovery Year	Guanidine Moiety	Biological Activity	Synthesis Described
crambescidin 800 (2)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av, Am, At	Yes
crambescidin 816 (3)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av, At, Ca ²⁺ antagonist	No
crambescidin 830 (4)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	n.t.	No
crambescidin 844 (5)	<i>Crambe crambe</i>	Palma de Mallorca, Mediterranean sea	1991	1	Av	No
13,14,15-isocrambescidine 800 (6)	<i>Crambe crambe</i>	Banyuls, Mediterranean sea	1993	1	Not active	Yes
crambidine (7)	<i>Crambe crambe</i>	Banyuls, Mediterranean sea	1993	1	n.t.	Yes

Tableau 2 : alcaloïdes guanidiniques (GA)assimilés à la crambescidine de 1989 à 2015 (Sfecci et al., 2016) .

		Prostate Ovary		Breast		Melanoma	Lung	Leukemia		Pancreas		Colon		Cervix	Ref	
		DU-145	IGROV	SK-BR3	MDA-MB-231	SK-MEL-28	NSCL A549	L-562	HL-60	THP-1	PANCI	HT29	HCT-16	LOVO		LOVO-DOX
crambescidin 800 (2)	GI ₅₀	0.19	0.05	0.16	nt.	0.04	0.11	0.02	nt.	nt.	0.04	0.04	nt.	0.08	0.08	0.05
	TGI	1.38	2.50	0.56	nt.	0.11	1.36	0.06	nt.	nt.	1.53	0.23	nt.	2.29	2.02	0.21
	LC ₅₀	7.01	nt.	nt.	nt.	1.70	9.68	6.73	nt.	nt.	8.66	5.75	nt.	8.97	8.50	1.58
crambescidin 816 (3)	GI ₅₀	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	IC ₅₀	nt.	nt.	nt.
	TGI	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.		0.24	nt.	nt.
	LC ₅₀	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.	nt.

Tableau 3 : Activités anti tumorales des alcaloïdes guanidiniques (GA) la (les valeurs sont exprimées en µg / mL) (Sfecci et al., 2016) .

3. Généralités sur les méthodes Chromatographie utilisées

3.1. Spectrométrie de masse (MS)

Principe

La spectrométrie de masse consiste à séparer et à identifier des molécules selon leur masse et leur charge, la séparation des molécules par cette technique est plus douce qu’avec les autres méthodes. Elle permet d’ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader (YOUNG, 2004). L’échantillon est placé sur une lame, le dépôt (ou spot) formé est appelé cible. Une source laser est dirigée sur la cible afin d’ioniser les molécules de l’échantillon . Les ions sont ensuite détectés en mesurant le temps que mettent les différentes particules à atteindre le détecteur. La vitesse de chaque particule dépend du rapport masse/charge. Les molécules plus grandes mettront plus de temps à atteindre le détecteur, tandis que les molécules plus petites arriveront plus vite. Une fois l’ion arrivé au détecteur, le signal est amplifié et envoyé à un ordinateur qui traite les données et donne les résultats sous forme de spectre (TONELLA et PETRINI, 2007).

3.1.1. Chromatographie en phase gazeuse

Principe

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique permettant de séparer et d’identifier les composés d’un mélange. Elle s’applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d’être vaporisés par chauffage sans décomposition. Dans la CPG la phase mobile est gazeuse. Le mélange à analyser est vaporisé à l’entrée de la colonne. La phase stationnaire dans

la colonne peut être solide ou liquide. Le mélange est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules du mélange se séparent et sortent de la colonne les unes après les autres après un certain intervalle de temps dépendant de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. A la sortie de la colonne, les composés rencontrent un élément essentiel qui est le détecteur. Il évalue en continu la quantité de chacun des constituants séparés au sein du gaz porteur grâce à la mesure de différentes propriétés physiques du mélange gazeux et envoie un signal électronique vers un enregistreur (PENICHEV, 2010)

3.1.2. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (« Gas chromatography-mass spectrometry » ou GC-MS) :

est une technique d'analyse qui combine les performances de la chromatographie en phase gazeuse, pour la séparation des composés d'un échantillon, et de la spectrométrie de masse, pour la détection et l'identification des composés en fonction de leur rapport masse sur charge. Cette technique permet d'identifier et/ou de quantifier précisément de nombreuses substances présentes en très petites quantités, voire en traces.

3.2 La spectroscopie infrarouge.

Principe

La spectroscopie infrarouge (IR) est un moyen de diagnostic permettant de déterminer la nature des liaisons chimiques présentes dans une molécule ; En effet, l'expérience montre que certaines fréquences de vibration, dites « fréquences de groupe », sont caractéristiques de la présence d'un groupement chimique dans la molécule étudiée. La théorie mécanique des vibrations permet de prévoir l'existence des fréquences de groupe à partir des ordres de grandeur des différents types de constante de force . Ainsi, la spectroscopie infrarouge est un très puissant moyen de caractérisation pour identifier des groupements moléculaires et obtenir de nombreuses informations microscopiques sur leur conformation et leurs éventuelles interactions .

La spectroscopie IR est une méthode d'emploi courant, laissée un peu de côté ces dernières années au profit de la résonance magnétique nucléaire (RMN) , qui permet de déterminer avec une grande précision les structures moléculaires.

Le rayonnement infrarouge (IR), invisible à l'œil nu, est situé dans domaine de longueur d'onde supérieur à 800 nm. Lorsqu'un échantillon est traversé par un faisceau lumineux IR, une partie de la lumière est absorbée. C'est grâce à cette absorption que nous allons pouvoir déceler la

présence de groupements d'atomes caractéristiques. Les molécules, au passage du rayonnement IR, subissent des mouvements de vibration internes (d'élongation et de déformation). Ces vibrations sont à l'origine des pics et des bandes d'absorption que nous observons sur le spectre IR :

- En ordonnée, la transmittance en %, qui représente le pourcentage de lumière ayant traversé l'échantillon.
- En abscisse, le nombre d'onde (l'inverse de la longueur d'onde) en cm^{-1} . Il existe deux zones principales dans un spectre IR :
 - Une première zone à gauche correspondant à un nombre d'onde supérieur à 1400 cm^{-1} où se trouvent les bandes caractéristiques des liaisons de la molécule
 - Une seconde zone à droite correspondant à un nombre d'onde inférieur à 1400 cm^{-1} , appelée « empreinte digitale » que nous ne pourrions pas analyser à cause de sa complexité (Teixeira, 1994) (Walte, 1989).

3.3 La chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) :

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Elle a permis de réaliser des analyses qui n'étaient auparavant pas possible avec les techniques sur couche mince ou en phase gazeuse.

A l'origine la chromatographie en phase liquide se faisait sur des colonnes en verre. Le liquide traversait la phase stationnaire par gravité ou sous faible pression. Puis pour augmenter le débit, des manipulations ont été réalisées sous pression plus forte. C'est ce que l'on a appelé la chromatographie liquide sous haute pression (HPLC). Très rapidement le P de pression est devenu le P de performance lorsque l'on a optimisé la technique (diminution de la taille de particules de la phase stationnaire, régularité de cette phase...).

Principe

Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans un tube appelé colonne chromatographique. La phase mobile poussée par une pompe sous haute pression, parcourt le système chromatographique.

Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne grâce à un détecteur approprié les différents solutés sont caractérisés par un pic. L'ensemble des pics enregistrés est appelé chromatogramme.

Chapitre II
Matériel et méthodes

Chapitre II : Matériel et méthodes

RECOLTE DES ECHANTILLONS ET CONDITIONNEMENT

1. Échantillonnage

L'échantillonnage constitue pour le scientifique l'un des problèmes les plus difficiles à résoudre afin d'obtenir des paramètres biologiques (Daget, 1976).

Les spécimens d'éponge marines ont été recueillis au cours de la période de juin, juillet et septembre 2017 à une profondeur qui varie entre 10 à 16 m à la main (marton et bec) grâce à la plongée SCUBA réalisée par le club EL Mordjane de la commune de Aïn Benian au niveau de la plage du port el Djamila (Alger) $36^{\circ} 48' 01''$ nord.

Des mesures des paramètres physico-chimiques sont faites in situ à l'aide d'un appareil multi paramètres

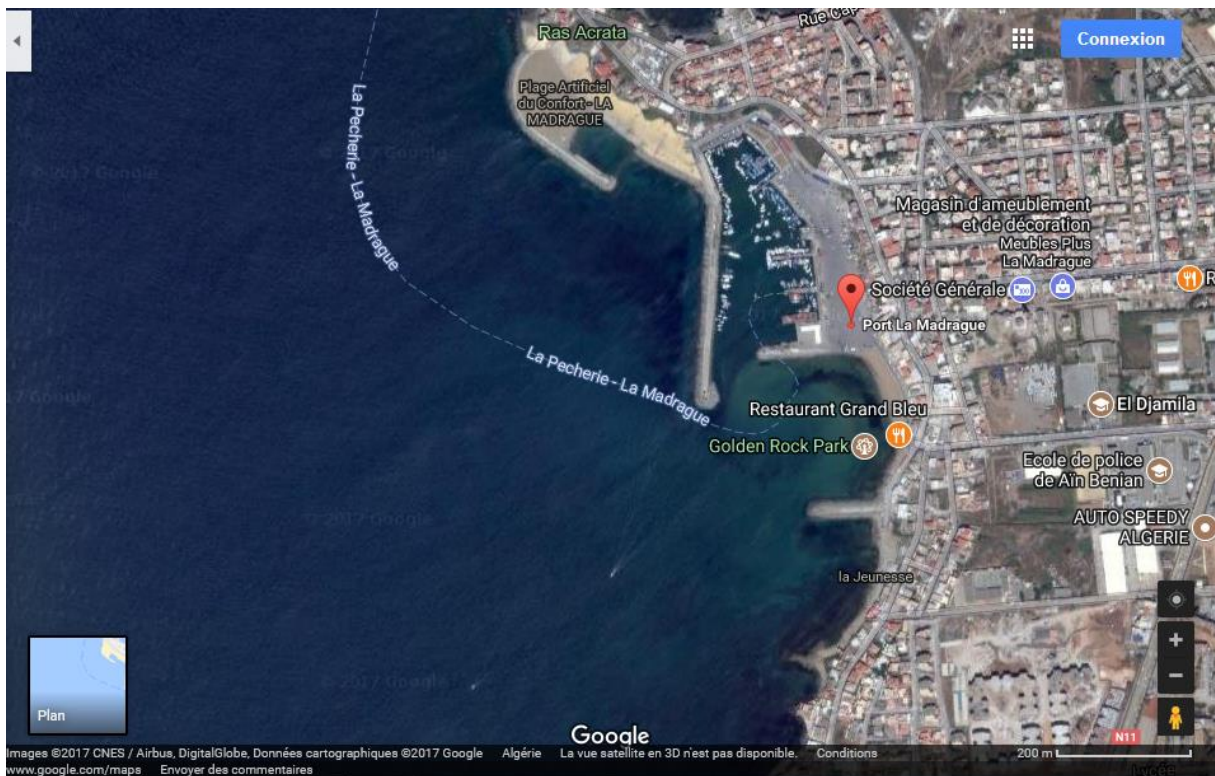


Figure 15 : Image satellitaire de la zone d'échantillonnage (Aïn Benian au niveau de la plage du port el Djamila (Alger) $36^{\circ} 48' 01''$ nord).



Figure 16 : Éponges marines récoltés durant différentes plongées (période de juin , juillet et septembre).

2. CONDITIONNEMENT

Les tissus d'éponges ont été placés dans l'eau de mer dans des sacs en plastique et mis dans une glacière afin de les garder au frais puis ont été transportés immédiatement au laboratoire. Le traitement des tissus a été réalisé le plus rapidement possible afin d'éviter la détérioration des molécules ciblées .

Au niveau du laboratoire , les échantillons ont été triés, référencés, photographiés après identification afin de sélectionner l'espèce cible (crambe crambe) et décrits avant de procéder à la lyophilisation puis au broyage . Ces échantillons sont ensuite stockés à 4°C pour éviter tout risque de dégradation en attendant les études chimique ultérieures.

3. Partie expérimentale

3.1 Préparations de spicules

Il existe plusieurs façons de préparer des lames microscopiques nécessaires à l'identification taxonomique. Deux sont d'une utilisation générale et relativement simple, des agents de blanchiment et d'acide nitrique.

Dans notre étude nous avons travaillé avec la méthode de blanchiment.

Préparation du blanchiment:

Selon Kelly-Borges et Pomponi il s'agit d'une méthode «rapide et sale», adaptée aux identifications rapides de toutes les éponges portant des spicules, y compris Calcarea.

Nous avons utilisé :

- les petits conteneurs en plastique comme les eppendorfs
- eau de javel domestique diluée
- 96% d'éthanol dans une bouteille de pression
- eau distillée dans une bouteille de pression
- lames ou armoises
- Perri pour couper l'éponge
- pipettes désaisonnables

1. Coupez une petite partie de l'ectosome et du choanosome (3 mm cubes) sur la boîte à pétri et placez-les dans l'eppendorf (rincer les ustensiles entre les spécimens). Eppendorf du couvercle d'étiquette avec le numéro d'échantillon.

2. Remplissez à moitié chaque eppendorf avec de l'eau de Javel et laissez reposer pendant 30 à 60 minutes selon la consistance de l'éponge.

REMARQUE: si vous n'avez pas besoin d'un support permanent de vos spicules, vous pouvez regarder la suspension spicule-blanchiment posée à partir de l'eppendorf et la glisser sur une glissière surmontée d'une lamelle.

3. Pipettez autant d'eau de Javel que possible sans déranger les tissus dissous et les spicules.
4. Égoutter dans de l'eau pour remédier soigneusement aux spicules; laisser durcir les spicules pendant 10 à 15 minutes; répéter plusieurs fois.
5. Pipettez l'eau comme à l'étape 3 et rechargez avec 100% d'éthanol pour ré-endiguer les spicules.
6. Aspirez la suspension de spicule en pipette.
7. Égouttez délicatement sur le glissement de la glissière, répandez-vous un peu avec une pointe de pipette, séchez de l'éthanol, ajoutez un support de montage et ajoutez une lamelle.

On a réalisé ce protocole d'identification des cycles selon les moyens disponibles dans le laboratoire d'aquaculture. Donc après avoir préparé les lames, on a passé pour voir sous microscope liée avec une caméra.

3.2 Extraction

Méthode 1

L'échantillon lyophilisé de l'éponge marine *C. crambe* (11.65 g) a été mis à macérer successivement dans le mélange des solvants $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (1:1). Après, les solvants organiques ont été évaporés sous la hôte à température ambiante.

Les extraits bruts, obtenus, sont référencés, photographiés. Ces extraits sont ensuite stockés à -18°C en attendant l'identification par la méthode chromatographique. Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC / MS) (Bondu et al., 2012).

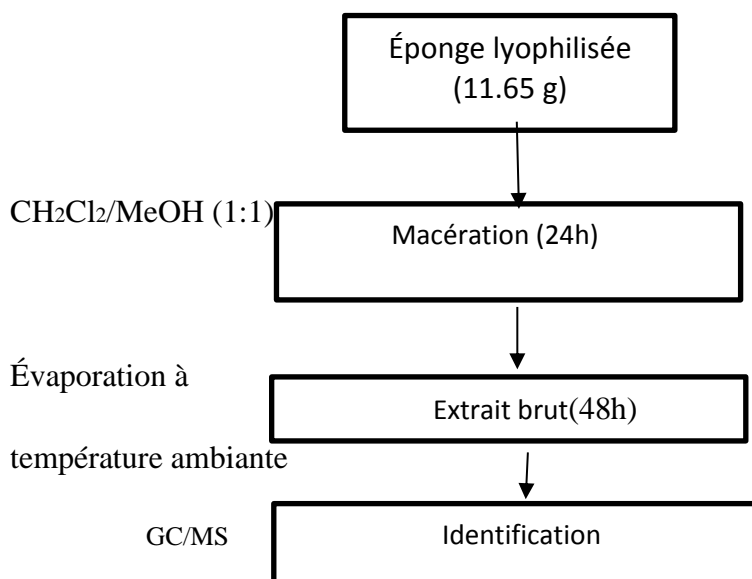


Figure 17 : Schéma représentatif de la méthode d'extraction 1

Nous avons réalisés trois essais de macération afin d'augmenter la chance de trouver ces molécules (alcaloïdes guanidiniques) :

Essai 1 : P = 16.13g

Essai 2 : P = 4.55g

Essai 3 : P = 10.67g

P : poids



- Eponge lyophilisée et broyée



- Macération pendant 24h



- Filtration



- Évaporation à sec

Échantillons prêt à être identifiés par GC/MS



Figure 18 : Extraction de l'éponge *Crambe crambe*

Méthode 2

Les composés actifs dans *Crambe crambe* sont particuliers, en raison de sa gamme de polarité et de sa variété: jusqu'à 4 crambines (plusieurs homologues) et 4 crambescidines ont été décrits. Ces composés confèrent un mélange de propriétés lipophiles et hydrophiles. Des études Préliminaires ont été menées pour déterminer une méthode pour une extraction facile de toutes ces familles de composés. Ces études sont expliquées en entier à Becerro (1994) et peuvent se résumer comme suit: après avoir essayé toutes les séquences possibles avec des solvants couvrant une grande gamme de polarités (hexane, dichlorométhane et eau), nous avons constaté qu'une seule extraction avec du dichlorométhane (DCM) qui reprend tous les composés toxiques et aucune toxicité n'a été détectée si les tissus ont été extraits après avec l'un des autres solvants.

Après la sixième plongée (06 /09/2017) les fragments de l'éponge ont été immédiatement pris au laboratoire, légèrement rincé (quatre secondes) avec l'eau distillée, nettoyés. Le rinçage à l'eau était nécessaire pour éliminer les sels retenus dans le système canal de l'éponge.

L'échantillon frais de l'éponge marine *C. crambe* (26.65 g) a été mis à macérer successivement dans le dichlorométhane(3 macérations) à température ambiante. Après 24h nous avons filtré pour obtenir l'extrait A et à partir de cet extrait nous avons effectué une extraction liquide liquide par l'eau et le méthanol (1:1).

Les extraits bruts, obtenus sont référencés, photographiés. Ces extraits sont ensuite stockés à --18°C en attendant l'identification par GC / MS.

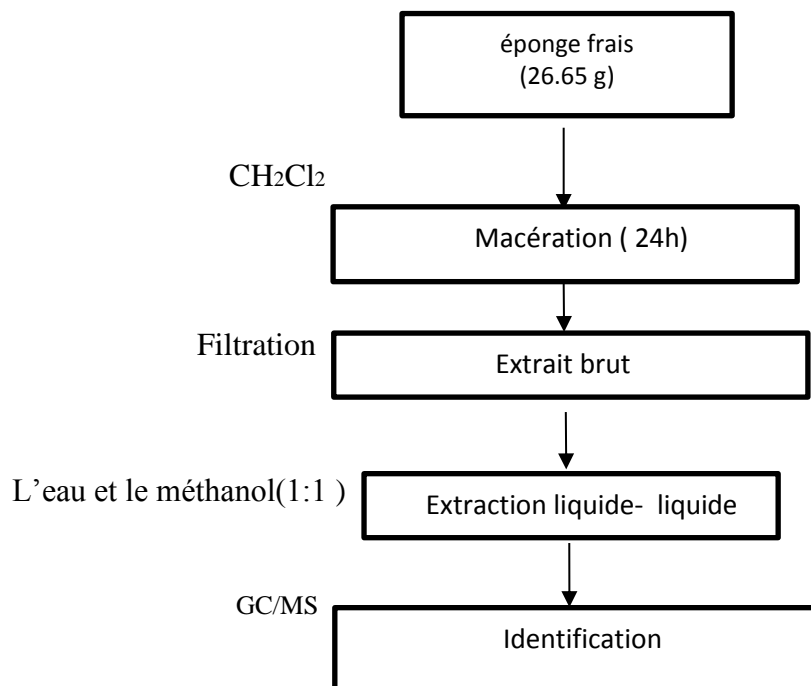


Figure 19 : Schéma représentatif de la méthode d'extraction 2



Figure 20 : Préparation des extraits pour être transporté au laboratoire de la police scientifique (département toxicologie) pour l'identification

Conditions expérimentales utilisée dans la chromatographie gazeuse couplée en spectroscopie de masse (GC/MS) :

Colonne: Chirasil Val III

Débit: 1 (ml / min)

Vitesse graphique: 5 (mm / min)

Rapport de division: 20: 1

Programme Temp: 6 min à 50 ° C, 5 ° C / min à 180 ° C

Échantillon: extrait brute de *crambe Crambe* par la méthode 1 et 2

Méthode 3 : Préparation de l'extrait méthanolique :

L'extrait d'éponge a été préparé par extraction méthanolique comme suit :

5 cm³ de tissu d' éponge a été coupé et congelé immédiatement puis lyophilisé, broyé avec un mortier et extrait de manière exhaustive pendant 24h dans du méthanol (MeOH) (50 ml / 100 mg de tissu éponge) . Après centrifugation, les surnageant ont été transférés dans des tubes de réaction et stockés à -18 C jusqu'à l'analyse par infrarouge et HPLC (Ottinger et al., 2012b) .

Dans notre extraction nous avons travaillé avec l'éponge frais.



Figure 21 : Extraction méthanolique de l'éponge *Crambe crambe*

Nous avons utilisé cet extrait pour l'analyse par spectroscopie infrarouge . Les analyses sont faites au niveau du Centre de Recherche Scientifique et Technique en Analyses Physico-Chimiques (CRAPC) .

Méthode 4

Le protocole optimisé au cours de cette étude à partir du protocole standardisé «ECIMAR» est le suivant :

Le matériel biologique collecté lyophilisé est réduit en poudre, pesé et conservé au congélateur à -20°C jusqu'à extraction. Pour chaque analyse, 20 mg environ de matériel biologique sont extraites avec CH₂Cl₂/MeOH (1/1 v/v ; 2x 2mL, ultrasons 2x 10min). Après filtration sur coton, évaporation à sec sous azote et reprise dans 500 µl de MeOH, chaque extrait est filtré de nouveau sur filtre seringue (0,22 µm ; 1,3 µm) et transvasé dans un vial de 1,5 ml (JascoTM) avec bouchon à septum pour l'analyse chromatographique (Croué, 2014).

Nous avons utilisé pour l'étude chromatographique HPLC-UV-DAD la condition 2 du protocole standardisé par « ECIMAR »

Conditions 2

- Colonne Gemini C18 (150 x 3 mm, 5 µm) PhenomenexTM
- Solvants: H₂O + 1 % d'acide formique et CH₃CN + 1 % d'acide formique,
- Injection : 10 µL,
- Débit : 0,5 mL/min,
- Température de la colonne 25°C

Figure condition optimisée des analyses par ECIMAR (Croué, 2014) .

Les analyses sont faites au niveau du laboratoire de contrôle des produits toxiques de l'institut criminologique de la gendarmerie nationale (bouchaoui)

Conditions expérimentales optimisées selon l'appareil utilisée :

Appareil : HPLC/UV-DAD (Thermo)

Colonne : C18 (150x4,6, 5µm)

Éluant (B) : le méthanol (MEOH)

Éluant (D) : l'eau (H₂O)

Longueur d'onde : 290 nm


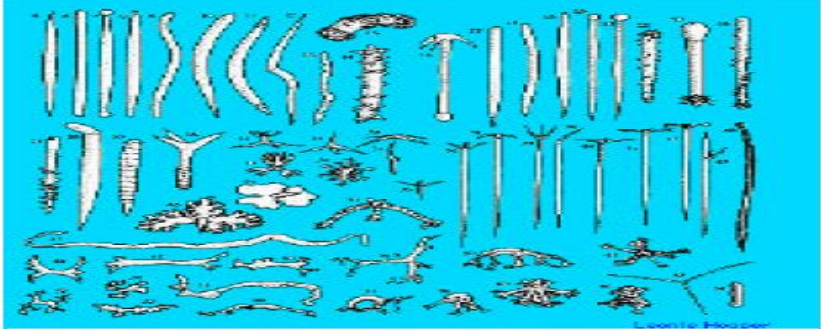
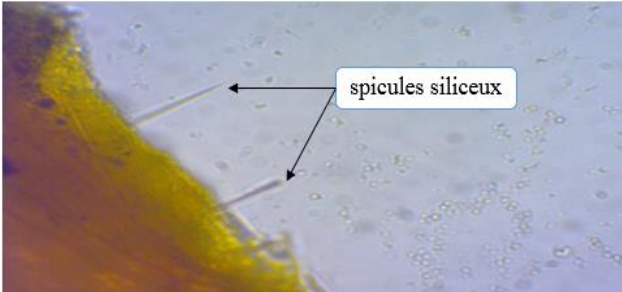
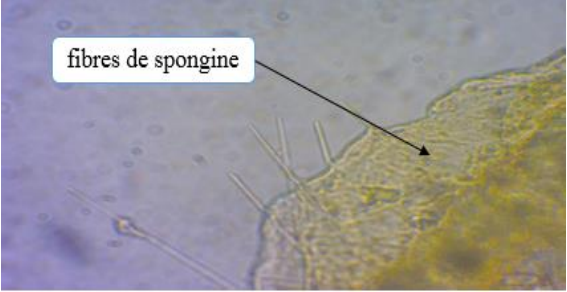
Volume d'injection : 20 µL

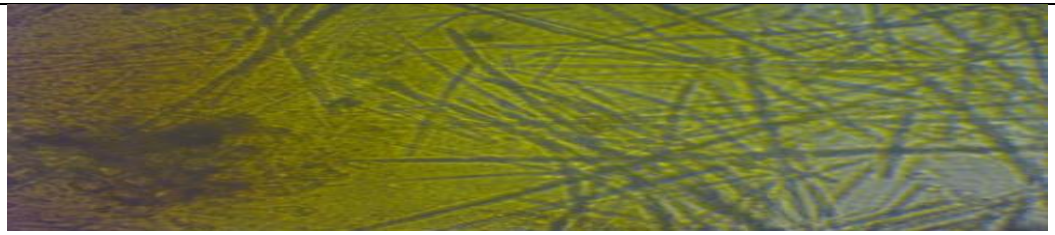
Débit : 1mL/min

Chapitre III
Résultats et discussion

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Résultats de l'identification de l'espèce

	Descriptif
Embranchement : Porifera	Espèce exclusivement marine, filtreurs, fixés au substrat, en prenant sa forme (formes variables)  <p style="text-align: center;">Surface de l'éponge (embranchement Porifera)</p>
Classe : Demospongiae	 <p style="text-align: center;">Spicules siliceux de démosponges Léonie HOOPER</p>  

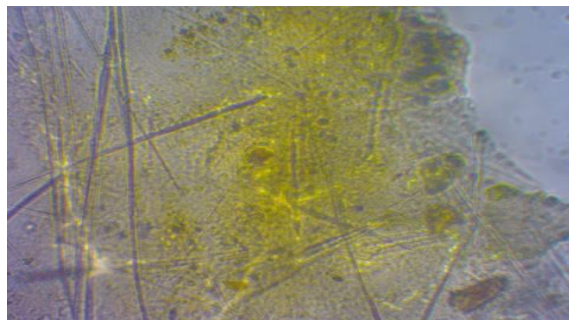
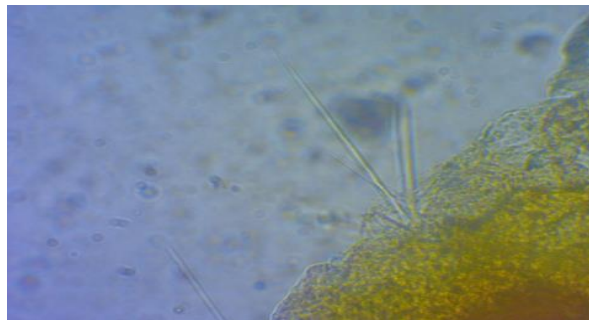


vue microscopique (X10) des spicules monaxoniques siliceuse et des fibres des spongines (*classe* : Demospongiae)

Les spicules sont monaxoniques (monactine ou diactine)

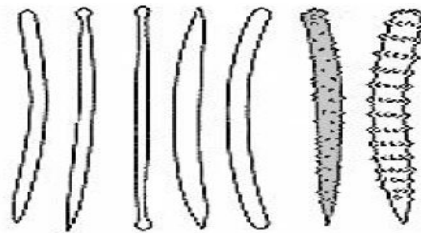
Ordre :
Poecilosclerida

Charpente de spicules siliceux (styles ou acanthostyles) renforcée de spongine.



vue microscopique (X40) de la Charpente de spicules siliceux (ordre : Poecilosclerida)

Sous-ordre :
Myxillina



Acanthostyle : style doté de nombreuses épines

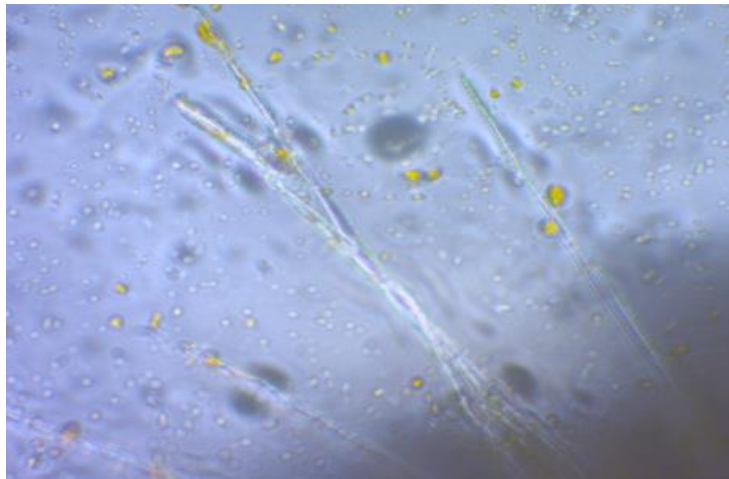
Megasclères Acanthostyles (Van Soest, 2002)



vue microscopique (X40) des Acanthostyles des éponges de sous-ordre Myxillina

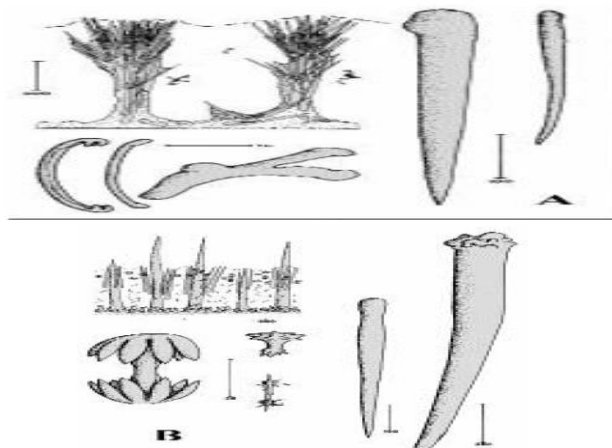
Famille :
Crambeidae

Spicules subtylostyles

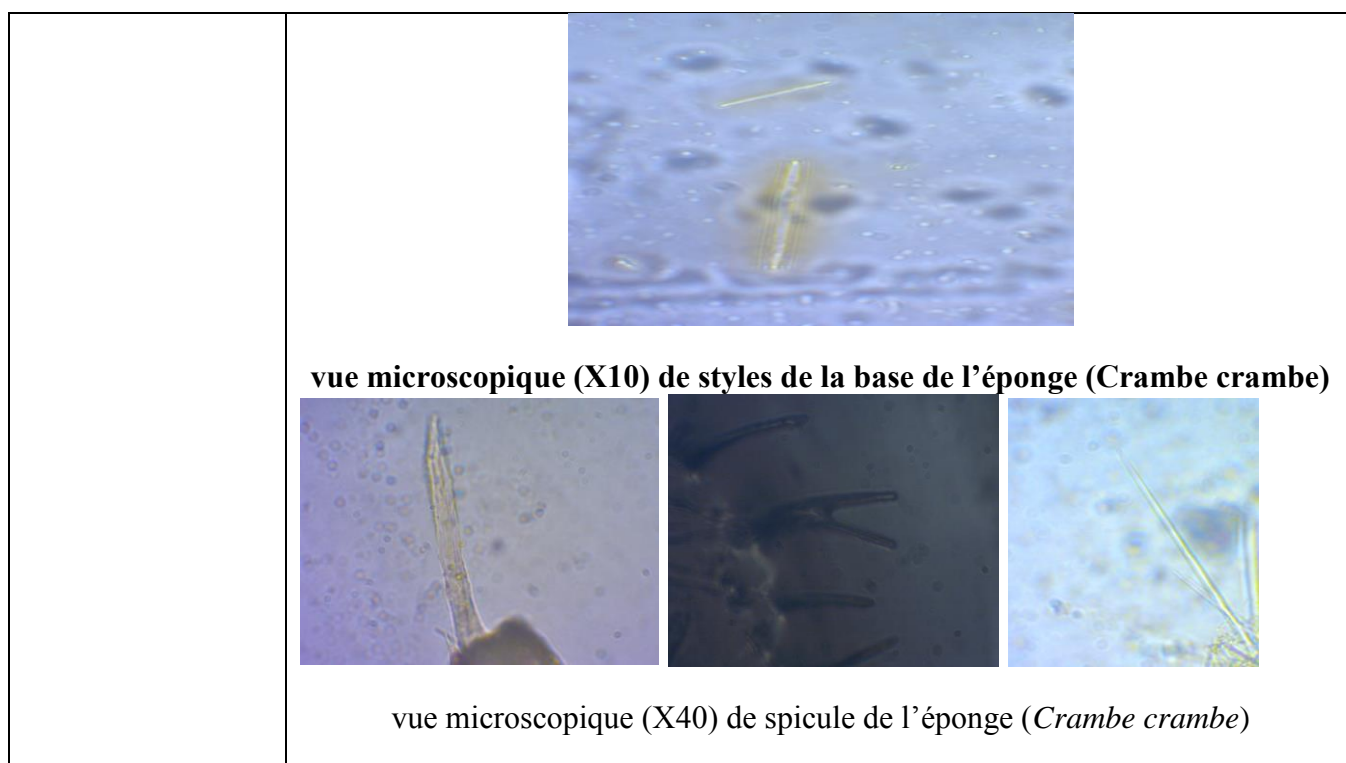


vue microscopique (X10) des Spicules subtylostyles de la famille des Crambeidae

Espèce :
crambe



les styles des faisceaux périphériques (Van Soest, 2002.)



2. Résultats de l'identification des métabolites secondaire de l'éponge *Crambe crambe*

Plusieurs analyses chromatographiques ont été effectués afin d'identifier les métabolites secondaires spécifique à l'éponge *Crambe crambe*

2.1 Analyse de l'extrait de l'éponge *Crambe crambe* par la spectrométrie de masse couplé à la chromatographie gazeuse (GC/MS).

Le résultats obtenues sont représentés dans la figure suivante

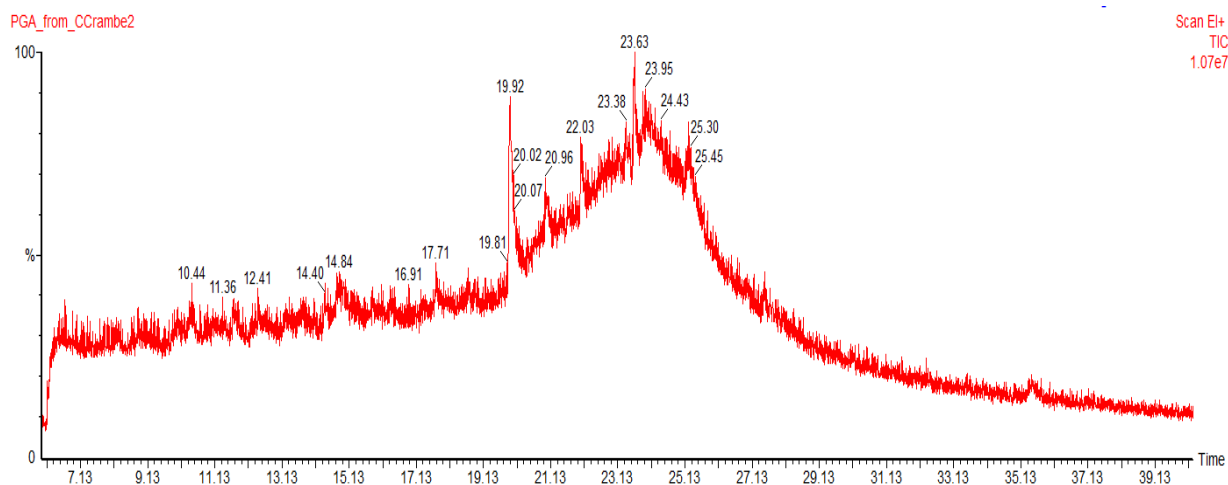


Figure 22 : profil d'analyse de l'extrait de *Crambe crambe* par la méthode GC/MS

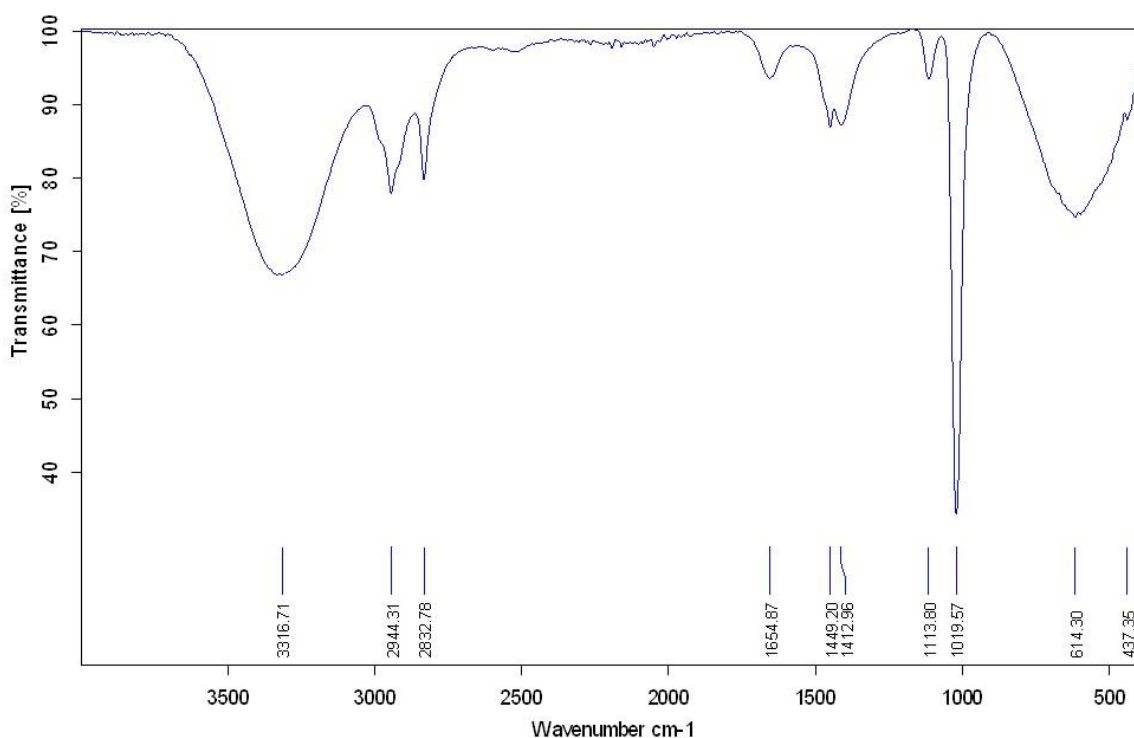
D'après les résultats de la GC/MS on remarque une absence totale des crambescins et des crambescidins (annexe)

Plusieurs protocoles d'extractions ont été réalisés afin de confirmer que le résultat négatif n'est pas lié à la méthode d'extraction.

Selon la bibliographie cette absence est due à :

- La gamme de détection de l'appareil qui ne dépasse pas les 300 m/z par rapport aux molécules recherchés qui ont des masses / charges (m/z) supérieures à 400 m/z
- Le type de la colonne qui est différent de celui mentionné dans le protocole (selon la bibliographie la colonne chiral est une colonne spécifique pour la détection de ces deux familles de molécules)

2.2 Analyse par la spectrométrie infrarouge (IR)



C:\Documents and Settings\Client\Application Data\OPUS_65\MEAS\FA.0	FA	Instrument type and / or accessory	02/10/2017
---------------------------------------------------------------------	----	------------------------------------	------------

Figure 23 : spectre d'absorption de l'extrait de l'éponge *Crambe crambe*

D'après le spectre IR et selon les groupements actifs qui composent les deux familles des alcaloïdes guanidiniques (crambescine et crambescidine) sont présents dans l'extrait d'éponge étudié (annexe)

Selon (Berlinck et al., 1990) on a pu confirmer la présence des deux crambescines :

- **Crambescine B** : IR : 3320-3120, 1730, 1660, 1650 and 1615 cm^{-1}
- **Crambescine A** : IR : 3200-3120, 1694 and 1680-1650 cm^{-1}

2.3 Résultat d'analyse HPLC –UV- DAD

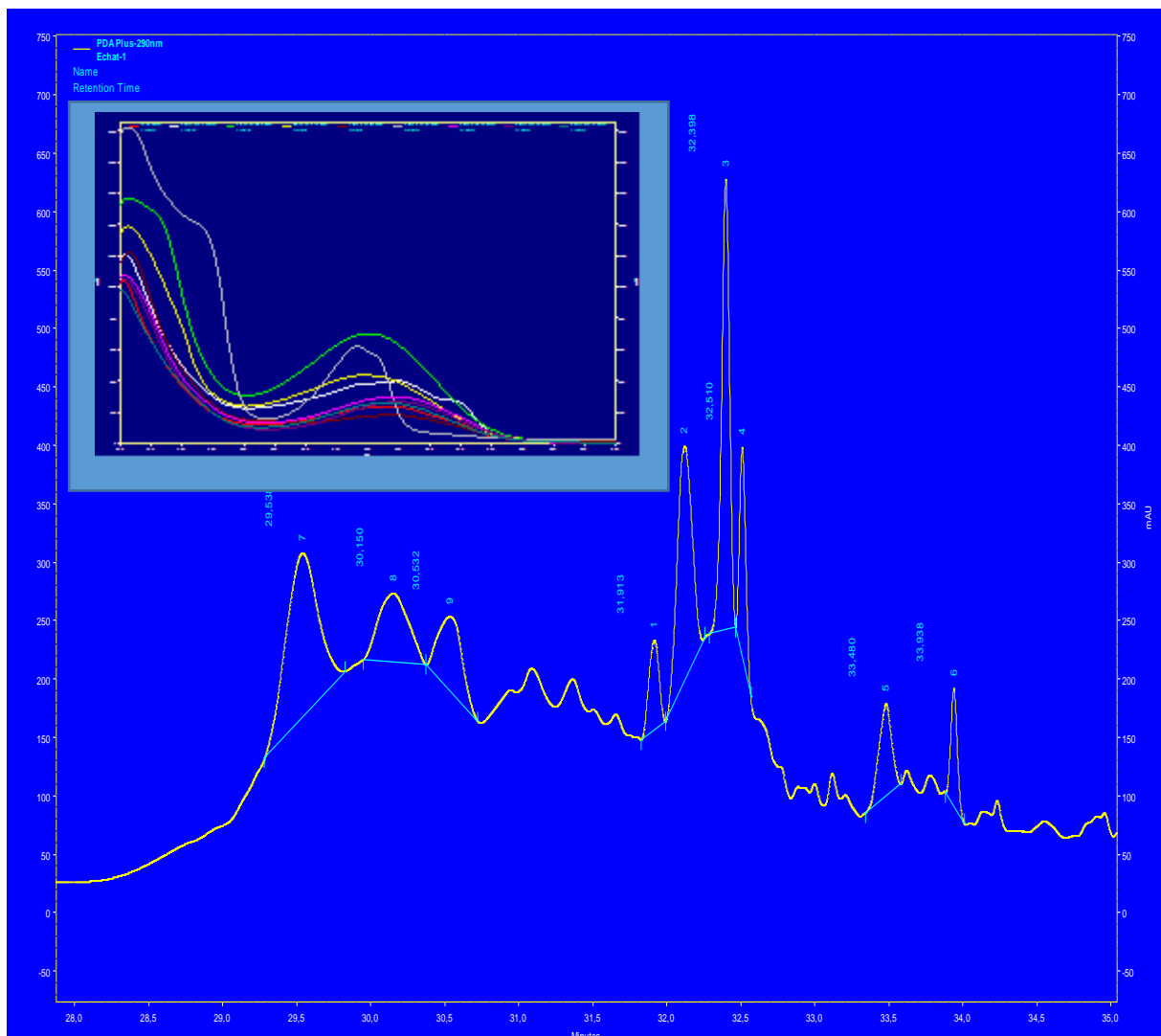


Figure 24 : Chromatogramme HPLC-UV- DAD de l'éponge C. crambe étudiée obtenue en suivant le protocole standardisé ECIMAR

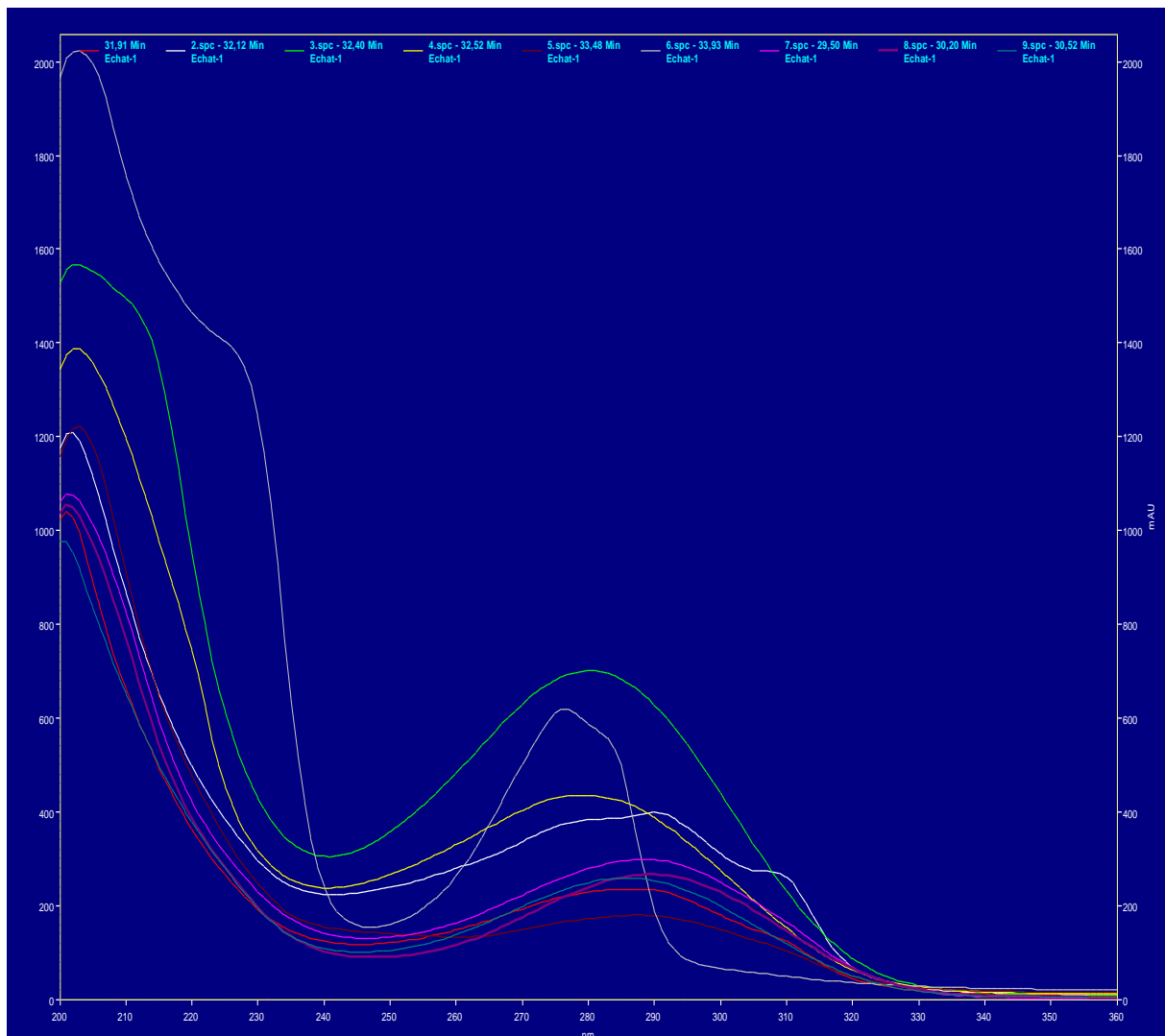


Figure 25 : les spectres d'absorbance UV des différentes molécules de l'extrait d'éponges *C. crambe* étudiée obtenue par la méthode HPLC-UV- DAD en suivant le protocole standardisé

Confirmation de l'identification des molécules en utilisant les spectres d'absorbance UV

Nous avons pu confirmer que, d'après le profil UV obtenu par HPLC-DAD (Figure 24 , 25) les métabolites majoritaires de cette éponge sont de type crambescins et crambescidins (Figure 26) , les métabolites élués entre 31 et 33 minutes présentent en effet un maximum d'absorption UV à 280 , 282 , 290 nm ce qui correspond aux valeurs décrites par (Bondu et al., 2012) , (Berlinck et al., 1992) et (Berlinck et al., 1990) pour ce type de composés (crambescidins) et les métabolites élués entre 28 et 32 minutes présentent en effet un maximum d'absorption UV à 276 , 284 , 280 , 286 , 287 , 275 nm ce qui correspond aux valeurs décrites dans la bibliographie pour ce type de composés (crambescins) (Croué, 2014) (Bondu et al., 2012) (Berlinck et al., 1992) (Becerro et al., 1997) (Braekman et al., 2000) (Jares-Erijman et al., 1993) .

L’empreinte chimique de cette éponge montre deux familles de composés sur le profil HPLC- UV -DAD) (Figure 26) :

- La famille des crambescidins éluée entre 31 et 33 minutes .
- une famille des crambescins, éluée entre 27 et 31 minutes.

En comparant avec le profil standardisé ECIMAR (annexe) , nous avons remarqué un décalage dans le temps de rétention , due à la différence de diamètre de la colonne par rapport à celle utilisée dans le protocole standardisé ECIMAR (différence d’une minute)

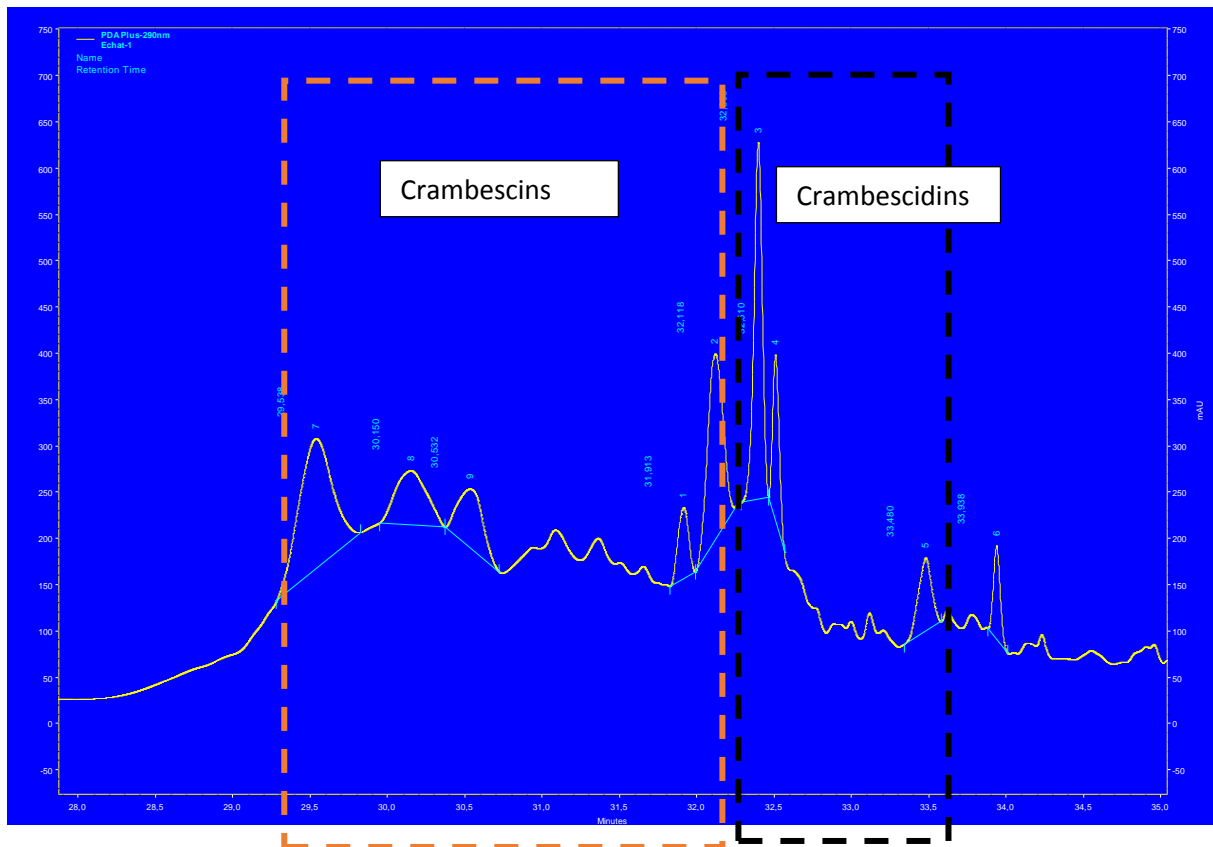
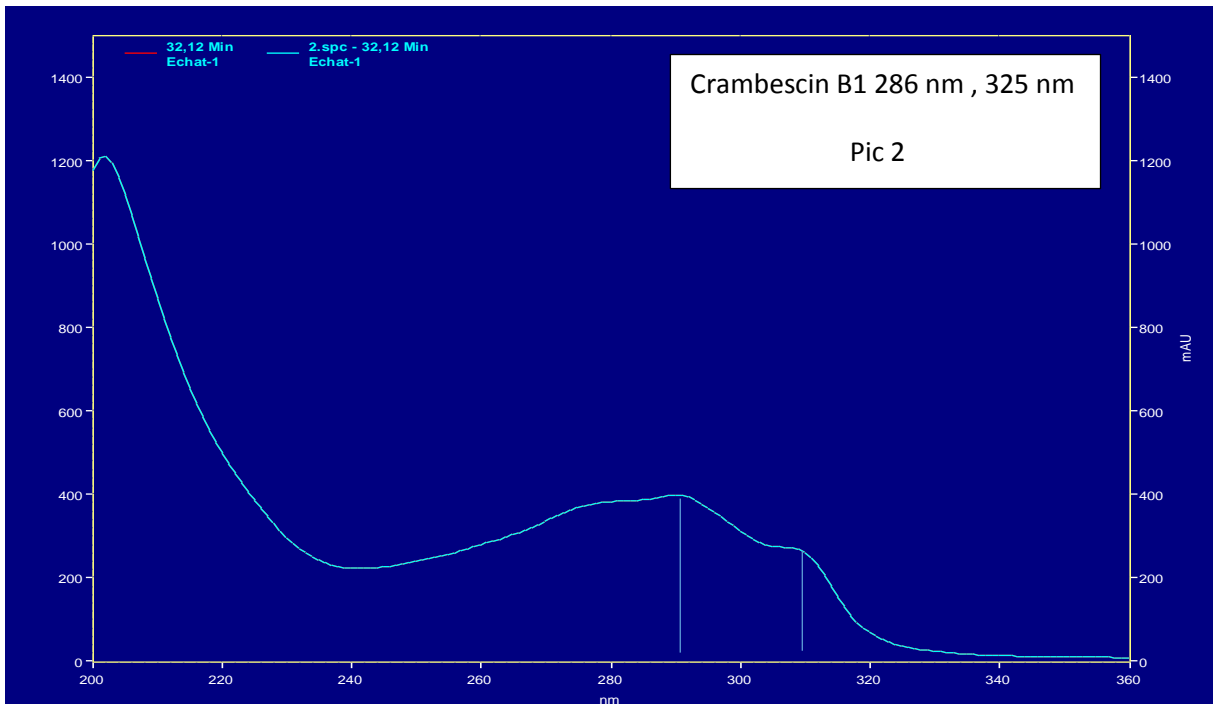
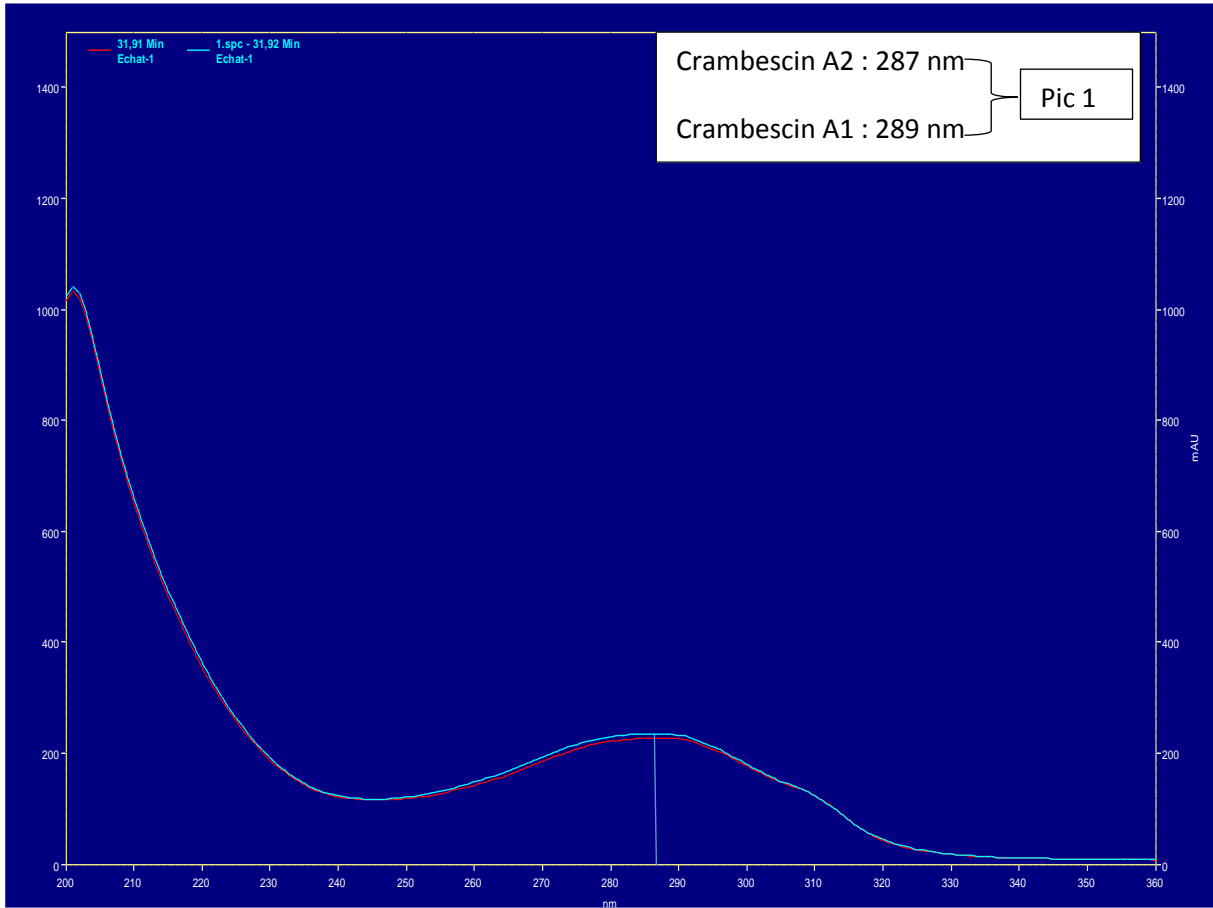
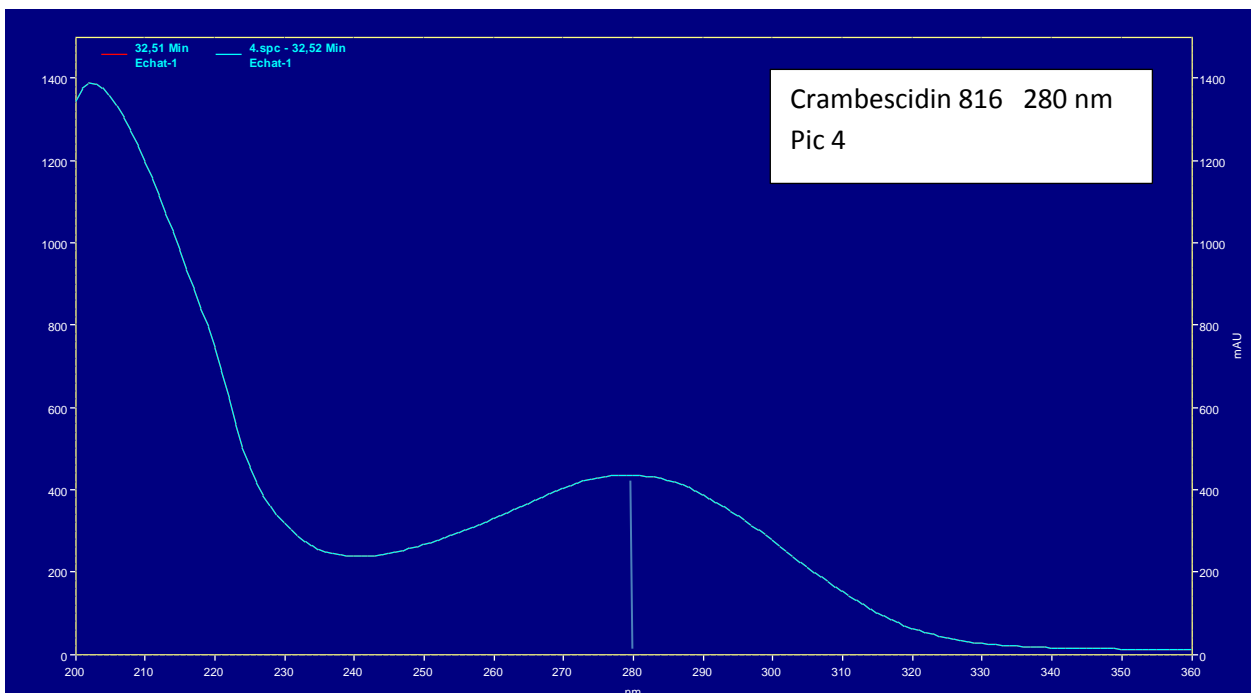
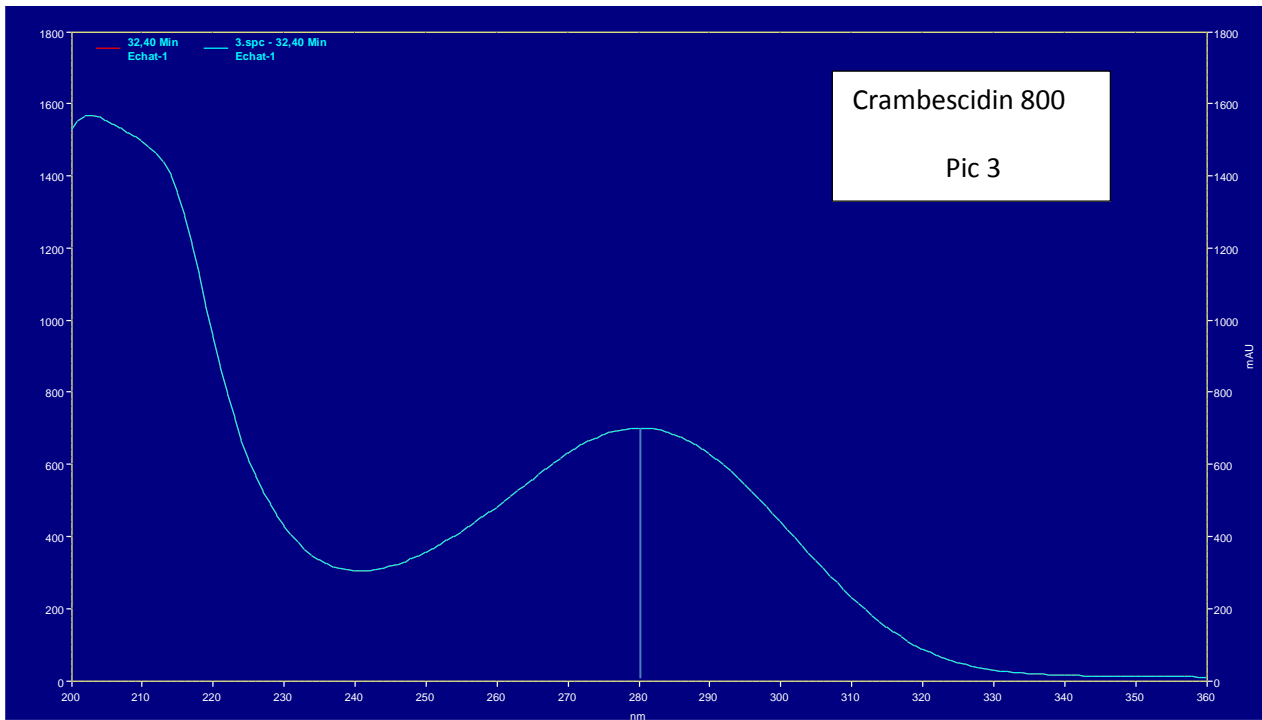
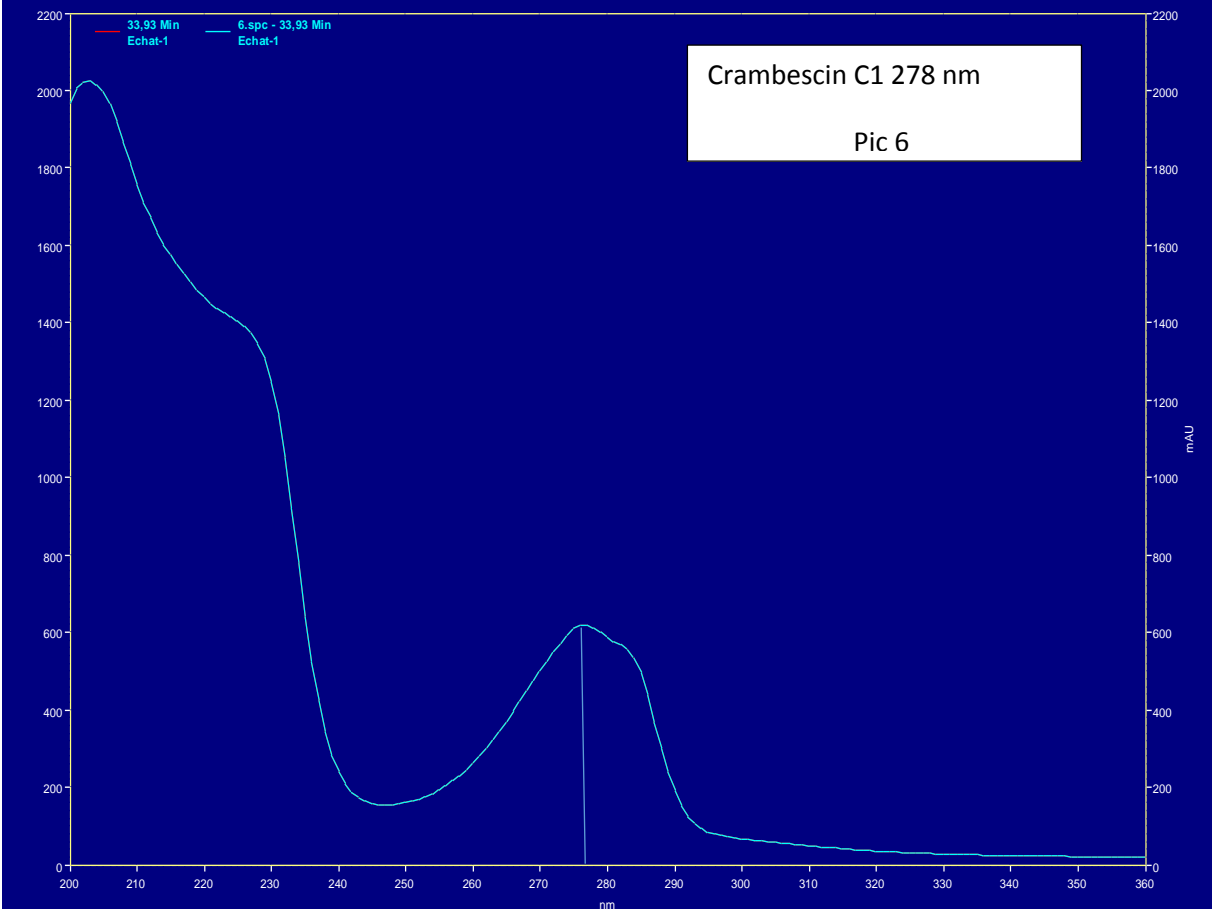
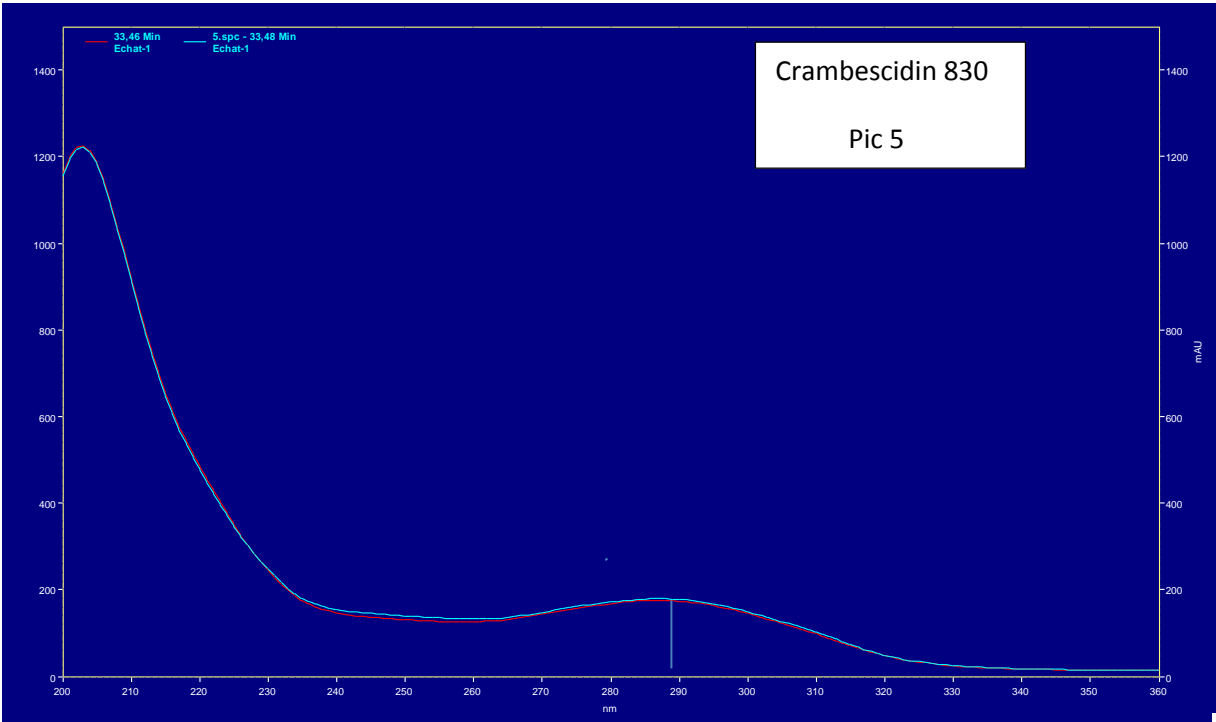


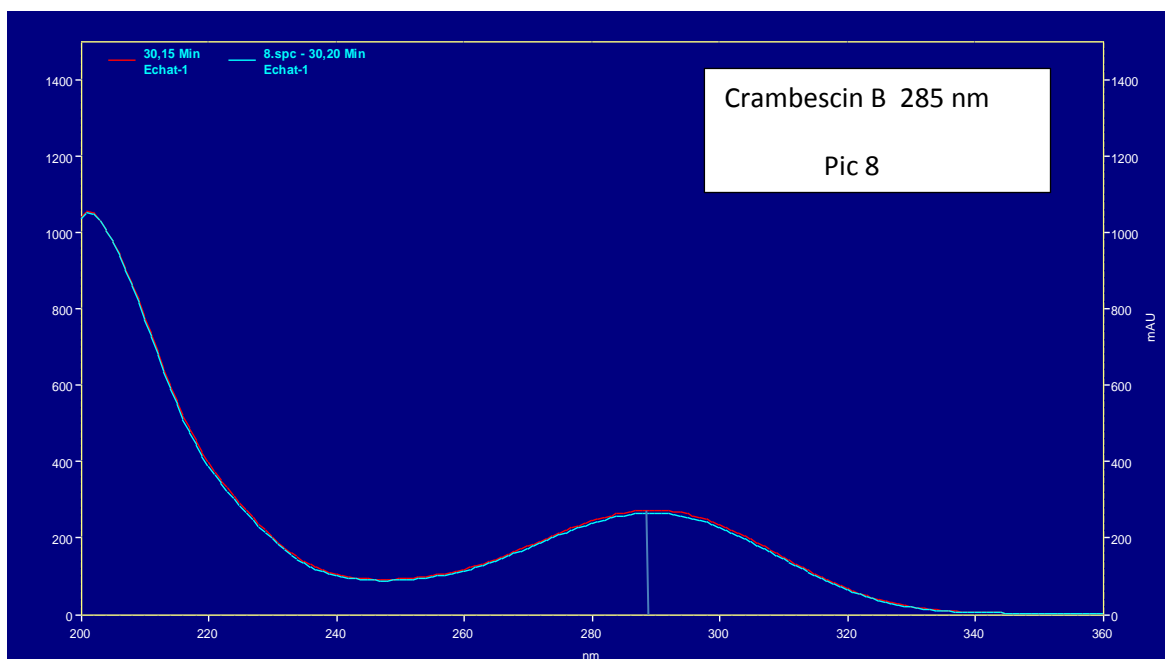
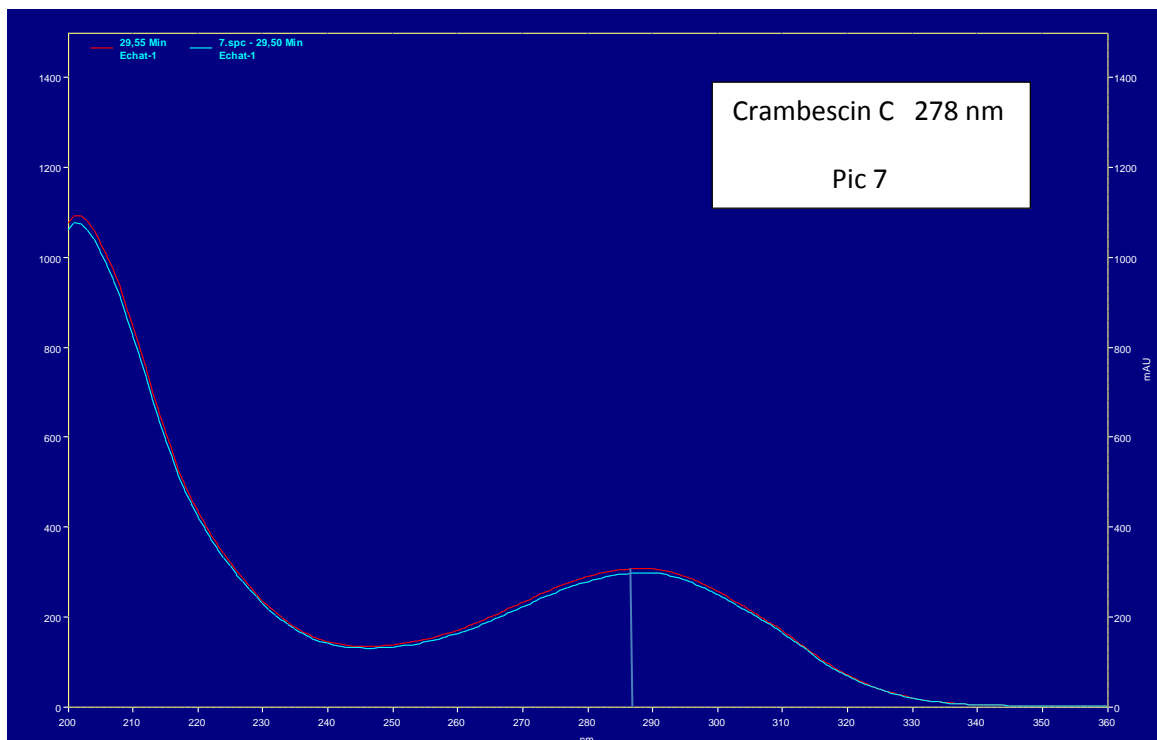
Figure 26: l'identification des deux familles des alcoïdes guanidiniques dans le chromatogramme obtenue de l'extrait étudié de l'éponge *Crambe crambe*

L'identification des molécules qui correspond aux pics obtenues a été faite selon le maximum d'absorption de chaque molécule (Figure 27)









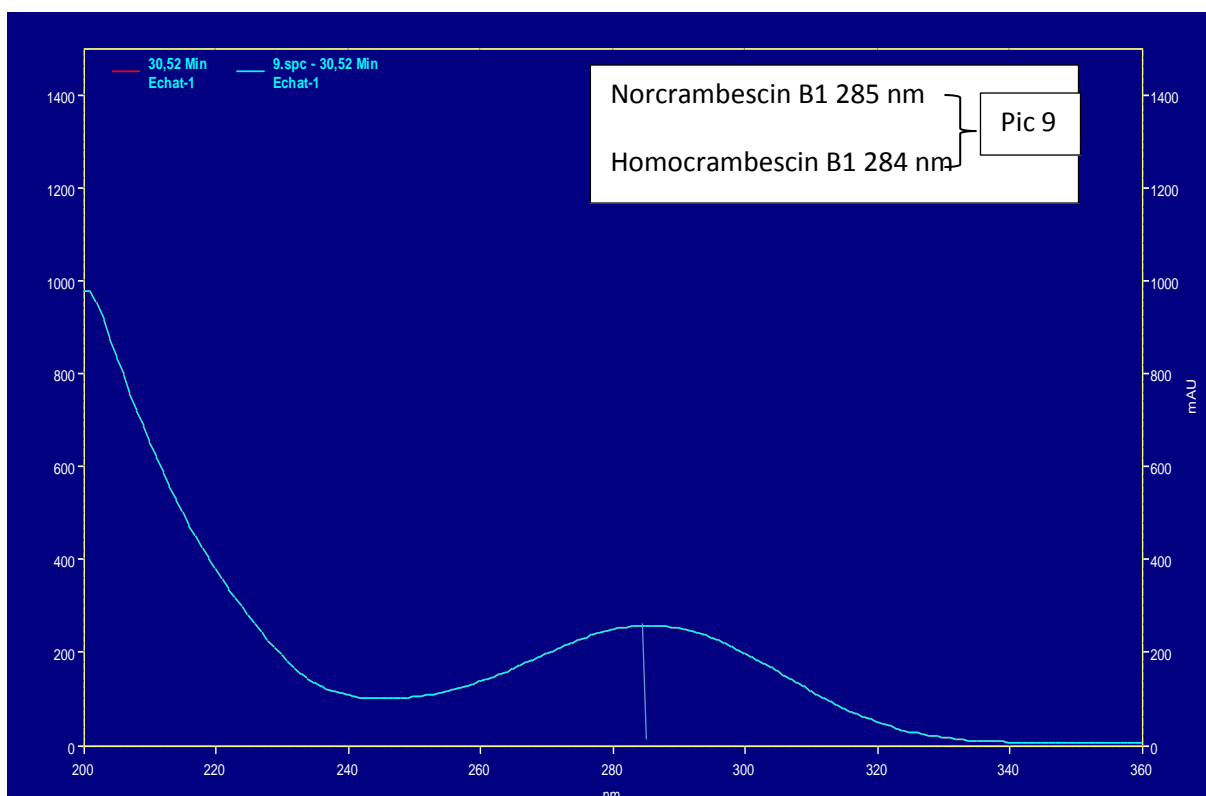


Figure 27 : Identification des molécules correspond à chaque spectre d'absorption d'éponge étudiée obtenue par la méthode HPLC-UV-DAD

On a remarqué que la signature chimique de cette espèce faite par le projet ECIMAR (annexe) est identique à celle de l'éponge étudiée donc on a pu confirmer la présence des deux familles des alcaloïdes guanidiniques (crambescidin et crambescin) et de confirmer l'identification de six molécules parmi les neuf 9 précédemment décrit par son spectre d'absorption (Figure 28) .

Et grâce au profil LC/MS,(ECIMAR) certaines molécules déjà isolées dans *Crambe crambe* ont été retrouvées et identifiées en comparaisons entre les deux chromatogramme (bibliographie et expérimentale) qui sont :

Des molécules	Crambine C2	Crambescine B	Crambine A	Crambescidine 800	Crambescidine 816	Crambescidine 830
Masse /charge (m /z)	467.4	481.5	449.4	801.7	408.4	415.4

Tableau 4 : Masse / charge de quelques molécules identifiées (Cachet, 2009)

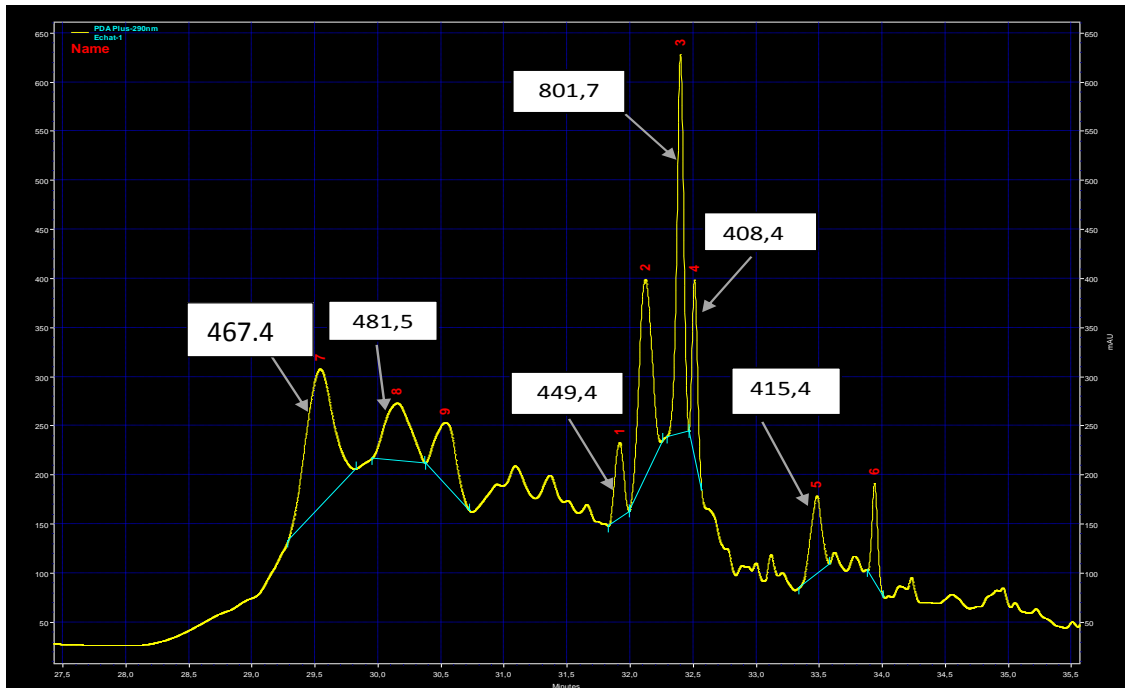


Figure 28 : Identification des molécules de l'éponges *C. crambe* étudiée obtenue en comparant avec L'empreinte chimique ECIMAR

3.Paramètres physico-chimiques mesurés in situ :

Les paramètres	ph	Température (T)	Oxygène (O)	Salinité (s)	Profondeur (P)
Les valeurs	8 .15	21.39 C°	0.56 mg /l	37.76	10m

Tableau 5 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la première plongée (Juin).

Les paramètres	ph	Température (T)	Oxygène (O)	Salinité (S)	Profondeur (P)
Les valeurs	8.51	18.5 C°	1.42 mg /l	33 .9	11 m

Tableau 6 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la deuxième plongée (Juillet).

Les paramètres	ph	Température (T)	Oxygène (O)	Salinité (S)	Profondeur (P)
Les valeurs	8.41	24 .6 C°	0.9 mg/l	35	13 m

Tableau 7 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la troisième plongée (Août).

Les paramètres	ph	Température (T)	Oxygène (O)	Salinité (S)	Profondeur (P)
Les valeurs	8.25	20.4 C°	0.88 mg/l	34.6	15 m

Tableau 8 : paramètres physico-chimiques mesurés lors de la quatrième plongée (Septembre).

L'étude des métabolites secondaires de l'éponge *Crambe crambe* a été faite uniquement au niveau qualitative pour des limites dans les protocoles chromatographiques (les étalons interne pour HPLC).

La discussion s'est basé sur la comparaison qualitatif des métabolites secondaires des specimens sauvage recolté au port El Djamila (Alger)avec les résultats des expérience faite par (**Ternon et al., 2017**) :

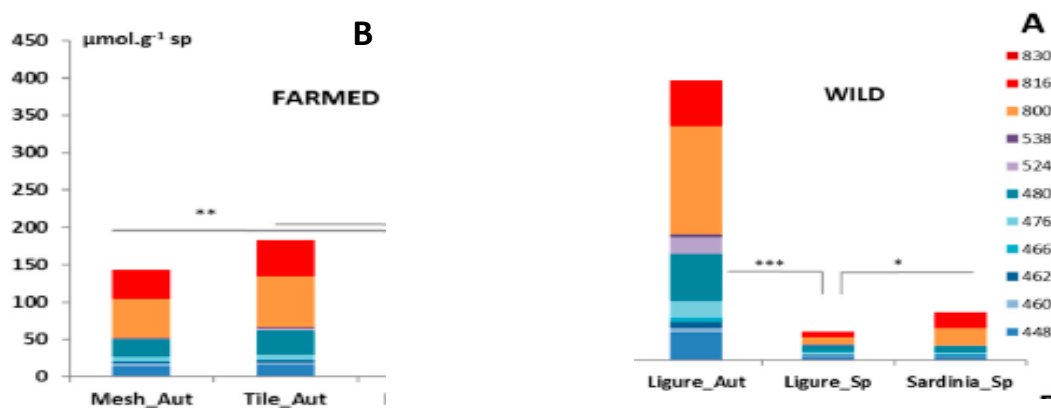
3.1 Influence de la profondeur saisonniers et géographiques sur le métabolome spécialisé de *C. crambe*

- ✓ Selon les résultats de (Ternon et al., 2017) la profondeur n'influence pas sur la composition de métabolique de l'éponge *Crambe crambe* d'un point de vue qualitative et même sur le plan quantitative elle n'a aucune influence.
- ✓ Pour les effets géographiques sur la composition métabolique non pas eu de différence qualitative remarquable entre le l'extrait de l'éponge collecté en Septembre 2017 à la plage du port el Djamila (Ain el banian , Alger) avec celle qui ont été collectés en mer Ligure en Mer de la Sardaigne ce qui confirme le résultat de (**Ternon et al., 2017**) qui ignore l'influence géographique sur le métabolites spécifique de cette éponge (Figure 29 A).
- ✓ Par rapport aux effets saisonniers , la récolte de l'éponge *C. crambe* étudiée à été faite en Septembre 2017 et les résultats obtenues sont identiques en terme qualitative aux résultats de (**Ternon et al., 2017**) (spécimens sauvages qui ont été collectés en septembre et en avril) (**Figure A**). Cela peut nous confirmer l'absence de l'influence saisonnière sur la qualité de métabolique de l'éponge *Crambe crambe* et selon (**Ternon et al., 2017**) cette influence est significative en terme quantitative (La perte d'énergie en printemps : période de reproduction)

3.2 Comparaison du contenu métabolique entre les spécimens sauvages étudié et ceux d'élevage en automne (Septembre)

La comparaison qualitative du contenu métabolique étudié (les spécimens sauvages) avec le contenu métabolique des spécimens élevé en mois de Septembre (concerne les deux méthodes de mariculture USAMA faite par (**Ternon et al., 2017**) représente dans l'annexe) n'a montré aucune différence significative dans la composition métabolique (Figure 29 B)

La culture de l'éponge *Crambe crambe* par la méthode USAMA représente une solution dans l'avenir pour la production de ces molécules (annexe) .



Mesh : Culture en maille ; **Tile** : Culture en carré ; **Aut** : Automne (Septembre) ; **Sp** : Printemps (Avril) .

Figure 29 : Comparaison entre les spécimens sauvages et les spécimens cultivés du point de vue qualitatif chez *C. Crambe* (Ternon et al., 2017).

3.3 Influence des facteurs abiotiques sur la production de crambescidins et de crambescin

La comparaison du contenu de l'extrait de l'éponge *Crambe crambe* étudiée qui a été préparée à partir de des spécimens d'éponge sauvage récolté à 20 C ° avec l'étude faite par (Ternon et al., 2017) (des spécimens d'éponge contrôlé dans des aquariums pendant un mois à 20 C ° et 14 C °) montre une différence significatif dans le contenu métabolique de l' éponge en terme qualitative (présence de plusieurs molécules de la famille des crambescidins dans l'extrait étudié et qui marque leurs absence dans les extraits des spécimens contrôlés dans les deux valeurs de température 20 C ° et 14 C °) . Cette différence est due probablement aux :

- stress lors de l'acclimatation des éponges dans les aquariums
- type du substrat de fixation de l'éponge dans le milieu naturel (Croué, 2014) .

Ces résultats confirme que la température n'a pas montré d'effets significatifs sur la qualité métabolique spécialisé de cette éponge .

les variations très limitées de PGA dans *C. crambe* placé sous différents Conditions environnementales (Ternon et al., 2017) peu expliqué la mariculture de cette éponge qui n'a pas limiter la production de PGA

Ces résultats donnent plus de faveur et d'avantage à la culture de l'éponge par la méthode USAMA .

Conclusion

Conclusion

Parmi les organismes marins, les Spongiaires constituent une source de métabolites secondaires particulièrement diversifiés, de part, leur large répartition géographique et le véritable « arsenal chimique » qu'ils développent pour survivre. Ces molécules originales sont susceptibles de présenter un intérêt thérapeutique notable, notamment dans la recherche de principes actifs contre des maladies tumorales.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes penchés sur l'espèce *Crambe crambe* pour diverses raisons: d'une part, leur présence dans les côtes algériennes et la facilité de l'identifier par les plongeurs, d'autre part, leur diversité spécifique et l'existence de nombreux métabolites secondaires au sein de cette espèce d'éponge.

Jusqu'à présent, l'éponge *Crambe crambe* n'a pas fait l'objet d'une étude chimique au terme d'extraction des métabolites secondaires (les alcaloïdes guanidiniques) dans le bassin algérien. L'objectif de notre travail a été d'apporter des informations chimiques et écologiques sur cette espèce. Cette étude a eu pour point de départ la récolte et l'identification de l'espèce *Crambe crambe*. L'extraction par CH₂Cl₂ / MeOH (1: 1) a conduit à l'isolement de neuf composés. Ces molécules ont été caractérisées et identifiées par leurs spectres d'absorption en comparaison avec les études déjà faites sur la composition chimique de cette espèce.

L'étude chimique de l'éponge *Crambe crambe* récolté au niveau du port EL Djamila (Ain Benian) a montré :

- une empreinte chimique identique à celle signalée par certains auteurs à partir d'espèces récoltés dans le banyul de France, en Sardaigne et la mer de ligure et aussi à celles du projet ECIMAR
- les effets de la profondeur, de la géographie et de la saison n'ont montré aucune différence significative en terme qualitatif des composés isolés.
- absence d'influence de la température sur la production des composés de cette éponge (crambescins et crambescidins)

Les intérêts remarquables d'utilité des alcaloïdes guanidiniques (crambescins et crambescidins) dans différents domaines de la santé humaine, encourage la recherche afin d'exploiter au mieux cette extraordinaire source riche en métabolites secondaires .

58

La mariculture de cette éponge par la méthode USAMA est une méthode alternative qui permet d'obtenir ces composés en plus grande quantité et donc, envisager une éventuelle valorisation industrielle de ces produits.

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

***Références
bibliographiques***

Références bibliographiques

AGUILAR-CAMACHO, Jose Maria et CARBALLO, Jose Luis., 2012. New and Little-Known Poecilosclerid Sponges from the Mexican Pacific Ocean. *Zoological Studies*, vol. 51, no 7: pp 1139-1153.

AHMED, Nafees, BRAHMBHATT, Keyur G., KHAN, Shabana I., *et al.*, 2013. Synthesis and Biological Evaluation of Tricyclic Guanidine Analogues of Batzelladine K for Antimalarial, Antileishmanial, Antibacterial, Antifungal, and Anti-HIV Activities. *Chemical biology & drug design*, vol. 81, no 4: pp 491-498

EL-DEMERDASH, Amr, MORIOU, Céline, MARTIN, Marie-Thérèse, *et al.*, 2016. Cytotoxic Guanidine Alkaloids from a French Polynesian Monanchora n. sp. Sponge. *Journal of natural products*, vol. 79, no 8: pp 1929-1937.

AOKI, SHUNJI, KONG, DEXIN, MATSUI, KOUHEI, *et al.*, 2004. Erythroid differentiation in K562 chronic myelogenous cells induced by crambescidin 800, a pentacyclic guanidine alkaloid. *Anticancer research*, vol. 24, no 4: pp 2325-2330.

BLUNT, John W., COPP, Brent R., MUNRO, Murray HG, *et al.*, 2005. Marine natural products. *Natural Product Reports*.

BERLINCK, Roberto Gomes de Souza, BRAEKMAN, Jean Claude, DALOZE, Désiré, *et al.*, 1990. Two new guanidine alkaloids from the mediterranean sponge *Crambe crambe*. *Tetrahedron letters*, vol. 31, no 45: pp 6531-6534.

BERLINCK, Roberto Gomes de Souza, BRAEKMAN, Jean Claude, DALOZE, Désiré, *et al.*, 1992. Crambines C1 and C2: two further ichthyotoxic guanidine alkaloids from the sponge *Crambe crambe*. *Journal of natural Products*, vol. 55, no 4: pp 528-532.

BELARBI, El Hassan, RAMÍ, M., GARCÍ, Ma Carmen Cerón, *et al.*, 2003. Cultivation of explants of the marine sponge *Crambe crambe* in closed systems. *Biomolecular engineering*, vol. 20, no 4 : pp 333-337.

BERLINCK, Roberto Gomes de Souza, BRAEKMAN, Jean Claude, DALOZE, Désiré, *et al.*, 1993. Polycyclic guanidine alkaloids from the marine sponge *Crambe crambe* and Ca⁺⁺ channel blocker activity of crambescidin 816. *Journal of natural products*, vol. 56, no 7: pp 1007-1015.

CERRANO, Carlo, TOTTI, Cecilia, SPONGA, Federica, *et al.*, 2006. Summer disease in *Parazoanthus axinellae* (Schmidt, 1862) (Cnidaria, Zoanthidea). *Italian Journal of Zoology*, vol. 73, no 4: pp 355-361.

BONDU, Stéphanie, GENTA-JOUE, Grégory, LEIROS, Marta, *et al.*, 2012. Additional bioactive guanidine alkaloids from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*. *Rsc Advances*, vol. 2, no 7: pp 2828-2835.

Références bibliographiques

- BERLINCK, Roberto GS, BURTOLOSO, Antonio Carlos B., et KOSSUGA, Miriam H., 2008. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. *Natural product reports*, vol. 25, no 5: pp 919-954.
- BURLINGAME, A. L., BOYD, Robert K., et GASKELL, Simon J., 1994. Mass spectrometry. *Analytical chemistry*, vol. 66, no 12: pp 634R-683R.
- BERTOLINO, Marco, CERRANO, Carlo, BAVESTRELLO, Giorgio, *et al.*, 2013. Diversity of Porifera in the Mediterranean coralligenous accretions, with description of a new species. *ZooKeys*, no 336: 1p.
- CLÉON, Philippe et D'ANGELI, Delphine., 2005. Le couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse. *Spectra analyse*, vol. 34, no 242: pp 13-25.
- CROUÉ, Julie., 2014. *Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe : diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques*. Thèse de doctorat. Paris 6.
- . CACHET, Nadja., 2009. *Metabolites secondaires d'invertébrés marins et biosynthèse in vivo d'alcaloïdes d'Agelas oroides*. Thèse de doctorat. Université Nice Sophia Antipolis.
- CROUÉ, Julie., 2014. *Bactéries associées à l'éponge Méditerranéenne Crambe crambe: diversité et possible rôle dans la biosynthèse des alcaloïdes guanidiniques*. Thèse de doctorat. Paris 6.
- D'ANIELLO, Filomena., 2014. Characterization of new bioactive natural products from marine sources as pharmaceutical tools and lead compounds in drug discovery processes.
- DASH, Swagatika, JIN, Cuili, LEE, On On, *et al.*, 2009. Antibacterial and antilarval-settlement potential and metabolite profiles of novel sponge-associated marine bacteria. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, vol. 36, no 8: pp 1047-1056.
- DURAN, S., PASCUAL, M., et TURON, X., 2004. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Poecilosclerida). *Marine Biology*, vol. 144, no 1: pp 31-35.
- DURAN, S., GIRIBET, G., et TURON, X., 2004. Phylogeographical history of the sponge *Crambe crambe* (Porifera, Poecilosclerida): range expansion and recent invasion of the Macaronesian islands from the Mediterranean Sea. *Molecular ecology*, vol. 13, no 1: pp 109-122.
- GANTT, Shelby E., LÓPEZ-LEGENTIL, Susanna, et ERWIN, Patrick M., 2017. Stable microbial communities in the sponge *Crambe crambe* from inside and outside a polluted Mediterranean harbor. *FEMS Microbiology Letters*: pp fnx105.
- GROS, Emmanuelle. 2013. *Isolement, identification et synthèse biomimétique de métabolites secondaires issus d'invertébrés marins de la zone sud-ouest de l'océan Indien*. Thèse de doctorat. La Réunion.

Références bibliographiques

GONZÁLEZ-GARCÍA, Sara, *et al.*, 2014. Environmental solutions for the sustainable production of bioactive natural products from the marine sponge *Crambe crambe*. *Science of the Total Environment*, vol. 475: pp 71-82.

GOMES, Nelson GM, DASARI, Ramesh, CHANDRA, Sunena, *et al.*, 2016. Marine invertebrate metabolites with anticancer activities: Solutions to the “supply problem”. *Marine drugs*, vol. 14, no 5 : 98p.

HUBER, Udo et MAJORS, R., 2007. Principles in preparative HPLC. *Agilent Technologies Inc., Germany*, vol. 2: pp 60-71.

HERTIANI, Triana., 2007. Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from Indonesian marine sponges. *Dusseldorf: Cuvillier Verlag*, vol. 344.

HOOPER, John NA et VAN SOEST, Rob WM., 2002. Systema Porifera. A guide to the classification of sponges. In: *Systema Porifera*. Springer US: pp 1-7.

HOOPER, John NA, VAN SOEST, Rob WM, *et al.*, 2004 .Systema Proifera: a guide to the classification of sponges.... The end of a beginning. *Bolletino di Museo e Istituto di Biologia dell'Universita di Genova*, vol: 68p.

HU, Yiwen, CHEN, Jiahui, HU, Guping, *et al.*, 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine drugs*, vol. 13, no 1: pp 202-221.

ISHII, Takahiro, OKINO, Tatsufumi, MINO, Yosuke, *et al.*, 2007. Plant-growth regulators from common starfish (*Asterias amurensis* Lütken) waste. *Plant growth regulation*, vol. 52, no 2: pp 131-139.

JARES-ERIJMAN, Elizabeth A., INGRUM, April L., CARNEY, John R., *et al.* ,1993. Polycyclic guanidine-containing compounds from the Mediterranean sponge *Crambe crambe*: the structure of 13, 14, 15-isocrambescidin 800 and the absolute stereochemistry of the pentacyclic guanidine moieties of the crambescidins. *Journal of organic chemistry*, vol. 58, no 18: pp 4805-4808.

JARES-ERIJMAN, Elizabeth A., SAKAI, Ryuichi, et RINEHART, Kenneth L., 1991. Crambescidins: new antiviral and cytotoxic compounds from the sponge *Crambe crambe*. *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 56, no 19: pp 5712-5715.

KONU KLUGİL, Belma et GÖZCELİOĞLU, Bülent., 2015. Antimicrobial Activity of Marine Samples Collected From The Different Coasts of Turkey. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 12, no 3.

KABRAN, Guy Roger, MAMYRBEKOVA-BEKRO, Janat Akhanovna, PIRAT, Jean-Luc, *et al.*, 2014. Identification de composés phénoliques extraits de deux plantes de la pharmacopée ivoirienne*/Identification of phenolic compounds from two plants of ivoirian pharmacopeia. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, vol. 38 :57 p.

Références bibliographiques

- MEHBUB, Mohammad Ferdous, LEI, Jie, FRANCO, Christopher, *et al.*, 2014. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine drugs*, vol. 12, no 8: pp 4539-4577.
- LEVI, Claude., 1963. (1) POECILOSCLERIDES. *Transactions of the Royal Society of South Africa*, vol. 37, no 1: pp 1-72.
- MOREAU, Dimitri. ,2006. *Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques*. Thèse de doctorat. Université de Nantes.
- MUNOZ, Julie., 2011. *Extraction de l'éponge marine Axinella donnani et synthèse d'une chimiothèque d'analogues du dispacamide A*. Thèse de doctorat. Université Paris Sud-Paris XI.
- MESHARAM, Anju, KUMAR, Ajai, et SRIVASTAVA, Nidhi.,2015. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of alkaloids isolated from *Epipremnum aureum* (Linden and Andre) Bunting. *Int J Pharma Sci Res*, vol. 6, no 2 : pp 337-342.
- ÖZTÜRK, Başak, DE JAEGER, Lenny, SMIDT, Hauke, *et al.* ,2013. Culture-dependent and independent approaches for identifying novel halogenases encoded by *Crambe crambe* (marine sponge) microbiota. *Scientific reports*: 3p.
- PÉREZ-LÓPEZ, Paula, TERNON, Eva OTTINGER, Sabine, KLÖPPEL, Anne, RAUSCH, Vanessa, *et al.*,2012. Targeting of pancreatic and prostate cancer stem cell characteristics by *Crambe crambe* marine sponge extract. *International journal of cancer*, vol. 130, no 7 : pp 1671-1681.
- PALAGIANO, Elio, DE MARINO, Simona, MINALE, Luigi, *et al.*,1995. Ptilomycalin A, crambescidin 800 and related new highly cytotoxic guanidine alkaloids from the starfishes *Fromia monilis* and *Celerina heffermani*. *Tetrahedron*, vol. 51, no 12: pp 3675-3682.
- REVEILLAUD, Julie, VAN SOEST, Rob, DERYCKE, Sofie, *et al.*,2011. Phylogenetic relationships among NE Atlantic Plocamionida Topsent (1927) (Porifera, Poecilosclerida): underestimated diversity in reef ecosystems. *PLoS One*, vol. 6, no 2: pp e16533.
- REVEILLAUD, Julie, VAN SOEST, Rob, DERYCKE, Sofie, *et al.*, 2011 .Phylogenetic Relationships among NE Atlantic Plocamionida Topsent (1927) (Porifera, Poecilosclerida): Under-Estimated Diversity in Reef Ecosystems.
- RUBIOLO, J. A., LÓPEZ-ALONSO, H., ROEL, M., *et al.* ,2014. Mechanism of cytotoxic action of crambescidin-816 on human liver-derived tumour cells. *British journal of pharmacology*, vol. 171, no 7: pp 1655-1667.
- ROEL, María, RUBIOLO, Juan A., TERNON, Eva, *et al.* ,2015. Crambescin C1 Exerts a Cytoprotective Effect on HepG2 Cells through Metallothionein Induction. *Marine drugs*, vol. 13, no 8: pp 4633-4653.

Références bibliographiques

SFECCI, Estelle, LACOUR, Thierry, AMADE, Philippe, *et al.*, 2016. Polycyclic Guanidine Alkaloids from Poecilosclerida Marine Sponges. *Marine drugs*, vol. 14, no 4: 77p.

SEGHIRI Ramdane. Recherche et Détermination Structurale des Métabolites Secondaires du Genre *Centaurea* : *C. africana*, *C. nicaensis*, Doctorat d'Etat En Chimie Organique - Option Phytochimie .Université Mentouri - Constantine FACULTE DES SCIENCES EXACTES DEPARTEMENT DE CHIMIE.

SUAU, R., CABEZUDO, B., RICO, R., *et al.*, 2002. Direct determination of alkaloid contents in *Fumaria* species by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, vol. 13, no 6: pp 363-367.

SATYAVANI, K., GURUDEEBAN, S., RAMANATHAN, T., *et al.*, 2014. Radical scavenging effect and GCMS identification of alkaloid fractions from *Excoecaria agallocha* L. *Inventi Rapid: Ethnopharmacol*, vol. 1: pp 1-4.

TRUCHOT, Eric, GERTZ, Christian, KLOSTERMANN, S., *et al.*, 2003. Détection et dosage des résidus de pesticides dans les matières grasses. *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, vol. 10, no 4 : pp 304-305

TERNON, Eva, ZARATE, Lina, CHENESSEAU, Sandrine, *et al.*, 2016. Spherulization as a process for the exudation of chemical cues by the encrusting sponge *C. crambe*. *Scientific reports*, vol. 6.

TERNON, Eva, PERINO, Erica, MANCONI, Renata, *et al.*, 2017. How Environmental Factors Affect the Production of Guanidine Alkaloids by the Mediterranean Sponge *Crambe crambe*. *Marine Drugs*, vol. 15, no 6: 181p.

THOMS, Carsten, SCHUPP, Peter J., CUSTÓDIO, M. R., *et al.*, 2007. Chemical defense strategies in sponges: a review. *Porifera research: biodiversity, Innovation and sustainability*, vol. 28: pp 627-637

TRIBALAT, Marie-Aude., 2016. *Métabolismes spécialisés d'éponges méditerranéennes du genre Haliclona Grant, 1836*. Thèse de doctorat. Université Côte d'Azur.

Université Mohammed V-Agdal / FSR/ Master de sciences analytiques/ M9/ cours de Spectroscopie Ultraviolette/ F. GUEDIRA

Université Mohammed V-Agdal/Faculté des Sciences/SMC5/SPECTROSCOPIE / TABLES IR

URIZ, María J., TURON, Xavier, et BECERRO, Mikel A., 2000. Silica deposition in Demosponges: spiculogenesis in *Crambe*. *Cell and tissue research*, vol. 301, no 2: pp 299-309.

Annexe

Annexe 1

	Termes scientifiques	Descriptif
Embranchement	Porifera	Organismes exclusivement aquatiques, filtreurs, fixés au substrat, de formes variables, et percés d'orifices inhalant (ostioles ou pores) et exhalant (oscules).
Classe	Demospongiae	Éponges dont la charpente est constituée de spicules siliceux (différenciés en méga- et microsclères) et de collagène dispersé ou structuré en fibres de spongine. Ovipares ou vivipares, larve typique = parenchymula. (Hartman, 1982) Les spicules sont monaxoniques (monactine ou diactine) ou tétraxoniques (tétractine), jamais triaxone (hexactine). Le filament axial est incorporé dans une cavité triangulaire ou hexagonale. Dans la plupart des cas, le squelette spiculaire et le squelette fibreux forment un renforcement combiné. Les éléments cellulaires sont discrètes, jamais syncytiales. Le système aquifère est du type rhagon- (leucon-). Les chambres de choanocytes peuvent être eurypylous, diplodal ou aphodal (ergquist, 1978) ; (Hooper et Wiedenmayer, 1994)
Ordre	Poecilosclerida	« Éponges à spicules variés ». Charpente de spicules siliceux (styles ou acanthostyles) renforcée de spongine. Plusieurs types de mégasclères et de microsclères (chèles, sigmas...). avec microsclères composés de chelae tridentée ou polydentée (chela arcuée, Myxilla incrustans chSEM); Les mégasclères éctosomaux sont diacétaux, bien que les terminaisons aniso se produisent généralement. Les mégasclères choanosomiques sont des styles.
Sous-ordre	Myxillina	megasclères différenciés dans les types choanosomique et ectosomique; Acanthostyles échinants spéciaux normalement présents; chelae sont tridentate (arcuate ou anchorate) isochelae; Sigmas normalement présents; pas de toxines. (Hajdu et al., 1994) (van Soest, 2002) (Hooper, 1994)
Famille	Crambeidae	Les clé d'identification de la famille sont les suivants : ancorate chelae, subtylostyles ectosomales et tylostyles chaosomiques, arrangement de plumose Remarques: Actuellement, 5 genres sont considérés comme appartenant à cette famille. Le genre Crambe est commun dans la Méditerranée. Van (Soest, 2002)
Genre	Crambe	

Espèce	crambe	<p>Éponge la plus connue des plongeurs méditerranéens, elle est d'un beau rouge orangé et se caractérise par une surface luisante et douce parcourue de canaux aboutissant à des oscules bien visibles. Elle recouvre d'une mince couche (0,5 cm) ou masses plus épaisses (jusqu'à 1,5 cm), lisses ou avec des tubercules ou des projections verticales. Surface avec nettement veines gonflées dans la vie légèrement hype ou conulose.</p> <p>Latéral</p> <p>la taille peut être considérable, jusqu'à 0,5 m² (Becerro et al., 1994.) les roches et substrats abrités de la lumière directe en pouvant atteindre une surface 1m². Il faut faire attention à ne pas la confondre avec sa cousine <i>Spirastrella cunctatrix</i> qui est d'une couleur semblable mais dont la surface est d'un aspect rugueux avec des canaux exhalants nettement plus visibles</p> <p>megascières ectosomaux se fanent et de nombreuses spicules simples se produisent tangentiellement.</p> <p>Dans les faisceaux choanosomes de megascières (jusqu'à 10 ou plus en coupe transversale) se lèvent à partir d'une plaque de spongion basale, occasionnellement</p> <p>les megascières simples sont en position droite. Le spongine de liaison est variables et faisceaux peuvent être lâches et irrégulières, 50-130µm en diamètre.</p> <p>À la base, les schémas pseudostros particuliers peuvent être présents, mais ceux-ci sont rares et souvent absents dans les spécimens.</p> <p>également Chelae peut être présente, rare ou absente. Le sable et d'autres matériaux sont souvent incorporé dans les parties basales. Spicules :</p> <p>les styles des faisceaux périphériques</p> <p>lisse, droite, légèrement rétrécie sous la tête, parfois clairement subtylostylote, (Rützler, 1965)</p> <p>styles de la base du éponge plus longue et plus épaisse que celle du périphérique paquets, droites, lisses, principalement légèrement gonflées subterritellement, (Rützler, 1965)</p> <p>Un guife rate Anchorate Chelae, souvent avec Dents raccourcies réduites astrose spicules desmoïdes avec un nombre variable de rayons</p> <p>avec extrémités boutonnées arrondies et de longueur inégale</p> <p>Distribution et l'écologie. Méditerranée, côte atlantique du Portugal, Canaries Îles; encroutant sur les roches verticales et les plafonds des grottes, sur les coquilles et tubes calcaires et algues corallines; eau peu profonde jusqu'à 367 m de profondeur.</p>
--------	--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

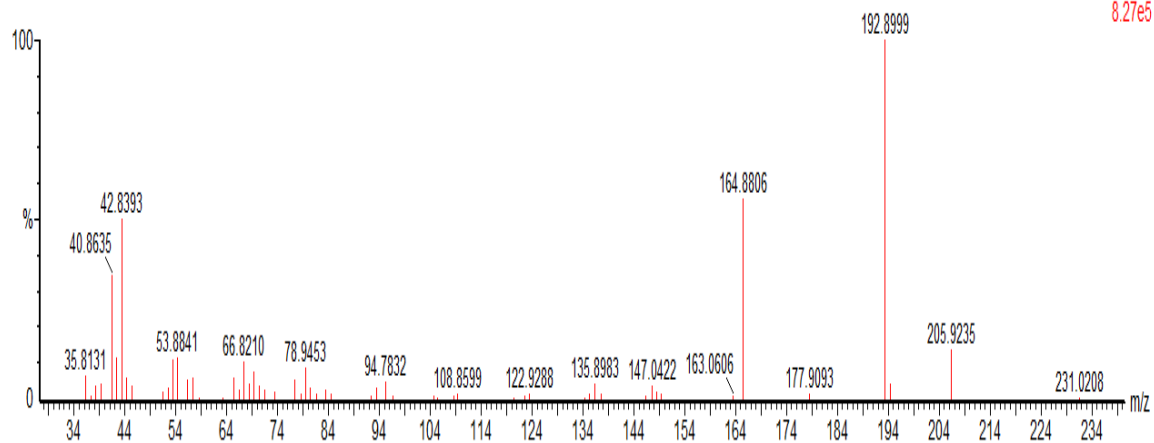
		Remarques. L'espèce de type C. crambe est atypique dans le genre pour ses desmas Astroclone mal développés. La variabilité en présence de spicules et la forme dans cette espèce est remarquable
--	--	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Des informations supplémentaires qui peuvent aider à identifier sont les éléments suivants:

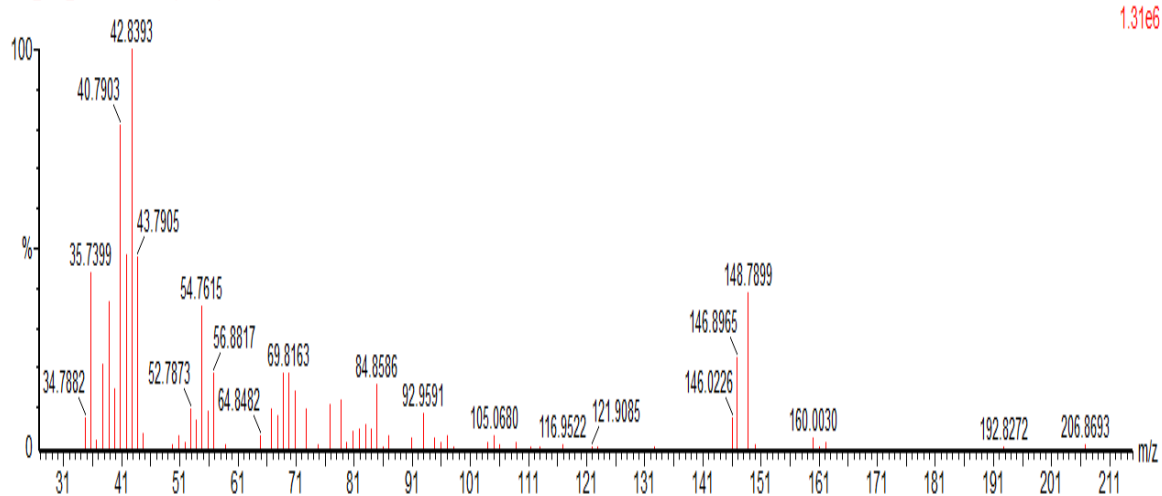
- forme de l'éponge
- caractéristiques de la surface (à la fois dans le domaine et en condition conservée)
- caractéristiques de la surface
- Y a-t-il une production de boue
- taille et forme osculeuses
- taille globale de l'éponge
- consistance (pression sur l'éponge)
- l'éponge émet-elle des fluides colorés lorsqu'ils sont comprimés
- Couleur
- odeur
- caractéristiques de l'habitat
- occurrence de profonde Ceux-ci sont nécessaires pour étudier la structure squelettique d'une éponge. Dans le cas des éponges sans spicules, ils sont le seul moyen de reconnaissance microscopique. : (Rob van Soest, 2002)

Annexe 2

PGA_from_CCrambe2 2790 (19.954) Cm (2790-(2853+2753))

Scan EI+
8.27e5

PGA_from_CCrambe2 3526 (23.635)

Scan EI+
1.31e6

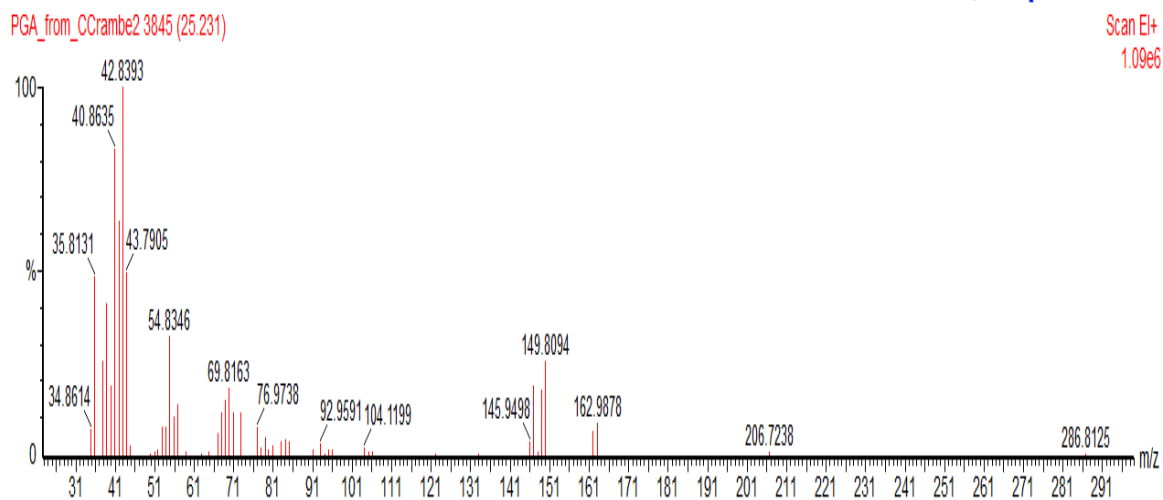


Figure : Masse moléculaires des différentes molécules détectées par GC/MS

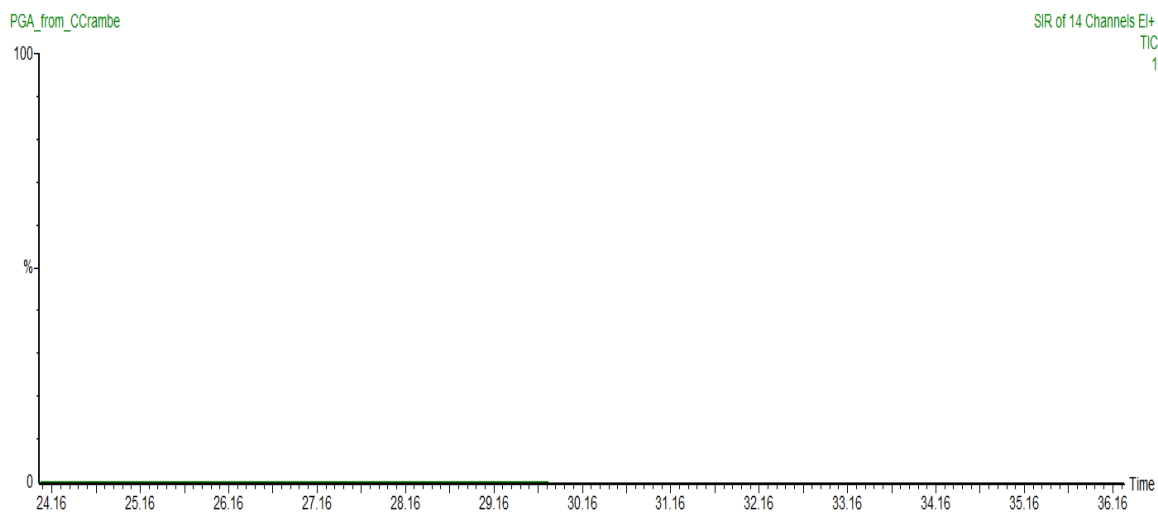


Figure : Chromatogramme présente l'absence des PGA détecté par la GC/MS

Première approche d'analyse d'un spectre IR

Un groupe carbonyle est-il présent ?

Les groupes **C=O** donnent une absorption intense dans la région **1820-1600 cm^{-1}** . La bande est souvent la plus **intense** du spectre. Sa largeur est moyenne. **Vous ne pouvez pas la rater.**

a - Si un groupe C=O est présent :

1 - ACIDES (COOH) : si OH est aussi présent. La bande OH est **très large 3400-2400 cm^{-1}** (elle recouvre les C-H).

2 - AMIDES (O=C-NHR) monosubstituée sur l'azote ou (O=C-NH₂) non substituée sur l'azote : vérifiez qu'il y a une ou 2 bandes N-H dans la zone **3500 cm^{-1} (intensité moyenne à forte)**.


3 - ESTERS (O=C-O-R) : vérifiez la présence C-O (absorption **intense vers 1000 à 1300 cm^{-1}**).

4 - ANHYDRIDES (O=C-O-C=O) : si 2 absorptions C=O vers **1760 et 1810 cm^{-1}** .

5 - ALDÉHYDES (O=C-H) : vérifiez la présence C-H aldéhyde : 2 bandes d'**intensité moyenne vers 2750 et 2850 cm^{-1}** .

6 - CÉTONES (O=C-R) : si les 5 choix précédents sont éliminés.

b - Si un groupe C=O est absent :

1 - ALCOOLS (-C-OH) et PHÉNOLS () : recherchez bande O-H large dans la zone **3300-3600 cm^{-1}** ; confirmé par la présence d'une bande C-O entre **1000 et 1300 cm^{-1}** .

2 - AMINES primaires (RNH₂) et secondaires (RNHR') : vérifiez l'absorption N-H (**intensité moyenne**) vers **3500 cm^{-1}** .

3 - ETHERS (C-O-C) : recherchez la **présence** de la bande C-O (et l'**absence** O-H) vers **1000 à 1300 cm^{-1}** .

4 - Double liaison et (ou) noyau aromatique

ALCÈNE : absorption **assez faible** vers 1650 cm^{-1} . On confirme l'existence $\text{C}=\text{C}$ en consultant la région des $\text{C}-\text{H}$ au delà de 3000 cm^{-1} .

AROMATIQUE : absorptions d'**intensité moyenne à forte** dans la région 1450 à 1650 cm^{-1} . On confirme l'existence $\text{C}=\text{C}$ en consultant la région des $\text{C}-\text{H}$ au delà de 3000 cm^{-1} .

5 - Triple liaison

NITRILES ($\text{C}\equiv\text{N}$) : absorption d'intensité moyenne, pic **très fin** vers 2250 cm^{-1} .

ALCYNES ($-\text{C}\equiv\text{C}-$) : absorption **fine d'intensité faible** vers 2150 cm^{-1} . Pour alcynes vraies, recherchez aussi si $\text{C}-\text{H}$ est présent vers 3300 cm^{-1} : bande **assez intense** et **assez fine**.

6 - Fonction "NITRO" : NO_2 présente 2 bandes **fortes** vers 1500 à 1600 cm^{-1} et 1300 à 1390 cm^{-1} .

7 - Hydrocarbures saturés

Si aucune des informations ci-dessus n'a été observée.

Si les absorptions principales sont situées dans la région des $\text{C}-\text{H}$ en dessous de 3000 cm^{-1} .

Si le **spectre est très simple**, seulement des absorptions vers 1450 , 1375 et peut-être 720 cm^{-1} .

Annexe 4

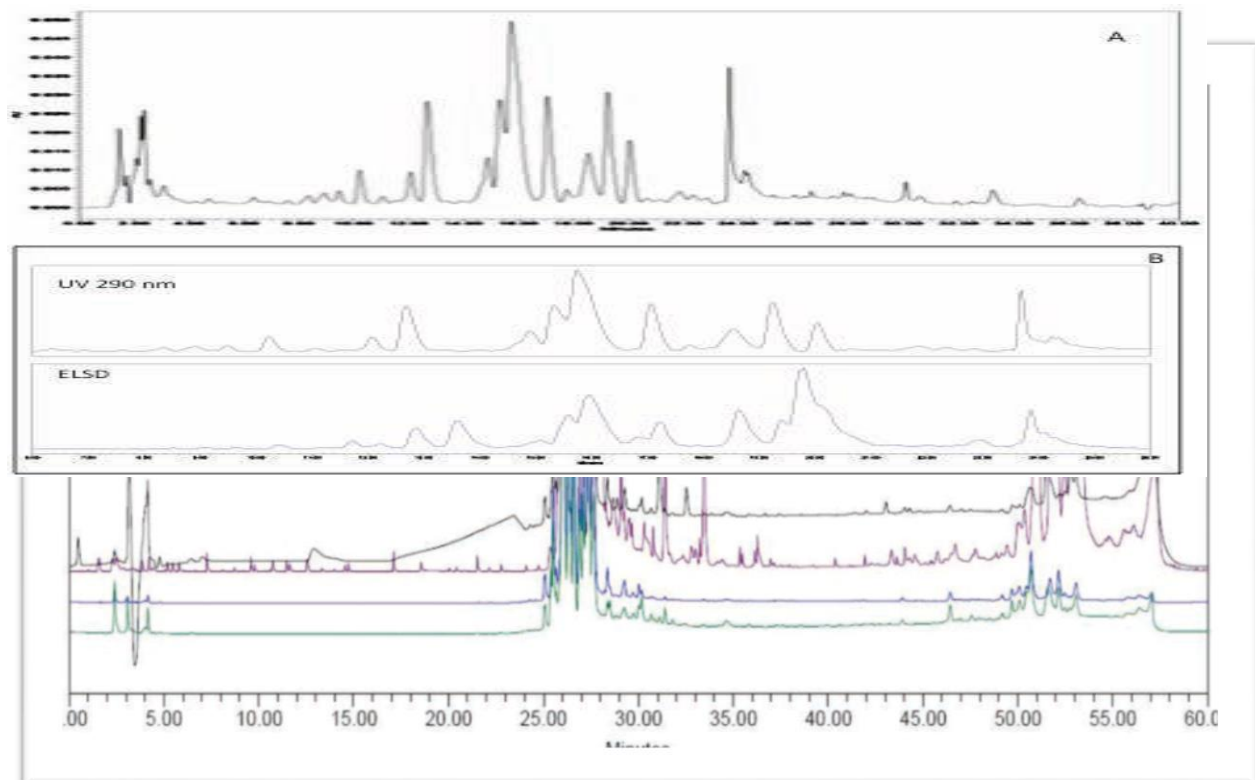
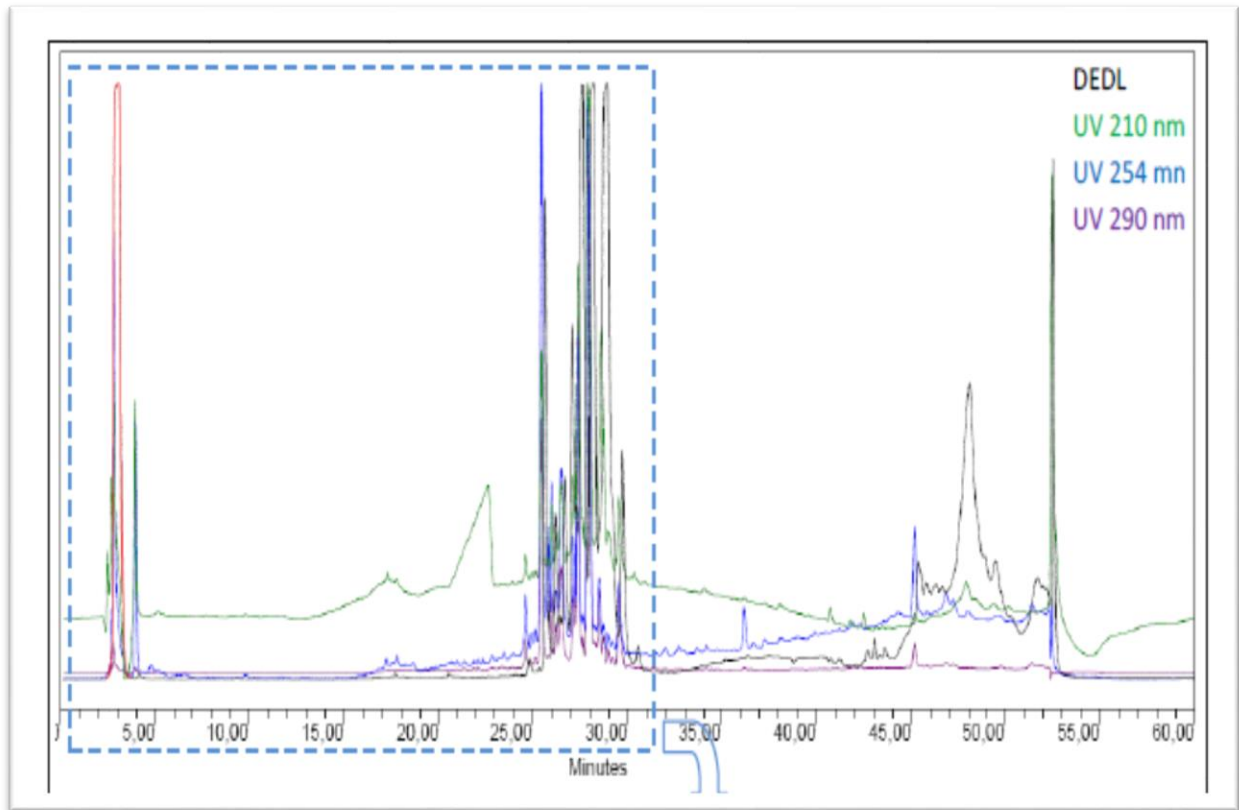
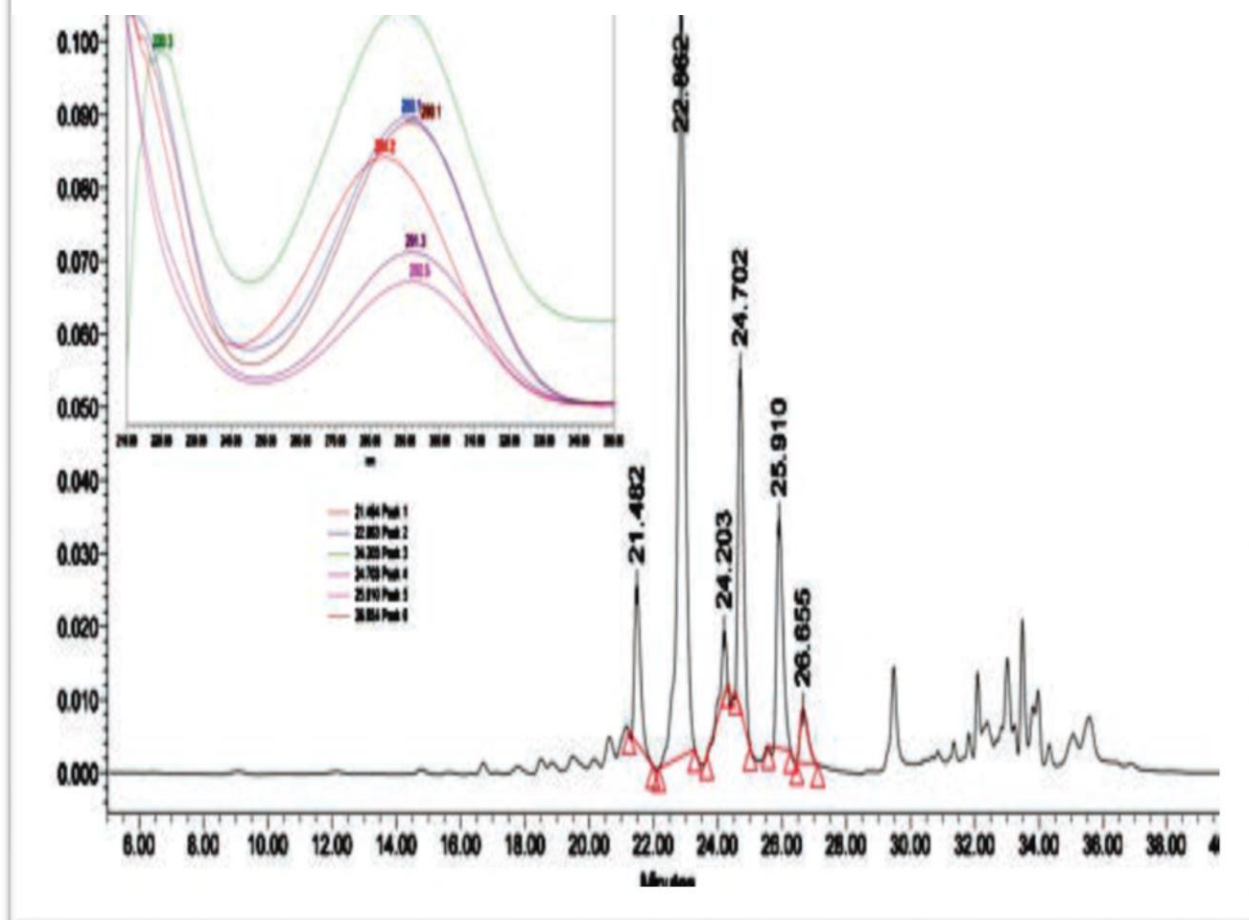


Figure : L’empreinte chimique des éponges C. crambe enregistré selon le protocole standardisé ECIMAR (Cachet, 2009) (Croué, 2014)



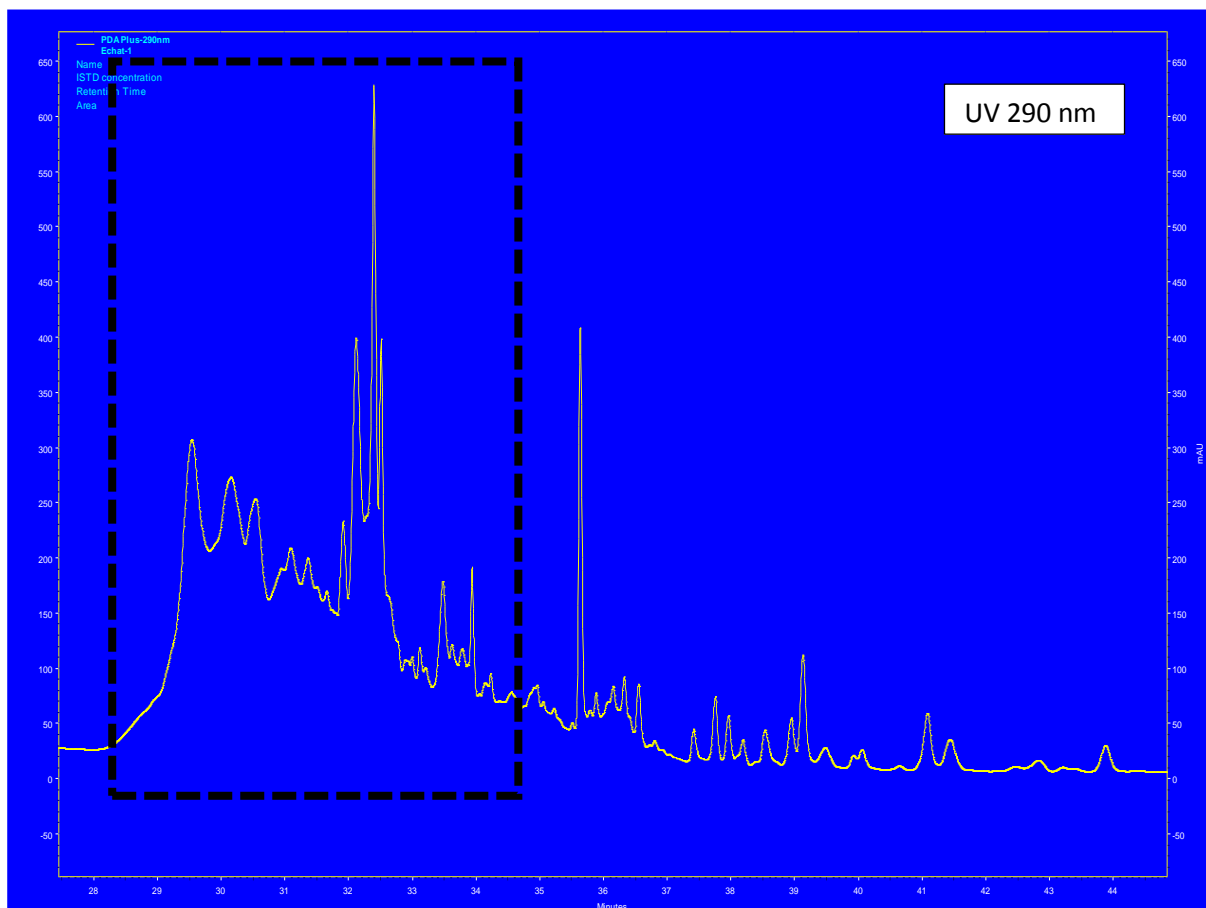


Figure : L’empreinte chimique de l’extrait brut d’éponges *C. crambe* étudiée obtenue selon le protocole standardisé ECIMAR

Annexe 5

La mariculture de *C. crambe* a été réalisée selon la méthodologie USAMA (utilisation de différentes appareils modulaires) :

- Des bras d'acier inoxydable, composée de 1,5 * 1,5 m² de modules qui peuvent être combinés de différentes manières (A, B). Plusieurs pivots sont utilisés pour régler la distance des cordes avec les explants de l'éponges (colliers) .
- Une installation modulaire en PVC, faite par des formes rectangulaires ou carrées (Matériaux supplémentaires (C, D) ancré par des cordes aux structures. Des pivots sont insérés pour ancrer les colliers d'éponge.

Les explants de l' éponge ont été assemblés dans les «colliers» :

- ✓ la méthode des carreaux de travertin, composé de 10 * 10 cm ancrés aux cordes et la corde forée dans le coin de la roche comprimés . Les explants éponge ont été collés sur chaque carreau en utilisant un bi-composant sous-marin non toxique (Figure supplémentaire sur les matériaux E);
- ✓ la méthode de maille en nylon, faite d'un filet de type posh avec des mailles de 2 cm fixées aux cordes. Les explants d'éponge étaient enfermées dans les mailles (F) (Ternon *et al.*, 2017).

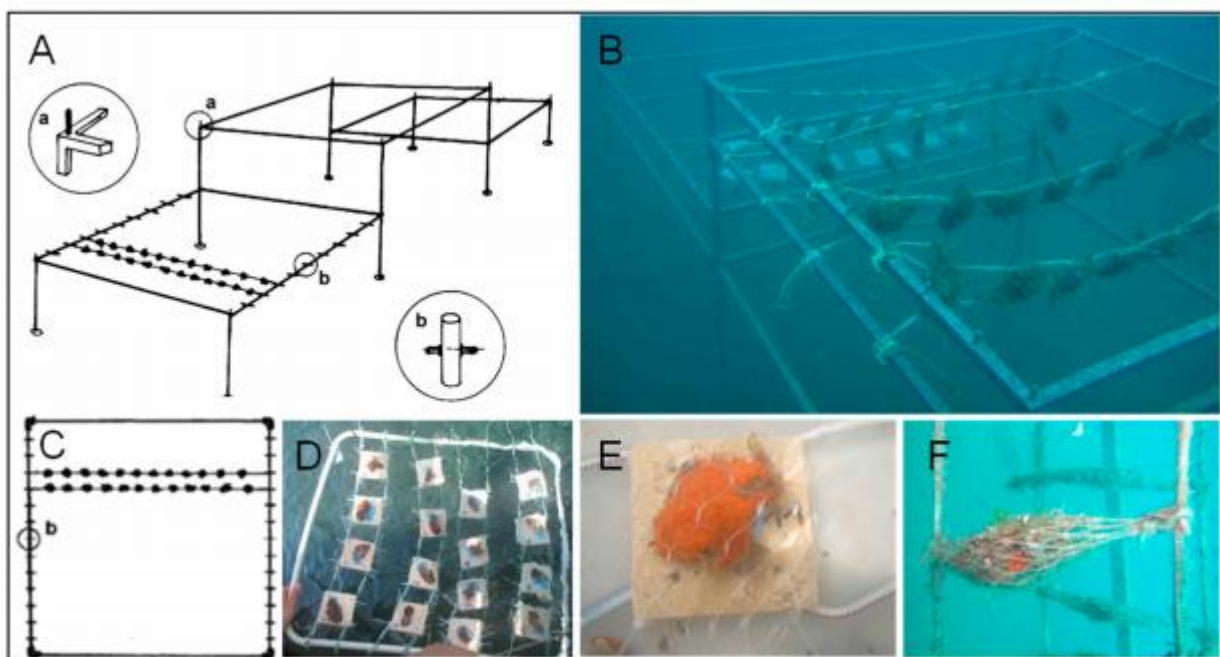


Figure : Structures d'élevage de *Crambe crambe* - A et B: structure en acier inoxydable, C et D: structure en PVC, méthodes «collier éponge» E: Tuile de travertin, F: maille (Ternon *et al.*, 2017)

Résumé :

L'océan couvre près de 70% de la surface de la planète et offre une énorme biodiversité avec une source inestimable de produits naturels.

Les éponges marines (Porifera) sont la vie métazoaire la plus ancienne forme sur la terre sont parmi les sources les plus riches en pharmacologie des composés actifs. Ces éponges ont une grande diversité chimique de leurs métabolites tels que les nucléosides, les terpènes, les stéroïdes, les peptides, les alcaloïdes, les acides gras etc.

Donc , nous avons choisi l'espèce *Crambe crambe* (Schmidt, 1862) qu'est une éponge rouge, largement diffusée dans la Méditerranée et qui marque sa présence dans les côtes algériennes (Sfecci et al., 2016).

Les spécimens d'éponge marines ont été recueillis au cours de la période de juin , juillet et septembre 2017 à une profondeur qui varie entre 10 à 16 m

Les tissus d'éponges ont été placés dans l'eau de mer dans des sacs en plastique et mis dans une glacière afin de les garder au frais puis ont été transportés immédiatement au laboratoire. Le traitement des tissus a été réalisé le plus rapidement possible afin d'éviter la détérioration des molécules ciblées .

Au niveau du laboratoire , les échantillons ont été triés, référencés, photographiés après identification selon la méthode de blanchiment afin de sélectionner l'espèce cible (*crambe crambe*) et décrits avant de procéder à la lyophilisation puis au broyage . Ces échantillons sont ensuite stockés à 4°C pour éviter tout risque de dégradation.

L'échantillon lyophilisé de l'éponge marine *C. crambe* (11.65 g) a été mis à macérer en raison d'extraction selon trois méthode. Ces extrais sont ensuite stockés à -18°C en attendant l'identification par la méthode chromatographique, HPLC et infrarouge .

Selon les résultats obtenues on a peu confirmer la présence des deux familles des alcaloïdes guanidiniques (*crambescidin* et *crambescin*) et de confirmé l'identification de six molécules parmi les neufs 9 précédemment décrit par son spectre d'absorption .

Mots clés : éponges marines, *Crambe crambe*, métabolites, alcaloïdes guanidiniques, *crambescidin*

Abstract

The ocean covers nearly 70% of the planet's surface and offers tremendous biodiversity with an invaluable source of natural products.

Marine sponges (Porifera) are the oldest form metazoan life on earth are among the richest sources in pharmacology of active compounds. These sponges have a great chemical diversity of their metabolites such as nucleosides, terpenes, sterols, peptides, alkaloids, fatty acids, etc.

So, we chose the *Crambe crambe* species (Schmidt, 1862) which is a red sponge widely distributed in the Mediterranean and which marks its presence in the Algerian coasts (Sfecci et al., 2016).

Sea sponge specimens were collected during the period of June, July and September 2017 at a depth of between 10 and 16 m

The sponge tissues were placed in seawater in plastic bags and put in a cooler to keep them cool and then immediately transported to the laboratory. The treatment of the tissues was carried out as quickly as possible in order to avoid the deterioration of the targeted molecules.

At the laboratory level, the samples were sorted, referenced, photographed after identification according to the bleaching method in order to select the target species (*crambe crambe*) and described before proceeding to lyophilization and then grinding. These samples are then stored at 4 ° C to avoid any risk of degradation.

The lyophilized sample of *C. crambe* (11.65 g) marine sponge was macerated due to extraction by three methods. These extracts are then stored at -18 ° C pending identification by the chromatographic method, HPLC and infrared.

According to the results obtained, the presence of the two families of guanidine alkaloids (cambescidin and crambescin) was little confirmed and the identification of six of the nine molecules previously described by its absorption spectrum was confirmed.

Keys words : *Crambe crambe* ,Marine sponges, metabolites ,cambescidin, guanidine alkaloids,

ملخص

يغطي المحيط ما يقرب من 70 ٪ من سطح الكوكب ويوفر التنوع البيولوجي الهائل مع مصدر لا يقدر بثمن من المنتجات الطبيعية

تعتبر الإسفنجيات البحرية (بوريفيرا) أقدم أشكال الحياة الأحيائية على الأرض من بين أغنى المصادر في علم الأدوية للمركبات النشطة. تحتوي هذه الإسفنج على تنوع كيميائي كبير في مستقبلاتها مثل النيوكليوزيدات والتربين والستيروول والبيتيدات والقلويات والأحماض الدهنية ، إلخ.

(شميدت ، 1862) وهي عبارة عن إسفنجية حمراء موزعة على نطاق واسع في البحر Crambe crambe لذلك ، اخترنا أنواع (Sfecci et al.2016) الأبيض المتوسط وتميز وجودها في السواحل الجزائرية.

تم جمع عينات الإسفنج البحري خلال الفترة من يونيو ويوليو وسبتمبر 2017 على عمق يتراوح بين 10 و 16 م

تم وضع أنسجة الإسفنج في ماء البحر في أكياس بلاستيكية ووضعها في مبرد للحفاظ عليها باردة ثم نقلها على الفور إلى المختبر. تم تنفيذ الأنسجة في أسرع وقت ممكن من أجل تجنب تدهور الجزيئات المستهدفة.

على مستوى المختبر ، تم فرز العينات والإشارة إليها وتصويرها بعد تحديد الهوية وفقاً لطريقة التبييض من أجل اختيار الأنواع ووصفها قبل الشروع في عملية التجفيف ثم الطحن. ثم يتم تخزين هذه العينات في 4 درجات مئوية (crambe crambe) المستهدفة لتجنب أي خطر من التدهور.

(11.65 جم) بسبب الاستخراج بثلاث طرق. ثم يتم تخزين هذه C. crambe تم تحضير العينة المجففة بالتبريد من الإسفنج البحري والأشعة تحت الحمراء HPLC المقطعات في -18 درجة مئوية في انتظار التعرف عليها بواسطة طريقة الكروماتوغرافي ،

وفقاً للنتائج التي تم الحصول عليها ، تم تأكيد وجود عائلتين من قلويدات غوانيديين (كارببسيديين وكرامبيسين) قليلاً ، وتم تأكيد تحديد ستة من الجزيئات التسعة 9 التي سبق وصفها بواسطة طيف الامتصاص

كلمات مفتاحية : للمركبات النشطة ، الإسفنج البحري، crambe crambe , قلويدات غوانيديين, كارببسيديين