

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITÉ ABDELHAMID IBN BADIS DE MOSTAGANEM
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA MER ET DE L'AQUACULTURE
LABORATOIRE DE PROTECTION, VALORISATION DES RESSOURCES MARINES
LITTORALES ET SYSTÉMATIQUE MOLÉCULAIRE



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat LMD

Filière : Hydrobiologie marine et continentale

Spécialité : Ressources halieutiques

Présentée par :

M^{me} KHODJA Ihcene

THEME

***Etude éco-biologique et biochimique de quelques
espèces d'échinodermes***

Soutenu le 27/05/2023 devant le jury composé de

Présidente	Prof.	SOUALILI Dina Lila	Univ. Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Examineur	Prof.	BOULAHIDID Mostefa	Ecole Nationale Supérieure des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral
Examineur	Prof.	ROUANE-HACENE Omar	Univ. Oran 1 Ahmed Ben Bella
Examinatrice	Prof.	BENAMAR Nardjess	Univ. Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Directeur de thèse	Prof.	MEZALI Karim	Univ. Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem
Invité	MCA	CAULIER Guillaume	Univ. Mons

Année universitaire 2022/ 2023

Avant-propos

La présente thèse intitulée « Etude éco-biologique et biochimique de quelques espèces d'échinodermes » avait pour objectif initial d'aborder l'aspect biologique, écologique et biochimique des quelques espèces de profondeur de deux classes d'échinodermes à savoir les concombres de mer (Holothuroidea) et les étoiles de mer (Asteroidea). L'échantillonnage s'est déroulé dans ce sens où des individus appartenant à plusieurs espèces de concombres de mer et d'étoiles de mer ont été récupérés des prises accessoires des chalutiers et petits métiers.

Concernant la classe des Asteroidea, nous avons pu récolter quelques individus appartenant à plusieurs espèces. Cependant, étant donné que le nombre d'individus par espèces était faible ne permettant pas de réaliser une étude écologique et/ou biologique, nous avons sélectionné trois espèces à savoir *Marthasterias glacialis*, *Astropecten auranciacus* et *Thetyaster subinermis* pour caractériser les saponines présentes dans les différentes parties de leur corps à savoir la partie supérieure, la partie inférieure, l'estomac, les gonades et les caeca pyloriques. Une première partie de cette étude (profil général des saponines) a été réalisée au laboratoire de biologie des organismes marins et biomimétismes (BOMB) et au laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs) en Janvier 2020. La deuxième partie de la caractérisation était prévue pour Mars 2020, cependant, suite aux fermetures des frontières à cause de la pandémie du Covid-19, cette partie n'a pas pu être réalisée. Lors du deuxième stage aux mêmes laboratoires en Septembre 2022, nous n'avons pas pu explorer ces données de nouveau à défaut de temps et de nouveaux échantillons. Ainsi, les résultats relatifs aux étoiles de mer sont incomplets et par conséquent ils n'ont pas été présentés dans cette thèse.

Quant à la classe des Holothuroidea, nous avons ciblé dans un premier temps la seule espèce représentante de la famille des Stichopodidae dans les côtes algériennes à savoir *Parastichopus regalis* et ce, en raison du manque d'études qui l'abordent et le nombre d'échantillonnage relativement élevé permettant d'aborder sa systématique et quelques parties de son aspect biologique, écologique et biochimique. Par la suite, nous nous sommes également intéressés aux espèces peu profondes, à savoir l'espèce herculéenne récemment signalée sur les côtes algériennes (*Holothuria arguinensis*) et la nouvelle espèce (*Holothuria algeriensis*) et ce, uniquement pour étudier leurs mélanges en saponines qui, jusqu'à présent, étaient inconnus. Ces deux espèces n'ont pas fait l'objet d'une étude éco-biologique car plusieurs études leur sont consacrées et sont en cours de réalisation par l'équipe du laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines Littorales et Systématique moléculaire (LPVRMLSM).

Etant donné qu'au final, uniquement quelques espèces de la famille des Stichopodidae et des Holothuriidae (classe des Holothuroidea) ont été abordées, il est souhaitable de changer le titre du thème de la présente thèse de « Etude éco-biologique et biochimique de quelques espèces d'Echinodermes » à « Etude éco-biologique et biochimique de quelques espèces de deux familles de la classe des Holothuroidea (Holothuroidea et Stichopodidae) de la côte algérienne ».

Résumé

Ce travail a pour objectif de contribuer à la connaissance de l'aspect biologique, écologique et biochimique de *P. regalis* ainsi qu'à l'aspect biochimique de deux autres espèces de la famille des Holothuriidae à savoir *Holothuria algeriensis* et *Holothuria arguinensis*. Pour cela, plusieurs individus de ces trois espèces ont été collectés le long de la côte algérienne. Par la suite nous avons réalisé : 1) Une étude du polymorphisme de *P. regalis* par des méthodes morphologiques, endosquelettiques et morphométriques ; 2) Une étude de la croissance relative de *P. regalis* ; 3) Des observations sur le poisson *Carapus acus*, endosymbiote de *P. regalis* ; 4) Une estimation de la composition approximative du tégument de *P. regalis* et sa digestibilité par une enzyme gastrique qui est la pepsine et 5) Une caractérisation des saponines présentes dans le tégument de *H. algeriensis*, *H. arguinensis* et *P. regalis*. Les résultats montrent que *P. regalis* présente deux morphotypes dont l'un est pourvu des taches sombres au niveau de la face dorsale et l'autre dépourvues de celle-ci sans pour autant qu'il y ait des différences aux niveaux anatomiques et endosquelettiques. *Parastichopus regalis* de la région Ouest algérienne présente une relation taille poids de $W=0,429L^{1,784}$ en considérant la longueur mesurée et $W=0,371L^{1,836}$ en utilisant la longueur estimée à partir d'un indice qui prend en considération la longueur et la largeur des individus. Les individus de *P. regalis* hébergent parfois dans leur cavité coelomique des adultes du poisson endosymbiote *Carapus acus* dont le poids varie de 1,24 à 4,11 g et la longueur totale de 12,30 à 16,60 cm. L'évaluation de la qualité du tégument de *P. regalis* a révélé une forte teneur en eau ($90,98 \pm 0,71$ %), une faible teneur en lipides ($1,40 \pm 0,57$ %), une teneur en cendres de $40,45 \pm 0,54$ %, une teneur en sucres totaux de $0,15 \pm 0,01$ % et une bonne digestibilité par la pepsine ($46,96 \pm 3,08$ %). En se basant sur les techniques de la spectrométrie de masse (MALDI-ToF-MS, MALDI-HRMS, LC-MS et LC-MS/MS), le mélange des saponines des trois espèces ciblées est mis en évidence pour la première fois. Ces analyses nous ont permis d'identifier 11, 18 et trois compositions élémentaires pour *H. algeriensis*, *H. arguinensis* et *P. regalis* respectivement chacune présentant plusieurs isomères. Au total, 22 nouvelles structures de saponines ont été proposées dont trois sont communes entre les trois espèces, une est commune entre *H. algeriensis* et *H. arguinensis*, sept sont propres à *H. algeriensis* et 11 à *H. arguinensis*.

Mots clés : *Parastichopus regalis*, *Holothuria algeriensis*, *Holothuria arguinensis*, biométrie, polymorphisme, composition approximative, saponines, côte algérienne.

Abstract

This work aims to contribute to the knowledge of the biological, ecological and biochemical aspect of *P. regalis* as well as the biochemical aspect of two other species of the family Holothuriidae namely *Holothuria algeriensis* and *Holothuria arguinensis*. For this, several individuals of these three species were collected along the Algerian coast. Subsequently, we carried out: 1) A study of the polymorphism of *P. regalis* by morphological, endoskeletal and morphometric methods; 2) A study of the relative growth of *P. regalis*; 3) Observations on the fish *Carapus acus*, endosymbiont of *P. regalis*; 4) An estimation of the approximate composition of the *P. regalis* integument and its digestibility by a gastric enzyme which is pepsin and 5) A characterization of the saponins present in the integument of *H. algeriensis*, *H. arguinensis* and *P. regalis*. The results show that *P. regalis* have two morphotypes, one spotted on the dorsal side and the other unspotted, without any differences at the anatomical and endoskeletal level. *Parastichopus regalis* from the western Algerian region presents a length-weight relationship of $W=0,429L^{1,784}$ considering the measured length and $W=0,371Le^{1,836}$ using the estimated length ff an index that considers the length and the width of individuals. Individuals of *P. regalis* sometimes host in their coelomic cavity adults of the fish *Carapus acus* whose weight varied from 1,24 to 4,11 g and measured from 12,30 to 16,60 cm. The evaluation of the approximate composition of the integument of *P. regalis* revealed high water content ($90,98 \pm 0,71$ %), low lipid content ($1,40 \pm 0,57$ %), ash content of $40,45 \pm 0,54$ %, a total sugar content of $0,15 \pm 0,01$ % and a good pepsin digestibility ($46,96 \pm 3,08$ %). Based on mass spectrometry techniques (MALDI-ToF-MS, MALDI-HRMS, LC-MS and LC-MS/MS), the mixture of saponins of the three targeted species is highlighted for the first time. These analyzes allowed us to identify 11, 18 and three elemental compositions for *H. algeriensis*, *H. arguinensis* and *P. regalis* respectively, each presenting several isomers. A total of 22 new saponins structures has been proposed, of which three are common between the three species, one is common between *H. algeriensis* and *H. arguinensis*, seven are specific to *H. algeriensis* and 11 to *H. arguinensis*.

Keywords: *Parastichopus regalis*, *Holothuria algeriensis*, *Holothuria arguinensis*, biometric study, polymorphism, approximate composition, saponins, Algerian coast.

ملخص

يهدف هذا العمل إلى المساهمة في معرفة الجوانب البيولوجية، البيئية والكيميائية الحيوية لـ *P. regalis* بالإضافة إلى الجانب الكيميائي الحيوي لنوعين آخرين من عائلة Holothuriidae وهما *Holothuria algeriensis* و *Holothuria arguinensis*. لهذا، تم جمع العديد من الأفراد من هذه الأنواع الثلاثة على طول الساحل الجزائري. بعد ذلك قمنا بما يلي: (1) دراسة تعدد أشكال *P. regalis* بالطرق المورفولوجية والهيكلية الداخلية والشكلية؛ (2) دراسة النمو النسبي لنوع *P. regalis*؛ (3) ملاحظات على سمكة *Carapax acus* المتعايشة مع *P. regalis*، (4) تقدير للتركيب التقريبي للحم *P. regalis* وقابلية هضمه بواسطة إنزيم معدي وهو البيبسين و (5) توصيف للصابونينات الموجود في لحم *H. algeriensis* و *H. arguinensis* و *P. regalis*. أظهرت النتائج أن *P. regalis* له نمطين شكليين، أحدهما يقع داكنة على الجانب الظهرى والآخر بدونها، دون وجود أي اختلافات على المستوى التشريحي والعظيماى المنتشرة في الجسم. *Parastichopus regalis* المأخوذ من الغرب الجزائري يتمثل بعلاقة حجم / وزن $W=0,429L^{1,784}$ مع اعتبار الطول المقاس و $W=0,371Le^{1,836}$ باستعمال الطول المقدر من مؤشر يأخذ في الاعتبار طول و عرض الأفراد. بأي أفراد *P. regalis* في بعض الأحيان في تجويفاتها أسماك بالغة من نوع *Carapax acus* التي يتراوح وزنها من 1,24 إلى 4,11 غ ويبلغ طولها الإجمالى من 12,30 إلى 16,60 سم. أظهر اختبار جودة لحم الخيار لوجود نسبة مرتفعة من الماء (90,98 ± 0,71%)، نسبة دهون منخفضة (1,40 ± 0,57%)، رماد بنسبة 40,45 ± 0,54%، نسبة سكر منخفضة 0,15 ± 0,01%، قابلية هضم جيدة من طرف البيبسين (46,96 ± 3,08%). استناداً إلى تقنيات قياس الطيف الكتلي (MALDI-MS، MALDI-HRMS، LC-MS و LC-MS)، تم تحديد خليط الصابونين للأنواع الثلاثة المستهدفة لأول مرة. سمحت لنا هذه التحليلات بتحديد 11، 18 و ثلاث تركيبات عنصرية لـ *H. algeriensis* و *H. arguinensis* و *P. regalis* على التوالي تقدم كل منها عدة تماكبات. في المجموع، تم اقتراح 22 بنية صابونين جديدة، ثلاثة منها مشتركة بين الأنواع الثلاثة، واحدة مشتركة بين *H. algeriensis* و *H. arguinensis*. سبعة منها خاصة بالأنواع *H. algeriensis* و *H. arguinensis* بالأنوع 11 و *H. algeriensis*.

الكلمات المفتاحية: *Parastichopus regalis*، *Holothuria algeriensis*، *Holothuria arguinensis*، القياسات الحيوية، تعدد الأشكال، التركيب التقريبي، الصابونين، الساحل الجزائري.

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout-puissant, de m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

Ma profonde gratitude va tout d'abord à mon directeur de thèse, Monsieur MEZALI Karim, Professeur au département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem) et directeur du laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines Littorales et Systématique Moléculaire (LPVRMLSM). Cette thèse n'aurait pas pu voir le jour sans vos conseils scientifiques et vos encouragements constants. La liberté de travail accordée, vos critiques pertinentes et votre grande rigueur scientifique m'ont aidé d'une valeur inestimable dans ma carrière de chercheur qui ose voir grand. Je vous remercie pour le temps précieux que vous m'avez consacré pour restructurer et corriger minutieusement chaque article ainsi que la présente thèse et surtout de m'avoir fait découvrir ce domaine de recherche si passionnant. Je vous remercie également de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné la chance de collaborer avec vous sur d'autres travaux scientifiques qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances surtout sur la systématique des échinodermes.

Je remercie chaleureusement Madame SOUALILI Dina Lila, Professeur et Doyenne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem) de m'avoir fait l'honneur de présider le jury mais aussi de m'avoir aidé tout au long de ce parcours, votre présence, le temps précieux que vous m'avez consacré pour répondre aux besoins techniques et administratifs et votre aide très précieuse à l'octroi des stages qui m'a ouvert plusieurs portes m'ont été cruciales, je vous suis extrêmement reconnaissante.

Un grand merci aux membres de jury qui ont consacré de leur temps précieux pour examiner ce modeste travail ;

J'exprime mes sincères remerciements à Monsieur BOULAHIDID Mostefa, Professeur à l'École Nationale des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral de m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail et d'avoir accepté de se déplacer d'Alger à Mostaganem malgré ses nombreuses occupations. Qu'il me soit permis de vous présenter à travers ce travail le témoignage de mon grand respect et l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur ROUANE-HACENE Omar, Professeur à l'Université Oran 1 Ahmed BENBELLA pour avoir accepté d'examiner ce travail et de faire le déplacement d'Oran à Mostaganem malgré ses nombreuses occupations. Veuillez trouver ici, le témoignage de ma grande estime et de ma sincère reconnaissance.

Mes plus sincères remerciements à Madame BENAMAR Nardjess, Professeur au département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem) d'avoir consacré de son temps et accepté de participer et d'examiner cette thèse. Veuillez accepter l'assurance de mon estime et mon profond respect.

Je remercie profondément le Professeur FLAMMANG Patrick, directeur du laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétismes (BOMB) et le Professeur GERBAUX Pascal, directeur du laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs) de l'Université de Mons (Belgique) de m'avoir accueillie au sein de leurs laboratoires et permis de réaliser les manipulations sur la caractérisation des saponines d'échinodermes.

Je remercie profondément le Docteur CAULIER Guillaume, maître de conférences « A » et membre du laboratoire BOMB ainsi que le Docteur SAVARINO Philippe, membre du laboratoire S²MOs, de m'avoir accordé de leur temps malgré leurs nombreuses occupations et d'avoir partagé leur expérience et leur savoir dans le domaine de la chimie et la biochimie marine pendant et après mon stage aux laboratoires BOMB et S²MOs.

Je remercie la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem), de m'avoir fourni l'aide financière nécessaire pour effectuer un stage au laboratoire de biologie des organismes marins et biomimétisme et au laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques.

Je voudrais remercier également l'un des piliers de la systématique des holothuries, M. THANDER S. Ahmed (Professeur émérite retraité de l'Université KwaZulu-Natal de l'Afrique du Sud) d'avoir partagé sa connaissance sur la systématique des holothuries, c'était un honneur pour moi de travailler avec vous.

Un grand merci aux pêcheurs petits métiers de la région de Mostaganem (MM. KHELIFA Abdelillah et KHALIFA Mohssine), au Docteur BENZAIT Hocine, à mes collègues doctorants du laboratoire LPVRMLSM (BELAID Sidali, et SELMANI Rabah) qui m'ont aidé à échantillonner des

espèces profondes et aux responsables et l'équipe de la campagne océanique démersale du Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture (CNRDPA) qui m'ont permis de participer à cette campagne en collaboration avec la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem et qui fut l'une des plus belles expériences.

Je remercie les ingénieurs des laboratoires de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et des laboratoires de recherche ; M. BEN BOUZIANE Djilali, M. BERRAHAL Nabil, Mme BENMEHEL Amina, Mme BENHALOU Miaad (Ingénieur du laboratoire LPVRMLSM) et le fournisseur des laboratoires de recherche M. Amine pour leurs aides dans la réalisation de la partie expérimentale de cette thèse. Un grand merci à Docteur MECHETA Asma ancienne doctorante du laboratoire LPVRMLSM de m'avoir transmis ses connaissances sur la biochimie des holothuries.

Ces années de thèse n'ont pas été sacrifiées seulement à la recherche, mais aussi à l'enseignement. Je voudrais remercier le Docteur BELBACHIR Noureddine, chef du département des Sciences de la Mer et de l'Aquaculture de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem) de m'avoir appris à jongler entre l'enseignement et la recherche et le Docteur BOUZAZA Zouheir pour ses précieux conseils durant ces années de thèse.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance et mes remerciements à Mlle LEBOUAZDA Zineb et Mlle BENAROUSS Ahlam, amies avant qu'elles soient collègues, d'avoir partagé avec moi chaque moment de l'élaboration de cette thèse, de son premier jour jusqu'à sa fin, ses hauts mais surtout ses bas. Je vous remercie pour votre présence, amitié, encouragement et soutien inconditionnel sur le plan personnel et professionnel.

Je tiens à remercier mes amis et mes collègues du laboratoire LPVRMLSM (BELKACEM Nour El Houda, BENHADDA Abir, BENMOKRANE Sihem, ZEROUAL Hanane) pour leur aide et encouragements durant la réalisation de cette thèse.

Je remercie également EL KADIRY Samira et la famille AMMARICHE de m'avoir ouvert leur porte et accueillie quand j'étais en Belgique, je vous suis très reconnaissante.

Parce que j'ai peut-être pu oublier certaines personnes, je tiens à remercier ceux qui, au cours de la réflexion et de l'élaboration dont cette thèse est le fruit, m'ont aidé de leur savoir, de leurs encouragements et de leurs critiques bienveillantes, je tiens à exprimer ici ma très vive et très cordiale gratitude.

Dédicace

A la mémoire de ma grand-mère maternelle

Je dédie ce travail

A ma grand-mère paternelle

A mes parents, ceci est le fruit de vos sacrifices.

*A ma mère qui m'a transmis de sa patience, qui a donné sans limite et m'a encouragé
dans mon parcours et à tous les niveaux.*

*A mon père qui a été présent avec moi à chaque étape, m'a aidé avec ses précieux conseils
et m'a transmis de sa rigueur et de sa passion pour la science et les êtres vivants.*

A mes frères qui sont toujours là pour moi.

A mon fiancé qui m'a encouragé quand ma motivation n'était plus là.

A toute ma famille.

A tous mes enseignants.

A mes amies, qui ont fait de ce parcours un souvenir incoubliable.

*Et enfin, aux holothuries ! ces êtres vivants qui m'impressionnent et me surprennent jour
après jour !*

Merci pour tout !

Liste des abréviations

[M+H]⁺ : Masse de la molécule avec un proton

[M+Na]⁺ : Masse de la molécule avec un ion sodium

ACN : Acétonitrile

AMTI : Aquaculture Multitrophique Intégrée

ao : accélération orthogonale

CNRDPA : Centre National de Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture

Da : Dalton

DZD : Dinar Algérien

ESI : Electrospray ionization (Ionisation par électronébuliseur)

€ : Euro

FWHM : Full Width at Half Maximum (pleine largeur à mi-hauteur)

Glu : Glucose

HCL : Chlorure d'Hydrogène

HRMS : High-resolution mass spectrometry (Spectrométrie de masse à haute résolution)

ind : individu

J-C : Jésus-Christ

l : Largeur

L : Longueur

L/h : litre par heure

LC-MS : Spectrométrie de masse couplé à la chromatographie

LC-MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem couplé à la chromatographie liquide

Le : Longueur estimée

M : Molarité

m/z : masse sur charge

MALDI : Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice)

MEDITS : International Bottom Trawl Survey in the Mediterranean (Campagne internationale au chalut de fond en Méditerranée)

MeGlu : 3-O-MethylGlucose

mm/an : millimètre par an

MS : Spectrométrie de masse

NaOH : Hydroxyde de sodium

NH₃ : Ammoniac

NH₄⁺ : Ammonium

NT : Non-tacheté

p : p-value

Qui : Quinovose

R² : Coefficient de corrélation

Rpm : Rotation Par Minute

RU : Royaume-Uni

S²Mos : Laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organique

SLW : La racine carrée du produit longueur-largeur

T : Tacheté

tr : temps de rétention

ToF : Time-of-Flight (Temps de vol)

UICN : International Union for Conservation of Nature (Union internationale pour la conservation de la nature)

USD : United States Dollar (Dollar Américain)

v/v : Volume/Volume

W : Poids

X4 : Grossissement 4

X10 : Grossissement 10

X40 : Grossissement 40

Xyl : Xylose

λ : Longueur d'onde

Liste des figures

Figure 1: Arbre phylogénétique et représentants de l'embranchement des Echinodermes (Kamyab et al., 2020 modifiée).....	7
Figure 2: Résumé des relations entre les holothuries basé sur l'inférence bayésienne et les analyses de vraisemblance maximale de l'ensemble des données avec les noms de clade et de groupe proposés dans l'étude de Miller et al. (2017)	8
Figure 3: Morphologie d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida (Samyn et al., 2006)	10
Figure 4: Les différentes structures des tentacules des holothuries (Pawson et al., 2010).....	11
Figure 5: Différentes formes de l'anneau calcaire	12
Figure 6: Représentation de l'anatomie générale de l'holothurie <i>Australostichopus mollis</i> (Ordre Synallactida) ouvert le long de l'interambulacre dorsal (in Zamora et Jeffs 2013).....	14
Figure 7: Schéma du système aquifère chez l'holothurie <i>Apostichopus japonicus</i> (Gao et Yang, 2015).	15
Figure 8: Différents types de sclérites des holothuries (in Pawson et al., 2010).....	18
Figure 9: Frai de <i>Holothuria tubulosa</i> (Rakaj et al., 2017).....	21
Figure 10: Développement larvaire de <i>Holothuria scabra</i> (Han et Hua, 2022).	22
Figure 11: L'hermaphrodisme simultané chez l'holothurie <i>Pentactella perrieri</i> (Ordre Dendrochirotida) (Martinez et al., 2020).	24
Figure 12: Reproduction asexuée chez les holothuries (Dolmatov, 2014).....	26
Figure 13: A. Prédation sur l'holothurie <i>Holothuria leucospilota</i> par le baliste titan. B. Prédation sur l'holothurie <i>Holothuria mexicana</i> par <i>Caretta caretta</i> (Rogers et al., 2020 ; Richard, 2022).....	29
Figure 14: Relation symbiotiques des holothuries (Purcell et al., 2016).	32
Figure 15: Rôle écologique des holothuries (Purcell et al., 2016)	36
Figure 16: Situation actuelle des pêcheries d'holothuries à l'échelle mondiale (Purcell et al., 2010).	39
Figure 17: A. « Bêche-de-mer » au marché des fruits de mer séchés à Hong Kong (Robinson, 2013). B. « Espardenyes », plat Catalan préparé à base de muscles longitudinaux de <i>Parastichopus regalis</i>	42
Figure 18: Cycle schématique des nutriments dans un système d'aquaculture multi-trophique intégré (Zhang et al., 2019).	45
Figure 19: Composés bioactifs des holothuries et leurs activités biologiques (Siahaan et al., 2017).47	
Figure 20: Produits commerciaux développés à base de collagène des holothuries (Senadheera et al., 2020).....	49
Figure 21: Structure des composants des saponines d'holothuries (Bahrami et Franco, 2016).	51
Figure 22: Action des saponines sur la membrane (Augustin et al., 2011).....	55

Figure 23: Illustration schématique de l'organisation des saponines en solution aqueuse en fonction de leur concentration (Rai et al., 2021)	56
Figure 24: Stations d'échantillonnage de <i>Parastichopus regalis</i> , <i>Holothuria arguinensis</i> et <i>Holothuria algeriensis</i>	64
Figure 25: <i>Parastichopus regalis</i> (flèche blanche) et <i>Holothuria arguinensis</i> (flèche noire) comme prise accessoire dans le chalut du « Grine Belkacem »	69
Figure 26: A. Lyophilisation des échantillons de <i>Parastichopus regalis</i> et <i>Holothuria arguinensis</i> au laboratoire de biologie des organismes marins et biomimétisme	72
Figure 27: A. Incision réalisée sur les individus de <i>Parastichopus regalis</i> . B. Observations des caractères anatomiques de <i>P. regalis</i>	74
Figure 28: Les différentes étapes de l'extraction et la préparation des sclérites	75
Figure 29: Mensurations effectuées sur les structures endosquelettiques (tables) de <i>Parastichopus regalis</i>	76
Figure 30: Mensurations effectuées sur les individus de <i>Carapus acus</i>	79
Figure 31: A. Broyage des échantillons. B. Séparations densitométriques. C. Roto-évaporation avec la formation de mousse. D. Séchage des extraits butanoliques au speed Vac Jouan RC 10.22.	85
Figure 32: Schématisation des composants du spectromètre de masse (Saang'onnyo, 2011)	87
Figure 33: A. Représentation simplifiée du processus MALDI. B. Représentation simplifiée du processus ESI (Graham et al., 2007)	88
Figure 34: Spectromètre de masse Waters Q-ToF premier du laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S ² MOs).	90
Figure 35: A. Bac à ultrasons. B. Séchage de la plaque MALDI au sèche-cheveux. C. Plaque MALDI après dépôt des échantillons	91
Figure 36: Spectromètre de masse Synapt G2-Si du laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S ² MOs).	94
Figure 37: Caractères morphologiques du morphotype non tacheté de <i>Parastichopus regalis</i>	97
Figure 38: Aspect microscopique des gonades de <i>Parastichopus regalis</i> tacheté	99
Figure 39: Sclérites des différentes parties du corps du morphotype non tacheté de <i>Parastichopus regalis</i>	101
Figure 40: A. Vue latérale du tégument de <i>Parastichopus regalis</i> . B. Tégument de <i>P. regalis</i> vu de l'intérieur. C. Tégument de <i>P. regalis</i> vu de l'extérieur. D. Tables vues du côté interne du tégument. E. Tables vue du côté externe du tégument. F. Une autre mise au point de la photo E montrant les flèches des tables	102
Figure 41: Caractères morphologiques du morphotype tacheté de <i>Parastichopus regalis</i>	103
Figure 42: Sclérites des différentes parties du corps du morphotype tacheté de <i>Parastichopus regalis</i>	104

Figure 43: Boite à moustache montrant la comparaison du diamètre (bleu) et de la surface (rouge) des disques des tables des deux morphotypes de <i>Parastichopus regalis</i>	107
Figure 44: Dégradation du derme de <i>Parastichopus regalis</i> après quelques heures de son échantillonnage (individu non immédiatement conservé dans l'éthanol).....	109
Figure 45: Morphologie externe et endosquelette de <i>Holothuria algeriensis</i>	111
Figure 46: Morphologie externe et endosquelette de <i>Holothuria arguinensis</i>	112
Figure 47: Distribution des fréquences de longueur et de largeur de <i>Parastichopus regalis</i> de la côte algérienne (n=95).	113
Figure 48: Boite à moustache des longueurs et largeurs de <i>Parastichopus regalis</i> en fonction des secteurs.	114
Figure 49: Distribution des fréquences de longueur (A), de largeur (B) et de poids (C) de <i>Parastichopus regalis</i> de la côte Ouest algérienne (n=65).....	115
Figure 50: A. Relation biométrique longueur-largeur de <i>Parastichopus regalis</i> . B. Relation biométrique longueur- SLW de <i>P. regalis</i>	117
Figure 51: A. Relation longueur-poids de <i>Parastichopus regalis</i> . B. Relation longueur estimée-poids de <i>Parastichopus regalis</i>	118
Figure 52: Dentitions de <i>Carapus acus</i> . A. Dents des maxillaires. B. Dents des mandibules. C. Dents vomériennes.....	120
Figure 53: A. <i>Parastichopus regalis</i> hébergeant un <i>Carapus acus</i> (flèche). B. <i>Parastichopus regalis</i> hébergeant deux <i>C. acus</i> (flèches). C. Point irisées argentés de <i>C. acus</i> à l'état vivant. D. Les deux individus de <i>C. acus</i> retrouvée ensemble dans le même <i>P. regalis</i>	121
Figure 54: Représentation schématique des schémas de croissance de <i>Carapus acus</i> proposé par Arnold (1956).	124
Figure 55: Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de trois individus de <i>Holothuria algeriensis</i>	132
Figure 56: Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de deux individus de <i>Holothuria arguinensis</i>	134
Figure 57: Analyse LC-MS (+). Chromatogramme courant total d'ions (TIC) de la m/z 1425 $[M+H]^+$ extrait du tégument de l'individu 1 de <i>Holothuria algeriensis</i>	136
Figure 58: Analyse LC-MS/MS. Chromatogramme courant total d'ions (TIC) de la m/z 1425 $[M+Na]^+$ lors d'une analyse LC-MS/MS de l'extrait de saponine de <i>H. algeriensis</i> . Les temps de rétention (min) sont notés en haut de chaque pic.	143
Figure 59: Analyse LC-MS/MS des ions m/z 1425 provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de <i>H. algeriensis</i> . A. Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine E au temps de rétention 7,14 min. B. Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine F au temps de rétention 7,57 min.	145
Figure 60: Analyse LC-MS/MS des ions m/z 1441 provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de <i>H. algeriensis</i> . A. Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine A (trait plein) et des saponines Holothurinoside H, Marmoratoside B ou 17a-hydroxyimpatienside A (trait pointillé) au temps de	

rétention 7,30 min. B. Spectre de masse LC-MS/MS des saponines Holothurinoside H, Marmoratoside B ou 17a-hydroxyimpatienside A au temps de rétention 7,56 min.	147
Figure 61: Analyse LC-MS/MS des ions acétylés provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de <i>H. arguinensis</i> . A. Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine 9 (m/z 1441) au temps de rétention 8,32 min. B. Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine 29 au temps de rétention 10,13 min.....	151
Figure 62: Squelettes et chaînes latérales des aglycones observés chez <i>Holothuria algeriensis</i> , <i>Holothuria arguinensis</i> et <i>Parastichopus regalis</i>	156
Figure 63: Fractions glycosidiques des saponines identifiées dans les extraits de <i>Holothuria algeriensis</i> , <i>Holothuria arguinensis</i> et <i>Parastichopus regalis</i>	158
Figure 64: Fractions glycosidiques complémentaires des saponines identifiées dans les extraits de <i>Holothuria algeriensis</i> , <i>Holothuria arguinensis</i> et <i>Parastichopus regalis</i> à trois, cinq et six unités monosaccharidiques..	159
Figure 65: Structure proposée pour la Saponine A (= Saponine 8) identifié chez <i>H. algeriensis</i> et <i>H. arguinensis</i> à la m/z 1463 $[M+H]^+$	161
Figure 66: : Structure proposée pour la Saponine sulfatée 34 identifiée chez <i>H. arguinensis</i> à la m/z 889 $[M+H]^+$	162
Figure 67: Structure proposée pour la Saponine acétylée 29 identifiée chez <i>H. arguinensis</i> à la m/z 995 $[M+H]^+$	162
Figure 68: Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de trois individus de <i>Parastichopus regalis</i>	166
Figure 69: Analyse LC-MS/MS des ions provenant du mélange de saponines de l'individu 3 de <i>Parastichopus regalis</i> . A. Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine Ar (m/z 1249) au temps de rétention 9,72 min. B. Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine Dr (m/z 1165) au temps de rétention 11,26 min.....	170

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des espèces d'holothuries présente sur la côte algérienne	9
Tableau 2: Activités pharmacologiques et médicinales des composés bioactifs des holothuries.	48
Tableau 3: Activités biologiques remarquables de certaines saponines d'holothuries.	53
Tableau 4: Caractéristiques des stations étudiées.	63
Tableau 5: Stations d'échantillonnage de <i>Parastichopus regalis</i>	71
Tableau 6: Quelques méthodes de dépôt utilisées (Demeyer, 2015).	91
Tableau 7: Les masses exactes de certains éléments organiques trouvés dans les analyses HRMS (Geer Wallace et McCord, 2020).....	93
Tableau 8: Caractères morphologiques et anatomiques des deux morphotypes de <i>Parastichopus regalis</i> (non tacheté et tacheté).....	105
Tableau 9: Mesures biométriques de <i>Parastichopus regalis</i> comparées à celles des autres espèces d'holothuries.....	116
Tableau 10: Paramètres des relations biométriques et des relations taille-poids de <i>Parastichopus regalis</i>	117
Tableau 11: Paramètres de la relation taille-poids de <i>Parastichopus regalis</i> comparés à ceux des autres espèces d'holothuries.....	119
Tableau 12: Gamme des mensurations morphométriques des individus de <i>Carapus acus</i> comparées à celles des côtes tunisiennes et marocaines	123
Tableau 13: Composition approximative du tégument de <i>Parastichopus regalis</i> comparée à celle des autres espèces d'holothuries.	126
Tableau 14: Digestibilité du tégument de <i>Parastichopus regalis</i> par la pepsine comparée aux autres espèces d'holothuries et aux viandes couramment consommées.....	129
Tableau 15: Extrait d' <i>Holothuria algeriensis</i> : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse.....	137
Tableau 16: Extrait d' <i>Holothuria arguinensis</i> : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse.....	139
Tableau 17: Aperçu des saponines identifiées chez les espèces <i>Holothuria algeriensis</i> et <i>Holothuria arguinensis</i> et leurs propriétés structurales	152
Tableau 18: Extrait de <i>Parastichopus regalis</i> : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse.....	168
Tableau 19: Propriétés structurales des saponines identifiées chez <i>Parastichopus regalis</i>	171
Tableau 20: Saponines qui pourraient correspondre aux <i>m/z</i> détectés chez les individus 1 et 2 de <i>Parastichopus regalis</i>	173
Tableau 21: Information d'échantillonnage des individus de <i>Parastichopus regalis</i> analysés..	174

Sommaire

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Etude bibliographique

Chapitre I.1 : Espèce et milieu

1. Présentation de l'embranchement des Échinodermes.....	6
2. Présentation de la classe des Holothuroidea.....	7
2.1. Systématique.....	7
2.1.1. Classification.....	7
2.1.2. Morphologie externe.....	9
2.1.3. Anatomie.....	12
2.1.4. Endosquelette.....	16
2.2. Biologie et écologie.....	19
2.2.1. Distribution et habitat.....	19
2.2.2. Reproduction.....	19
2.2.2.1. La reproduction sexuée.....	20
2.2.2.2. L'hermaphrodisme.....	23
2.2.2.3. La reproduction asexuée.....	24
2.2.3. Nutrition et mode d'alimentation.....	27
2.2.4. Prédation.....	29
2.2.5. Mécanismes de défenses.....	29
2.2.5.1. Éviscération et autotomie.....	30
2.2.5.2. Organes de défense « Tubes de Cuvier ».....	30
2.2.6. Relations symbiotiques.....	31
2.2.6.1. Hôtes d'endocommenseaux.....	31
2.2.6.2. Hôtes d'ectocommenseaux.....	32
2.2.6.3. Hôtes des parasites.....	33
2.3. Rôle écologique.....	33
2.3.1. Maintient et amélioration de la santé des sédiments.....	34
2.3.2. Recyclage des nutriments.....	35
2.3.3. Influence sur la chimie de l'eau de mer.....	36
2.4. Pêche et aquaculture.....	37
2.4.1. Situation de la pêche.....	37
2.4.2. Commercialisation et consommation.....	41
2.4.3. Holothuriculture.....	43
2.5. Valeur nutritionnelle, nutraceutique et cosmétique.....	45

Chapitre I.2 : Les glycosides triterpéniques (saponines)

1. Généralités.....	50
2. Structures.....	50

3.	Activités biologiques	52
3.1.	Propriétés membranolytiques.....	53
3.2.	Propriétés tensioactives.....	55
4.	Rôle dans la chimiotaxonomie.....	56
5.	Rôle écologique et biologique	57

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II.1 : Présentation de la zone d'étude et des espèces étudiées

1.	Cadre géographique de la mer méditerranée	59
2.	Cadre géographique du bassin algérien	60
3.	Les stations étudiées	62
4.	Les espèces d'holothuries étudiées.....	65
4.1.	<i>Parastichopus regalis</i> (Cuvier, 1817).....	65
4.2.	<i>Holothuria (Holothuria) algeriensis</i> Mezali, Thandar et Khodja, 2021	66
4.3.	<i>Holothuria (Roweothuria) arguinensis</i> Koehler et Vaney, 1906.....	67
5.	Stratégie d'échantillonnage	68
5.1.	Campagne océanographique démersale ALDEM-2019.....	68
5.2.	Prises accessoires des chalutiers professionnels et petits métiers.....	70
5.3.	Plongée en apnée.....	70
6.	Echantillonnage	70
7.	Traitement et conservation des échantillons.....	71
7.1.	Lyophilisation des échantillons.....	72

Chapitre II.2 : Les espèces d'holothuries étudiées

1.	<i>Parastichopus regalis</i>	73
1.1.	Etude morphologique.....	73
1.2.	Etude endosquelettique	74
1.3.	Etude morphométrique.....	75
2.	<i>Holothuria algeriensis</i> et <i>Holothuria arguinensis</i>	76

Chapitre II.3 : Biométrie des espèces d'holothuries étudiées

1.	Croissance relative.....	77
1.1.	Relation biométrique.....	77
1.2.	Relation taille-poids.....	77

Chapitre II.4 : Endosymbiote des espèces d'holothuries étudiées

1.	Mensurations morphométriques de l'endosymbiote.....	79
----	---	----

Chapitre II.5 : Etude biochimique des espèces d'holothuries étudiées

1.	Composition approximative du tégument.....	80
1.1.	Taux d'humidité.....	80
1.2.	Taux de lipide	80
1.3.	Taux de cendre.....	81
1.4.	Teneur en sucres totaux	81
2.	Digestibilité du tégument par la pepsine	82
3.	Caractérisation des saponines des espèces d'holothuries étudiées	83
3.1.	Extraction des saponines.....	83
3.2.	Caractérisation des saponines par les techniques de la spectrométrie de masse	86
3.2.1.	Présentation du spectromètre de masse et ses utilisations	86
3.2.2.	Analyse par spectrométrie de masse.....	89
3.2.3.	Calcul de la masse exacte des saponines par la spectrométrie de masse à haute résolution..	92
3.2.4.	Analyse par la spectrométrie de masse en tandem	93
3.2.5.	Observation des spectres et traitements des résultats obtenus	95

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III.1. Identification systématique des espèces d'holothuries étudiées

1.	Identification systématique de <i>Parastichopus regalis</i>	96
1.1.	Morphotype non tacheté	96
1.1.1.	Etude morphologique	96
1.1.2.	Etude endosquelettique.....	99
1.2.	Morphotype tacheté	102
1.2.1.	Etude morphologique	102
1.2.2.	Etude endosquelettique.....	103
1.3.	Etude morphométrique de l'endosquelette des deux morphotypes.....	106
1.4.	Discussion.....	107
2.	Identification systématique de <i>Holothuria algeriensis</i>	111

3.	Identification systématique de <i>Holothuria arguinensis</i>	112
----	--	-----

Chapitre III.2 : Biométrie de *Parastichopus regalis*

1.	Structure de la population de la côte algérienne.....	113
2.	Structure de la population de la côte Ouest algérienne.....	114
3.	Croissance relative.....	117
3.1.	Relation biométrique.....	117
3.2.	Relation taille-poids.....	117

Chapitre III.3. Endosymbiote de *Parastichopus regalis*

1.	Description morphologique de l'endosymbiote.....	120
2.	Observations de l'endosymbiote à l'intérieur de son hôte.....	120
3.	Mensurations morphométriques de l'endosymbiote.....	123

Chapitre III.4 : Etude biochimique des espèces d'holothuries étudiées

1.	Composition approximative du tégument de <i>Parastichopus regalis</i>	125
2.	Digestibilité du tégument de <i>Parastichopus regalis</i> par la pepsine.....	128
3.	Caractérisation des saponines des trois espèces d'holothuries étudiées.....	130
3.1.	Caractérisation des saponines de <i>Holothuria algeriensis</i> et <i>Holothuria arguinensis</i>	130
3.1.1.	Profil générale des saponines dans les extraits analysés.....	130
3.1.2.	Détection des isomères des saponines identifiées par LC-MS.....	134
3.1.3.	Caractérisation de la structure moléculaire des saponines par LC-MS/MS.....	143
3.1.4.	Discussion.....	159
3.2.	Caractérisation des saponines de <i>Parastichopus regalis</i>	165
3.2.1.	Profil générale des saponines dans les extraits analysées.....	165
3.2.2.	Détection des isomères des saponines identifiées par LC-MS.....	167
3.2.3.	Caractérisation de la structure moléculaire des saponines par LC-MS/MS.....	168
3.2.4.	Discussion.....	174

Discussion générale.....	177
--------------------------	-----

Conclusion et perspectives.....	180
---------------------------------	-----

Références bibliographiques.....	183
----------------------------------	-----

Attestation de stage, communication et publications scientifiques.....	221
--	-----

Introduction générale

Introduction générale

Les holothuries communément appelées « concombres de mer », appartiennent à l'embranchement exclusivement marin des Echinodermes. Ce dernier comprend cinq classes parmi elles, la classe des Holothuroidea dont les espèces sont retrouvées dans toutes les régions océaniques, des pôles aux tropiques, des faibles aux grandes profondeurs (Conand, 2006a). Comme tous les représentants de l'embranchement, la classe est caractérisée par une symétrie pentaradiée, un système aquifère et un squelette calcaire (Samyn *et al.*, 2006 ; O'Loughlin *et al.*, 2016). Cependant, chez les holothuries, ce dernier est réduit à de microscopiques pièces calcaires appelés « sclérites », disséminées dans leur tégument et les autres tissus des organes internes (Samyn *et al.*, 2006). A ce jour, la classe des Holothuroidea compte 1781 espèces vivantes divisées en huit ordres incluant 33 familles et 269 genres (Paulay et Rogacheva, 2023). Leur classification est basée sur leurs caractéristiques morphologiques internes et externes ainsi que la combinaison et la forme des dépôts calcaires ou « sclérites » (Pawson *et al.*, 2010).

Les holothuries jouent un grand rôle dans les écosystèmes marins. Les services qu'elles fournissent améliorent la qualité des sédiments, la chimie de l'eau et le recyclage des nutriments, ce qui profite à la santé et à la productivité des écosystèmes et participe à l'augmentation de la richesse spécifique grâce à des symbioses avec des organismes parasites et commensaux plus petits (Purcell *et al.*, 2016).

L'utilisation des holothuries comme aliment ou en médecine traditionnelle a débuté en Chine il y a environ 1000 ans encourageant ainsi le développement de la pêche dans la région, cependant la demande croissante des marchés asiatique a entraîné l'épuisement des populations locales et a incité les commerçants à se diriger vers les autres pays y compris les pays du Nord-Est de l'Atlantique et de la mer Méditerranée dont l'Italie, l'Espagne, la Grèce et, en particulier, la Turquie, qui monopolise le marché d'exportation des holothuries, par conséquent, certaines populations d'holothuries dans ces pays sont actuellement surexploitées (Conand, 2004, 2006b, 2018 ; Lovatelli *et al.*, 2004 ; Purcell *et al.*, 2010 ; Khotimchenko, 2015 ; Marquet *et al.*, 2017). La majorité des espèces commercialisées appartiennent à l'ordre des Holothuriida (Famille Holothuriidae), l'ordre des Synallactida (Famille Stichopodidae) et certaines à l'ordre des Dendrochirotida (Famille Cucumariidae) (Purcell *et al.*, 2012).

L'utilisation culinaire des holothuries est dû à leur profil impressionnant de nutriments tels que la vitamine A, la vitamine B1, la vitamine B2, la vitamine B3 et les minéraux, en particulier le Calcium, le Magnésium, le Fer et le Zinc (**Chen, 2003 ; Çakli et al., 2004 ; Pangestuti et Arifin, 2018**).

Parallèlement, un certain nombre d'activités biologiques et pharmacologiques uniques, notamment des activités anticancéreuses, anticoagulantes, antihypertensives, anti-inflammatoires, antimicrobiennes, antioxydantes, antitumorales et cicatrisantes ont été attribuées à diverses espèces d'holothuries (**Roginsky et al., 2004 ; Tian et al., 2005 ; Miguel-Ruiz et García-Arrarás, 2007 ; Zhao et al., 2007 ; Chen et al., 2011 ; Janakiram et al., 2015 ; Kareh et al., 2018 ; Sukmiwati et al., 2019 ; Wulandari et al., 2021 ; Ru et al., 2022**). Ces propriétés thérapeutiques et les bienfaits médicaux peuvent être liés à la présence d'un large éventail d'éléments bioactifs tels que les sulfates de chondroïtine, les glycosaminoglycanes (GAG), les polysaccharides sulfatés, les stérols et les glycosides triterpéniques (**Goad et al., 1985 ; Vieira et al., 1991 ; Mourão et Pereira, 1999 ; Pacheco et al., 2000 ; Mamelona et al., 2007 ; Van Dyck et al., 2010b ; Caulier et al., 2011 ; Caulier-Mezali et al., 2016**). Ces derniers, appelés également saponines, sont des métabolites secondaires hautement actives ayant des fonctions écologiques importantes et complexes dont la défense chimique (**Van Dyck et al., 2011 ; Bahrami et al., 2014 ; Eeckhaut et al., 2015 ; Zhao et al., 2018**) ainsi que des activités biologiques variées les rendant intéressantes pour les applications pharmacologiques (**Kalinin et al., 1996**). De plus, elles ont le potentiel d'être utilisées comme marqueurs chimiotaxonomiques du fait que leur mélange diffère en fonction de l'espèce, de la composante corporelle, du sexe et de la maturité de l'individu à la fois qualitativement et quantitativement (**Bondoc et al., 2013**).

En Algérie, les pêcheurs professionnels et amateurs utilisent depuis longtemps les holothuries comme appâts de pêche et leur consommation ne fait pas partie des traditions culinaires algériennes (**Francour, 1997 ; Mezali, 1998 ; Mezali et al., 2021a**), cependant, ceci n'a pas empêché leur exploitation et commercialisation illégale vers le marché asiatique via des intermédiaires ciblant majoritairement les espèces du genre *Holothuria* en raison de leur taille et disponibilité dans les faibles profondeurs (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). Depuis plusieurs années, le laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines Littorales et Systématique Moléculaire (LPVRMLSM) de l'université de Abdelhamid Ibn Badis de

Mostaganem s'intéresse aux échinodermes en général et plus particulièrement aux holothuries. Plusieurs travaux ont été publiés sur différents aspects de cette classe dont la systématique (**Mezali, 2011 ; Mezali et Francour, 2012 ; Mezali, 2013 ; Mezali et Thander, 2014 ; Benzait et al., 2020 ; Mezali et al., 2020 ; Mezali et al., 2021b**), l'écologie (**Mezali et Soualili, 2013; Belbachir, 2018 ; Belbachir et Mezali, 2018 ; Belbachir et Mezali, 2020a ; Belbachir et Mezali, 2020b ; Elakkermi et al., 2021 ; Mezali et Khodja, 2021**), l'écologie de la reproduction (**Mezali et al., 2014 ; Slimane-Tamacha et al., 2019 ; Mezali et al., 2022**), la biochimie (**Caulier-Mezali et al., 2016 ; Mecheta et Mezali, 2019 ; Mecheta et al., 2020**), l'exploitation (**Mezali et Slimane-Tamacha et al., 2020**), la consommation (**Mezali et al., 2021a ; Belkacem et Mezali, 2022**) ...etc. Ces travaux ont ciblé majoritairement les espèces du genre *Holothuria* à savoir *Holothuria (Platyperona) sanctori*, *Holothuria (Roweothuria) poli*, *Holothuria (Holothuria) tubulosa*, *Holothuria (Roweothuria) arguinensis* d'origine atlantique et qui a été signalée en Algérie en 2014 (**Mezali et Thander, 2014**) ainsi que *Holothuria (Holothuria) algeriensis* qui a été considérée comme un morphotype de *Holothuria (Holothuria) tubulosa* dont elle a été séparée récemment suite aux travaux taxinomiques de **Mezali (2008)** et **Mezali et al. (2021b)**.

D'autre part, l'espèce *Parastichopus regalis* qui est à notre connaissance la seule représentante de la famille des Stichopodidae sur la côte algérienne n'est pas ciblée par les pêcheurs ni consommée malgré son importance économique et nutritionnelle. En fait, ses bandes musculaires longitudinales appelées « espardenya » ou « llongo » sont très appréciées en Espagne par les consommateurs locaux et les touristes asiatiques et sont considérées comme le produit de la mer le plus cher atteignant un prix de 130 €/ kg sur les marchés locaux (**Ramón et al., 2010**) et 65 €/165 g dans les restaurants de luxe (**Conand, comm. pers.**). Du point de vue pharmaceutique et nutritionnel, il a été démontré que l'extrait de la paroi du corps de *P. regalis* présente une activité antimicrobienne, antifongique et antitumorale (**Santos et al., 2015**) ainsi qu'une nutrition équilibrée adaptée à la consommation humaine (**Roggatz et al., 2018**).

En méditerranée, plusieurs études sur sa distribution et sa pêche (**Ramón et al., 2010**), son endosymbionte *Carapus acus* Brünnich, 1768 (**González-Wangüemert et al., 2014a**), la différenciation génétique entre ses populations (**Maggi et González-Wangüemert, 2015**), la réponse de son système immunitaire à différentes températures pour son implication dans l'aquaculture (**Galimany et al., 2018**) ont été réalisés. Cependant, en Algérie, peu de travaux lui

ont été consacrés et sont limités à sa signalisation et l'étude de son régime alimentaire (**Benzait et al., 2020 ; Elakkermi et al., 2021**).

L'objectif de cette thèse est de s'intéresser dans un premier temps à l'espèce de profondeur *Parastichopus regalis* dont les études sur la côte algérienne sont manquantes et ce à travers la contribution à la connaissance de quelques aspects de son éco-biologie et biochimie. Par la suite, nous nous sommes également intéressés à l'aspect biochimique et plus précisément à la caractérisation des saponines de deux espèces du genre *Holothuria* à savoir *H. algeriensis* et *H. arguinensis* dont le profil des saponines est inconnu. Pour cela nous avons réalisé :

- 1) Une identification systématique des espèces étudiées et une étude du polymorphisme de *P. regalis* dans le but de déterminer si les deux morphotypes de cette espèce coexistant sur la côte algérienne ne sont que des variants de couleur de la même espèce ou représentent deux espèces différentes en se basant uniquement sur les caractères morphologiques, endosquelettique et morphométriques ;
- 2) Une étude de la croissance relative (relation taille-poids) de *P. regalis* ;
- 3) Des observations sur l'endosymbiote le plus fréquent de *P. regalis* à savoir le poisson carapide *Carapus acus* ;
- 4) Une évaluation de la qualité du tégument de *P. regalis* à travers l'étude de sa composition approximative ainsi que sa digestibilité par une enzyme gastrique qui est la pepsine ;
- 5) Une mise en évidence et une caractérisation des saponines présentes dans le tégument de *H. algeriensis*, *H. arguinensis* et *P. regalis*.

La thèse est divisée en trois principaux chapitres, chacun subdivisé en sous-chapitre comme suit :

Le premier chapitre « Etude bibliographique » est consacré dans un premier temps à une synthèse sur différents aspects des espèces étudiées et le milieu où elles vivent, et par la suite à une présentation des triterpènes glycosidiques (saponines) et leurs différents rôles ;

Le deuxième chapitre « Matériel et méthodes » est subdivisé en cinq parties, la première est consacrée à la présentation de la zone d'étude et des espèces étudiées ; le deuxième à l'étude de

la systématique des espèces étudiées, le troisième à l'étude de la biométrie, le quatrième à l'étude de l'endosymbiote des holothuries et le cinquième à l'étude biochimique ;

Le troisième chapitre représente l'ensemble des résultats obtenus pour chaque étude et leur discussion en suivant le même ordre que le chapitre précédent.

Chapitre I : Etude bibliographique

Chapitre I.1 : Espèce et milieu

Chapitre I : Etude bibliographique**Chapitre I.1 : Espèce et milieu****1. Présentation de l'embranchement des Échinodermes**

Le phylum des Échinodermes du grec ancien, « echinos » signifie hérisson et « derma » signifie peau, est un phylum diversifié mais entièrement marin (**Corning *et al.*, 1975**). Les échinodermes sont constitués de plus de 7 000 espèces vivantes réparties en trois sous-phylum et cinq classes différentes (**Figure 1**) (**Kamyab *et al.*, 2020**). Ils sont caractérisés par une symétrie pentaradiée qui est plus évidente chez les « étoiles de mer » (Asteroidea avec 1 942 espèces) et les « ophiures » (Ophiuroidea avec 2 131 espèces), un peu moins évidente chez « les étoiles à plumes » (Crinoidea avec 667 espèces) et les « oursins » (Echinoidea avec 1 021 espèces) et pas immédiatement évidente chez les « concombres de mer » (Holothuroidea avec 1 781 espèces) (**Navarro, 2012 ; O'Loughlin *et al.*, 2016 ; Pandian, 2018 ; Altenburger *et al.*, 2023 ; Mah, 2023 ; Messing, 2023 ; O'Hara *et al.*, 2023 ; Paulay et Rogacheva, 2023**).

Les représentants de cet embranchement possèdent un squelette composé de plaques calcaires et des pieds tubulaires qui sont en connexion avec un système vasculaire interne (**Mortensen, 1927 ; O'Loughlin *et al.*, 2016**). La surface du corps est divisée en 10 sections portant (zones radiales ou ambulacraires) ou dépourvues (zones interradiaires ou interambulacraires) de pieds tubulaires de façon alternative (**Mortensen, 1927**).

Les zones radiales peuvent être libres les unes des autres formant des bras librement mobiles et le corps devient ainsi en forme d'étoile (tel que les astéries et les ophiures) ou en forme de fleur (tel que les lys de mer ou les comatules), ou ils peuvent être liés sur toute leur longueur et le corps devient rond, arqué (tel que les oursins) ou allongé en forme de ver (tel que les holothuries) (**Mortensen, 1927**).

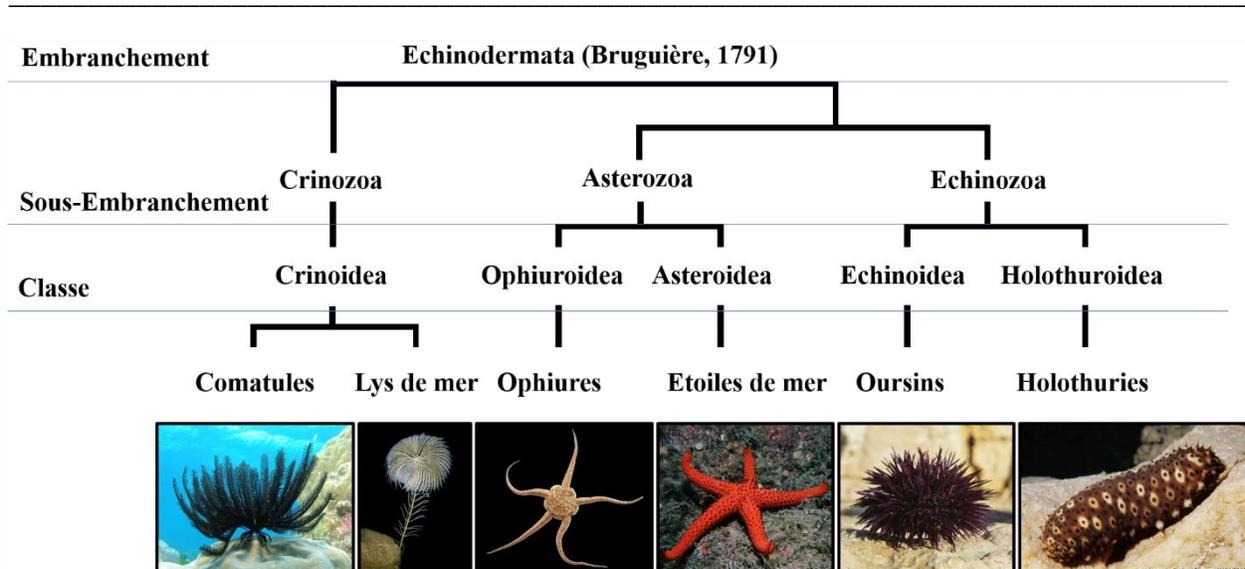


Figure 1: Arbre phylogénétique et représentants de l'embranchement des Echinodermes (**Kamyab et al., 2020 modifiée**).

2. Présentation de la classe des Holothuroidea

2.1. Systématique

2.1.1. Classification

Jusqu'à récemment, la classification des Holothuroidea la plus utilisée était celle de **Pawson et Fell (1965)**. Au niveau des Ordres, la classification dépend généralement des caractéristiques anatomiques externes telles que la morphologie des tentacules (**Roberts et al., 2000**), la morphologie du corps et en partie sur la forme de l'anneau calcaire. Cependant, pour les taxons inférieurs, les caractéristiques de l'anatomie externe et interne sont utilisées avec un accent particulier sur la structure des dépôts calcaires dans la paroi du corps (**Pawson et Fell, 1965 ; Pawson, 1970 ; Slater et Chen, 2015 ; Yang et al., 2015**). **Pawson et Fell (1965)** ont défini six Ordres à savoir Molpadiida, Apodida, Aspidochirotida, Elasipodida, Dendrochirotida et Dactylochirotida. Cette classification a été modifiée par la suite par **Miller et al. (2017)** en se basant sur une étude phylogénétique de la classe. Cette dernière a révélé que l'ordre Aspidochirotida est polyphylétique tandis que les familles Stichopodidae, Deimatidae et Synallactidae forment un clade monophylétique, par conséquent, **Miller et al. (2017)** ont érigé un nouvel ordre nommé

Synallactida pour accueillir les trois familles citées et l'ancien ordre Aspidochirotida a été remplacé par un autre monophylétique appelé Holothriida incluant uniquement deux familles à savoir Holothuriidae et Mesothuriidae. Les représentants de l'ordre Dactylochirotida ont été inclus dans l'ordre des Dendrochirotida et un nouvel ordre Persiculida a été créé pour inclure trois familles caractérisées par l'absence de sclérites dans la paroi du corps (Miller *et al.*, 2017). Les autres ordres à savoir Dendrochirotida, Elasipodida, Molpadida et Apodida restent les mêmes (Figure 2).

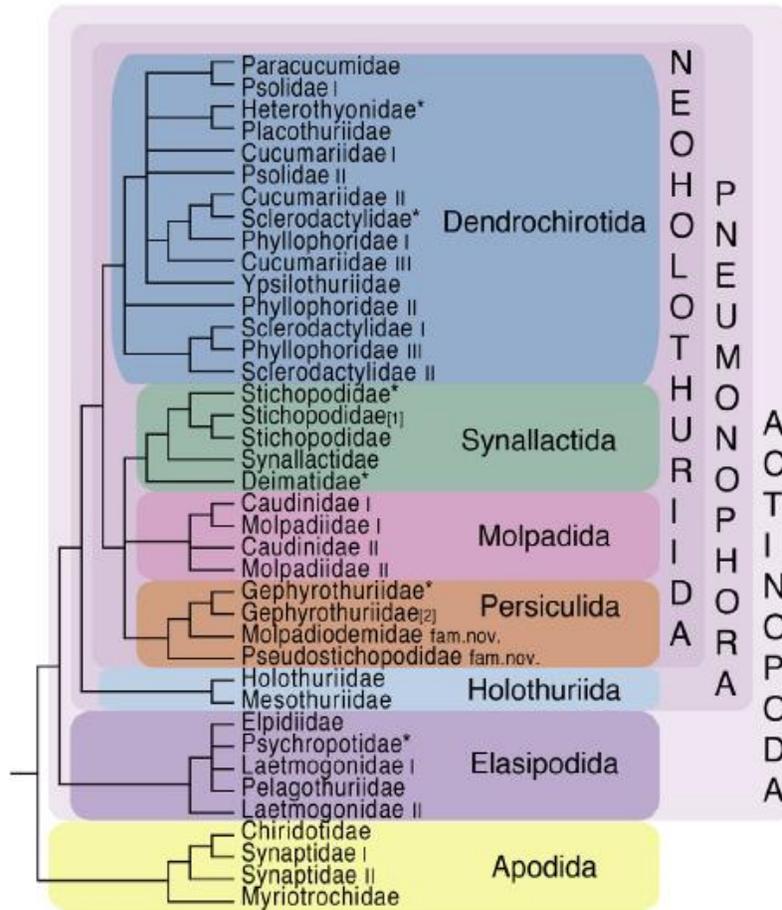


Figure 2: Résumé des relations entre les holothuries basé sur l'inférence bayésienne et les analyses de vraisemblance maximale de l'ensemble des données avec les noms de clade et de groupe proposés dans l'étude de Miller *et al.* (2017).

Sur la côte algérienne, 16 espèces d'holothuries (Tableau 1) ont été reportées appartenant majoritairement aux familles des Holothuriidae, Stichopodidae et Dendrochirotidae.

Tableau 1 : Liste des espèces d'holothuries présente sur la côte algérienne

Espèce	Famille	Références
<i>Neocucumis marionii</i> (Marenzeller von, 1877)	Cucumariidae	In Grimes (2010)
<i>Stereoderma kirchsbergii</i> (Heller, 1868) Panning, 1949	Cucumariidae	In Grimes (2010)
<i>Paraleptopentacta elongata</i> (Düben et Koren, 1846)	Dendrochirotidae	In Grimes (2010)
<i>Paraleptopentacta tergestina</i> (Sars, 1859)	Dendrochirotidae	Mezali et al. (2020)
<i>Holothuria (Panningothuria) forskali</i> Delle Chiaje, 1823	Holothuriidae	Mezali (1998)
<i>Holothuria (Holothuria) stellati</i> Delle Chiaje, 1824	Holothuriidae	Mezali (1998)
<i>Holothuria (Platyperona) sanctori</i> Delle Chiaje, 1823	Holothuriidae	Mezali (1998)
<i>Holothuria (Roweothuria) poli</i> Delle Chiaje, 1824	Holothuriidae	Mezali (1998)
<i>Holothuria (Roweothuria) arguinensis</i> Koehler et Vaney, 1906	Holothuriidae	Mezali et Thandar (2014)
<i>Holothuria (Holothuria) algeriensis</i> Mezali, Thandar et Khodja, 2021	Holothuriidae	Mezali et al. (2021b)
<i>Holothuria (Holothuria) tubulosa</i> Gmelin, 1791	Holothuriidae	Mezali (1998)
<i>Thyone inermis</i> Heller, 1868	Phyllophoridae	In Grimes (2010)
<i>Phyllophorus (Phyllophorus) urna</i> Grube, 1840	Phyllophoridae	In Grimes (2010)
<i>Thyone fusus</i> (O.F. Müller, 1776)	Phyllophoridae	In Grimes (2010)
<i>Parastichopus regalis</i> (Cuvier, 1817)	Stichopodidae	Benzait et al. (2020)
<i>Oestergrenia digitata</i> (Montagu, 1815)	Synaptidae	Mezali et Semroud (1997)

2.1.2. Morphologie externe

La classe des Holothuroidea est représentée par des organismes qui ont un corps cylindrique ou semi-cylindrique aplati plus ou moins allongé selon l'axe bucco-aboral (**Figure 3**), raison pour laquelle ils reçoivent le nom commun de « concombre de mer » (**Corning et al., 1975 ; Navarro, 2012 ; O'Loughlin et al., 2016 ; Mohsen et Yang, 2021**). Ils mesurent de quelques centimètres à au moins 2 m de longueur (**Pawson et al., 2010**).

Le corps des holothuries présente une large gamme de colorations avec une prédominance de tons bruns, du noir ou gris au brun rougeâtre ou violacé, il existe cependant des exceptions avec des couleurs jaunes [*Holothuria (H.) helleri*], blanches ou roses [*Leptosynapta* sp. (Ordre Apodida), *Thyone propinqua* (Ordre Dendrochirotida)], verte [*H. (Platyperona) parvula*] et orange [*Thyone hirta* (Ordre Dendrochirotida)]. Chez certaines espèces, des colorations tachetées peuvent apparaître comme c'est le cas de *Holothuria sanctori* (**Mezali, 2013**). Fréquemment, la coloration de la face ventrale contraste avec la coloration de la face dorsale (**Navarro, 2012 ; Mohsen et Yang, 2021**).

La symétrie pentaradiée à laquelle se superpose une symétrie bilatérale, se manifeste sur le plan extérieur par la présence de cinq rangés plus ou moins équidistants, sur lesquels sont disposées

les pièces ambulacraires, la face ventrale est formée de 3 rangés de pièces ambulacraires formant une semelle rampante appelée « trivium » ayant une fonction locomotrice tandis que la face dorsale reste arquée et est formée de 2 rangés constituant le « bivium » (**Hyman, 1955 ; Samyn *et al.*, 2006**).

Les pieds tubulaires ou les podia sont des expansions de la paroi du corps sous la forme de petits tubes contenant à l'intérieur une branche du système aquifère et se terminant par un élargissement concave qui agit comme une ventouse, leur disposition sur la paroi du corps peut varier considérablement (**Mortensen, 1927**). Ils peuvent être présents sur tous les rayons, formant parfois des bandes bien visibles allant de la bouche à l'anus. Ils sont souvent plus nombreux ventralement que dorsalement, et peuvent être disséminés aussi bien dans les zones radiaires que dans les zones interradiaires (**Pawson *et al.*, 2010**). Les podia sont soutenues intérieurement par un disque squelettique terminal très perforé (**Pawson *et al.*, 2010**). Les extrémités de ces podia ont la capacité d'adhérer à un objet et de se déconnecter immédiatement permettant aux holothuries de se déplacer, de s'accrocher au substrat et de se couvrir pour se camoufler (**O'Loughlin *et al.*, 2016**). Ladite ventouse terminale n'est pas présente chez les papilles qui se trouvent sur la face dorsale et leur aspect tubulaire se réduit à l'apex d'une structure conique plus ou moins élargie (**Navarro, 2012 ; Purcell *et al.*, 2012**).

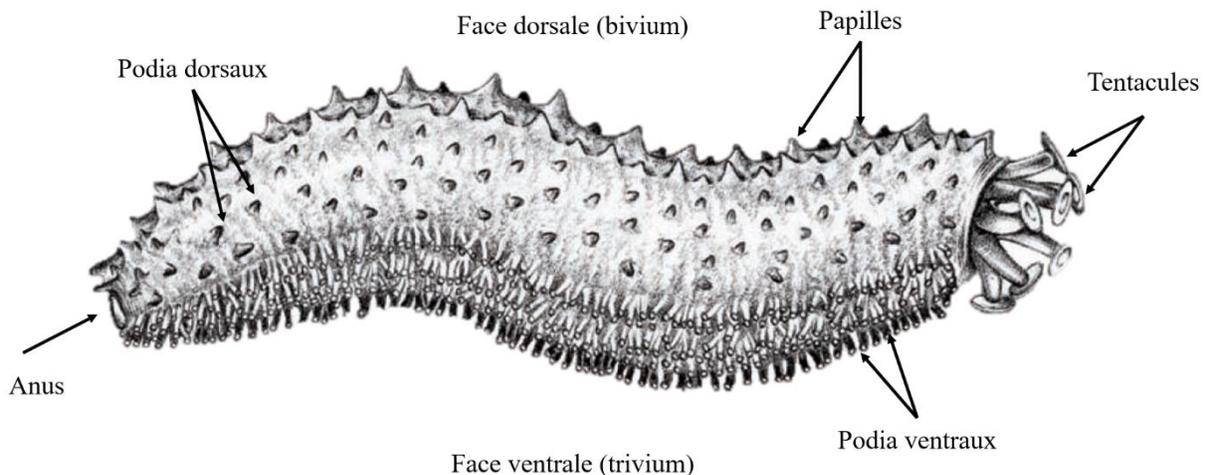


Figure 3: Morphologie d'une holothurie de l'ordre des Holothuriida (**Samyn *et al.*, 2006**)

L'axe bucco-aboral est généralement horizontal, la bouche et l'anus sont aux extrémités opposées (**Samyn *et al.*, 2006**). La bouche est entourée d'une étroite membrane péristomiale

(membrane buccale) et d'un anneau de huit à 30 tentacules rétractiles qui sont en fait des pieds tubulaires modifiés issus du système aquifère (**Pawson *et al.*, 2010 ; Slater et Chen, 2015**). Ces tentacules forment un cercle qui borde extérieurement la membrane buccale au centre de laquelle se trouve la bouche circulaire (**Samyn *et al.*, 2006**) et permettent aux holothuries de capturer la nourriture (**Mezali et Soualili, 2013 ; Slater et Chen, 2015 ; O'Loughlin *et al.*, 2016**). Selon l'ordre et l'espèce, le nombre et la structure des tentacules varient, ils peuvent être en forme de bouclier, ramifiés, pennés ou digités (**Figure 4**), raison pour laquelle ils sont utilisés comme caractères clés dans l'identification de ces espèces (**Pawson *et al.*, 2010 ; Purcell *et al.*, 2012 ; Slater et Chen, 2015**). La bouche peut être terminale (Chez les Apodida, Molpadida et la plupart des Dendrochirotida), ventrale (Elasipodida et Holothuriida) ou dorsale (certains Dendrochirotida) (**Pawson, 1970**). L'anus peut être entouré de petites papilles ou de papilles fortement calcifiées appelées dents anales (**Purcell *et al.*, 2012**). Selon les ordres taxinomiques, l'anus peut également être en position ventral (Elasipodida), terminal (Apodida, Molpadida, la plupart des Dendrochirotida et Holothuriida) ou dorsale (certains Holothuriida et Dendrochirotida) (**Pawson, 1970 ; Feral et Massin, 1982**).

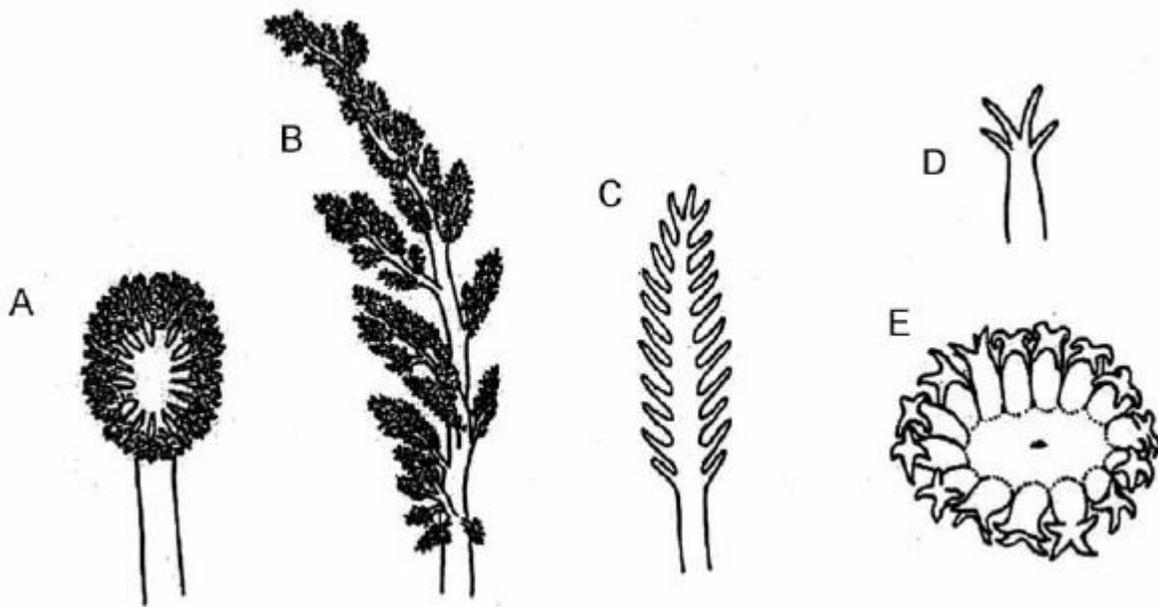


Figure 4: Les différentes structures des tentacules des holothuries. **A.** En forme de bouclier (Ordre Holothuriida). **B.** Ramifié (Ordre Dendrochirotida). **C.** Pennées (Ordre Apodida). **D.** Digités (Ordre Apodida, Ordre Molpadiida). **E.** Digitée (Ordre Molpadiida) (**Pawson *et al.*, 2010**).

2.1.3. Anatomie

La paroi du corps des holothuries est constituée d'une fine cuticule au-dessus de l'épiderme non cilié et un derme épais en dessous. Dans l'épiderme apparaissent des cellules sensorielles et glandulaires intercalées ainsi que des granules de pigment qui déterminent la couleur du corps tandis que le derme est composé de tissu conjonctif collagène renfermant les structures endosquelettiques (sclérites). Sous le derme se trouve une couche de muscles circulaires formant un cylindre suivi par les muscles longitudinaux (Purcell *et al.*, 2012 ; Slater et Chen, 2015). La surface interne du corps est tapissée d'un péritoine cilié (Slater et Chen, 2015). La paroi du corps renferme également des glandes à mucus (Koehler, 1921).

Les holothuries possèdent un collier interne qui entoure l'extrémité antérieure de l'intestin appelé anneau calcaire et dont la forme est importante dans la classification des espèces (Figure 5) (Pawson *et al.*, 2010 ; Slater et Chen, 2015 ; O'Loughlin *et al.*, 2016). Il est composé généralement d'une alternance de plaque macroscopiques radiales plus grandes et de plaques interradiales plus petites (Pawson *et al.*, 2010 ; Purcell *et al.*, 2012). Cet anneau sert de support à l'œsophage et constitue une base mécanique aux tentacules et un point d'attache pour les cinq muscles longitudinaux et les muscles rétracteurs quand ils sont présents (Pawson *et al.*, 2010 ; Slater et Chen, 2015 ; O'Loughlin *et al.*, 2016). Les muscles longitudinaux sont attachés postérieurement au cloaque via les muscles rétracteurs du cloaque (Samyn *et al.*, 2006).

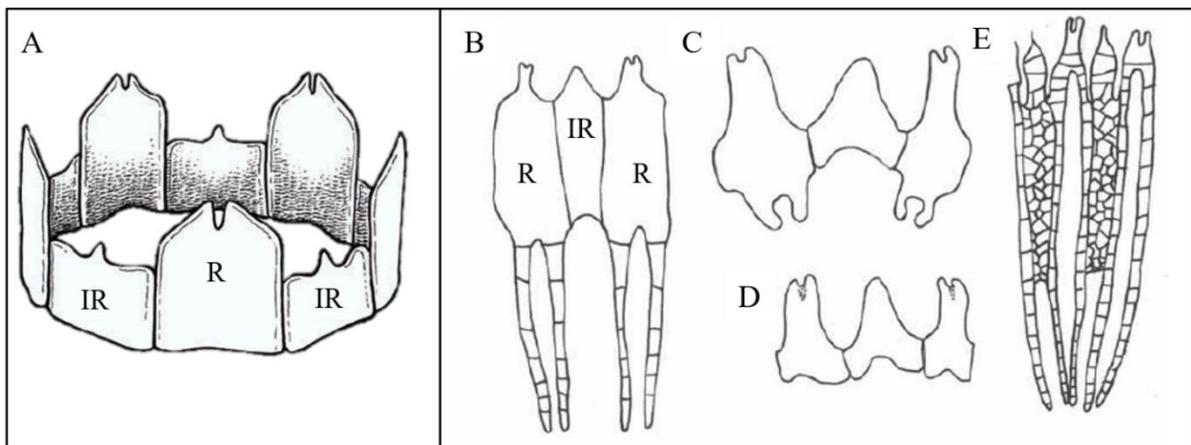


Figure 5: Différentes formes de l'anneau calcaire. **A.** Forme typique de l'anneau calcaire des Holothuriidae (in Samyn *et al.*, 2006). **B.** Avec projections postérieures moyennes. **C.** Avec projections postérieures courtes. **D.** Sans projections postérieures. **E.** Avec de longues projections postérieures complexes (in Pawson, *et al.*, 2010). **R.** Plaque radiale. **IR.** Plaque interradiale.

Le coelome de l'holothurie est une vaste cavité remplie d'un liquide coelomique dont la composition est proche de l'eau de mer et dans lequel se trouvent le tube digestif, les arbres respiratoires appelés improprement « poumons » et les gonades (**Figure 6**) (**Samyn et al., 2006**).

Le système digestif des holothuries est essentiellement un conduit tubulaire (**Figure 6**) (**Feral et Massin, 1982**). La bouche s'ouvre dans le pharynx, qui passe par le centre de l'anneau calcaire suivi par l'œsophage et l'estomac qui sont des structures courtes et un intestin qui fait deux tours. Ce dernier est composé de trois régions à savoir ; l'intestin antérieur descendant, l'intestin antérieur ascendant et l'intestin postérieur descendant (= rectum), et finit par se jeter dans le cloaque à l'extrémité postérieure du coelome pour s'ouvrir vers l'extérieur par l'anus (**Purcell et al., 2012 ; Mezali et Soualili, 2013 ; Belbachir et al., 2014 ; Slater et Chen, 2015**). Les extrémités antérieure et postérieure du tube digestif sont solidement fixes par d'épais cordons suspenseurs, Les suspenseurs antérieurs attachent le pharynx au complexe hydro-vasculaire péripharyngien, tandis que les suspenseurs postérieurs attachent le rectum ou le cloaque à la paroi du corps (**Feral et Massin, 1982**).

Les intestins sont associés à des réseaux de vaisseaux hémaux reliés aux arbres respiratoires via le plexus respiro-hémal. Les arbres respiratoires sont des évaginations très ramifiées de la paroi du cloaque qui s'étendent le long de la cavité corporelle dans le coelome pré-viscéral entouré de liquide coelomique (**Slater et Chen, 2015**). Ces organes peuvent se remplir d'eau qui sert à la respiration par pompage du cloaque (entre 6 à 10 contractions cloacales) et peuvent l'expulser par une seule contraction. Lorsqu'ils sont remplis, le corps de l'holothurie est gonflé et turgescence et lorsque au contraire l'eau est expulsée par l'anus, le corps devient flasque et mou (**Koehler, 1921 ; Mezali, 1998 ; Harms, 2012**).

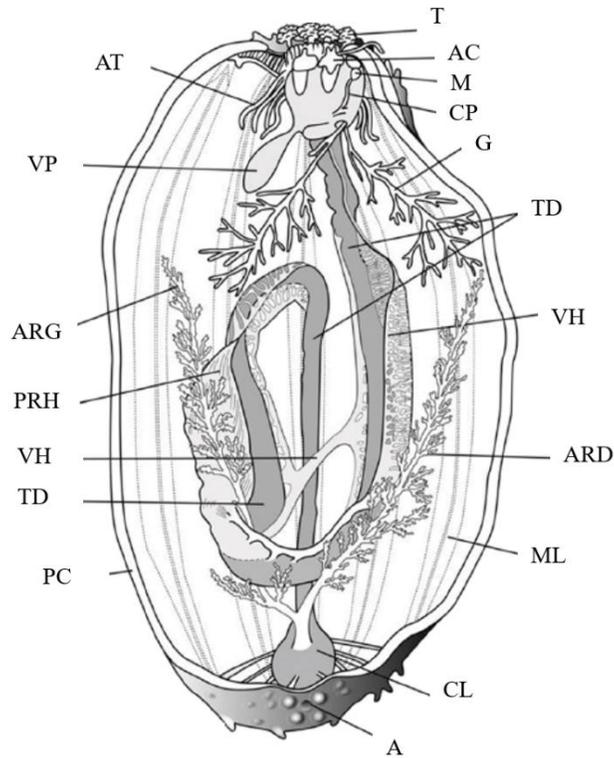


Figure 6: Représentation de l'anatomie générale de l'holothurie *Australostichopus mollis* (Ordre Synallactida) ouvert le long de l'interambulacre dorsal. **A.** Anus, **TD.** Tube digestif ; **PC.** Paroi du corps ; **CL.** Cloaque ; **AC.** Anneau calcaire ; **G.** Gonade ; **VH.** Vaisseau hémal ; **ML.** Muscle longitudinal ; **ARG.** Arbre respiratoire gauche ; **M.** Madréporite ; **VP.** Vésicule de Poli ; **PRH.** Plexus respiratoire-hémal ; **ARD.** Arbre respiratoire droit ; **CP.** Canal de pierre ; **T.** Tentacule ; **AT.** Ampoules tentaculaires (*in Zamora et Jeffs 2013*).

L'appareil aquifère (**Figure 7**) de ces espèces est composé d'un canal circulaire oral duquel partent 5 canaux radiaires qui fournissent des ramifications aux ambulacres, des ampoules tentaculaires qui aboutissent aux tentacules, une ou plusieurs vésicules de Poli et un ou plusieurs canaux de pierre se terminant par une madréporite qui alimente le fluide cœlomique dans le canal oral (**Koehler, 1921 ; Slater et Chen, 2015**). Le canal de pierre s'ouvre par la madréporite dans la cavité corporelle, cependant, dans certaines formes d'eau profonde dont quelques espèces de la famille Synaptidae et du genre *Pelagothuria*, l'arrangement primitif est gardé et la madréporite s'ouvre vers l'extérieur à travers la peau (**Mortensen, 1927**). Les cils dans le canal de pierre entraînent un flux d'eau principalement vers l'intérieur, tandis que les cils dans les pores de la

madréporite filtrent les particules plus grosses. Le fluide dans le système vasculaire de l'eau est similaire à l'eau de mer, à l'exception de la présence de cœlomocytes, de certaines protéines et d'une concentration de Potassium plus élevée (**Harms, 2012**).

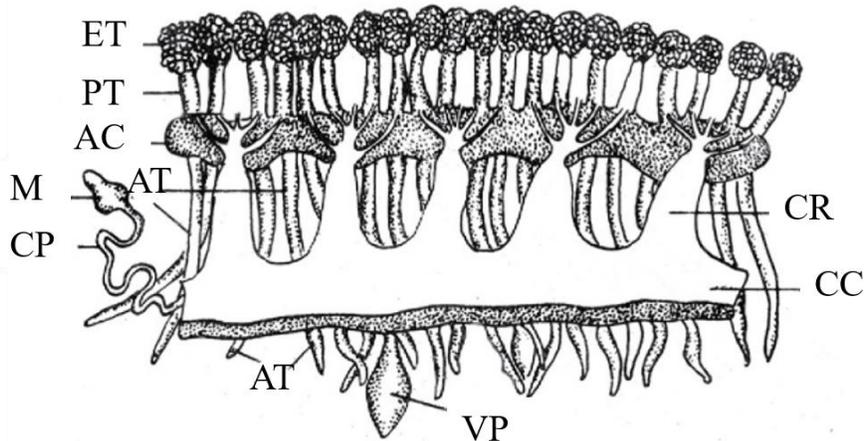


Figure 7: Schéma du système aquifère chez l'holothurie *Apostichopus japonicus* (Ordre Synallactida). **ET.** Extrémité avant du tentacule ; **PT.** Pétiole du tentacule ; **AT.** Ampoule tentaculaire ; **AC,** Anneau calcaire ; **CR.** Canal radial ; **CC.** Canal circulaire ; **VP.** Vésicule de Poli ; **CP.** Canal de pierre ; **M.** Madréporite (**Gao et Yang, 2015**).

Certaines espèces d'holothurie ont développé des organes de défense constitués par des tubes très fins, cylindriques allongés de coloration blanche ou jaune brunâtre appelés « tubes de Cuvier », ils s'insèrent sur la paroi du rectum et sont expulsés de l'anus pendant le stress agissant comme un mécanisme de défense dissuasif (**Koehler, 1921 ; Slater et Chen, 2015**).

Contrairement à tous les autres échinodermes, le système reproducteur des holothuries est bilatéralement, et non radialement, symétrique (**Hyman, 1955 ; Slater et Chen, 2015**). Les holothuries ont une seule gonade composée de nombreux tubules ramifiés réunis à la base en une touffe attachée au côté gauche du mésentère dorsal (Holothuriida) ou en deux touffes, une de chaque côté du mésentère (Stichopodidae) (**Hyman, 1955 ; Pawson et al., 2010 ; Purcell et al., 2012 ; Slater et Chen, 2015**). Bien qu'habituellement longs et nombreux, les tubules gonadiques peuvent être courts et peu nombreux (**Hyman, 1955**). La gonade s'agrandit et se ramifie de plus en plus à mesure que la maturité est atteinte avant le frai, après cela, les tubules gonadiques sont souvent complètement réabsorbés chez les espèces tempérées (**Slater et Chen, 2015**). La gonade

(**Figure 6**) est attachée au mésentère dorsal par lequel passe le gonoducte menant à l'extérieur à travers le gonopore (**Purcell et al., 2012 ; Slater et Chen, 2015**), ce dernier est situé dans la zone postérieure du collier tentaculaire, dans l'interradius médio-dorsal (**Pawson et al., 2010**).

Le phylum Echinodermata est le seul groupe deutérostomien non cordé qui possède un système nerveux centralisé (**Mashanov et al., 2009**). Il accompagne le système aquifère et se trouve entièrement à l'intérieur de l'épiderme (**Mortensen, 1927**). Il naît d'un anneau nerveux dans la membrane péristomiale d'où sortent cinq nerfs radiaux sur les axes ambulacraires le long du système vasculaire de l'eau (**Slater et Chen, 2015**). Des cellules tactiles, photo-, mécano- et chimio-sensorielles sont dispersées dans l'épiderme (**Harms, 2012 ; Slater et Chen, 2015**) et bien que les holothuries présentent une sensibilité générale à la lumière, ils n'ont pas d'organes photorécepteurs spécialisés (**Slater et Chen, 2015**). Les pieds tubulaires ont une certaine capacité mécano-sensorielle ou chimio-sensorielle (**Corning et al., 1975**).

Certaines espèces d'holothuries à savoir les Apodida, Elasipoda et Molpadida sont connues pour produire des récepteurs bien définis de gravité ou d'équilibre appelé statocystes placés dans ou sous l'épithélium à l'extrémité antérieure. La présence de ces organes est cohérente avec le mode de vie de ces espèces, dont certaines se déplacent relativement librement et même vigoureusement lors de réflexes de fuite (**Hyman, 1955 ; Corning et al., 1975**).

Le système hémal chez les holothuries est plus complexe par rapport aux autres classes des Echinodermes (**Harms, 2012**), il est bien développé et composé d'un anneau circumœsophagien situé juste derrière l'anneau aquifère, en avant, il donne naissance à cinq vaisseaux hémaux radiaux qui passent le long du pharynx, puis retournent à l'intérieur de la paroi du corps pour atteindre presque l'ouverture cloacale (**Bullough, 1958**). Les vaisseaux hémaux associés à l'intestin peuvent former un maillage complexe avec l'arbre respiratoire gauche, le rete mirabile, suggérant différentes fonctions de transferts de nutriments et de gaz (**Purcell et al., 2012**).

2.1.4. Endosquelette

Les membres du phylum Echinodermata possèdent typiquement une paroi du corps rigide qui contient un endosquelette élaboré composé de calcite riche en Magnésium (CaCO_3) (**Stricker, 1986**). Chez les oursins (classe Echinoidea) et les ophiures (classe Ophiuroidea) (**Figure 1**), les

éléments squelettiques calcifiés ont tendance à être relativement gros et étroitement emballés dans une armure qui enferme complètement les organes internes de l'adulte. Les éléments squelettiques des lys de mer (classe Crinoidea) et de nombreuses espèces d'étoiles de mer (classe Asteroidea) (**Figure 1**) sont également grands et densément répartis, néanmoins, le squelette de ces classes ne couvre pas entièrement les nerfs radiaux et les tissus associés des ambulacres. Chez les holothuries (classe Holothuroidea), une armure solide fait généralement défaut (**Stricker, 1986**). Leur squelette est peu développé et les plaques calcaires sont réduites à des pièces microscopiques éparses à l'intérieur de l'épiderme appelé « sclérites » et ne présentent jamais une disposition régulière (**Mortensen, 1927**). Les sclérites sont formés par des cellules mésodermiques (**Moore, 2006**) et selon les espèces, elles constituent entre 3 à 70 % du poids sec de la paroi du corps de l'holothurie et rendent cette dernière chez certaines espèces rigides et rugueuses au toucher (**Pawson et al., 2010**). Les sclérites affichent une profusion de formes géométriques et sont considérées parmi l'un des caractères taxinomiques les plus importants au niveau générique et spécifique de par leur forme et leur taille (**Pawson, 1970 ; Navarro, 2012 ; Slater et Chen, 2015**). La disposition des différentes pièces calcaires dans la paroi du corps est également souvent importante (**Pawson, 1970**). Elles sont désignées par des termes descriptifs tels que boutons, corbeilles, tables, plaques, bâtonnets, ancres et roues (**Figure 8**) (**Koehler, 1921**).

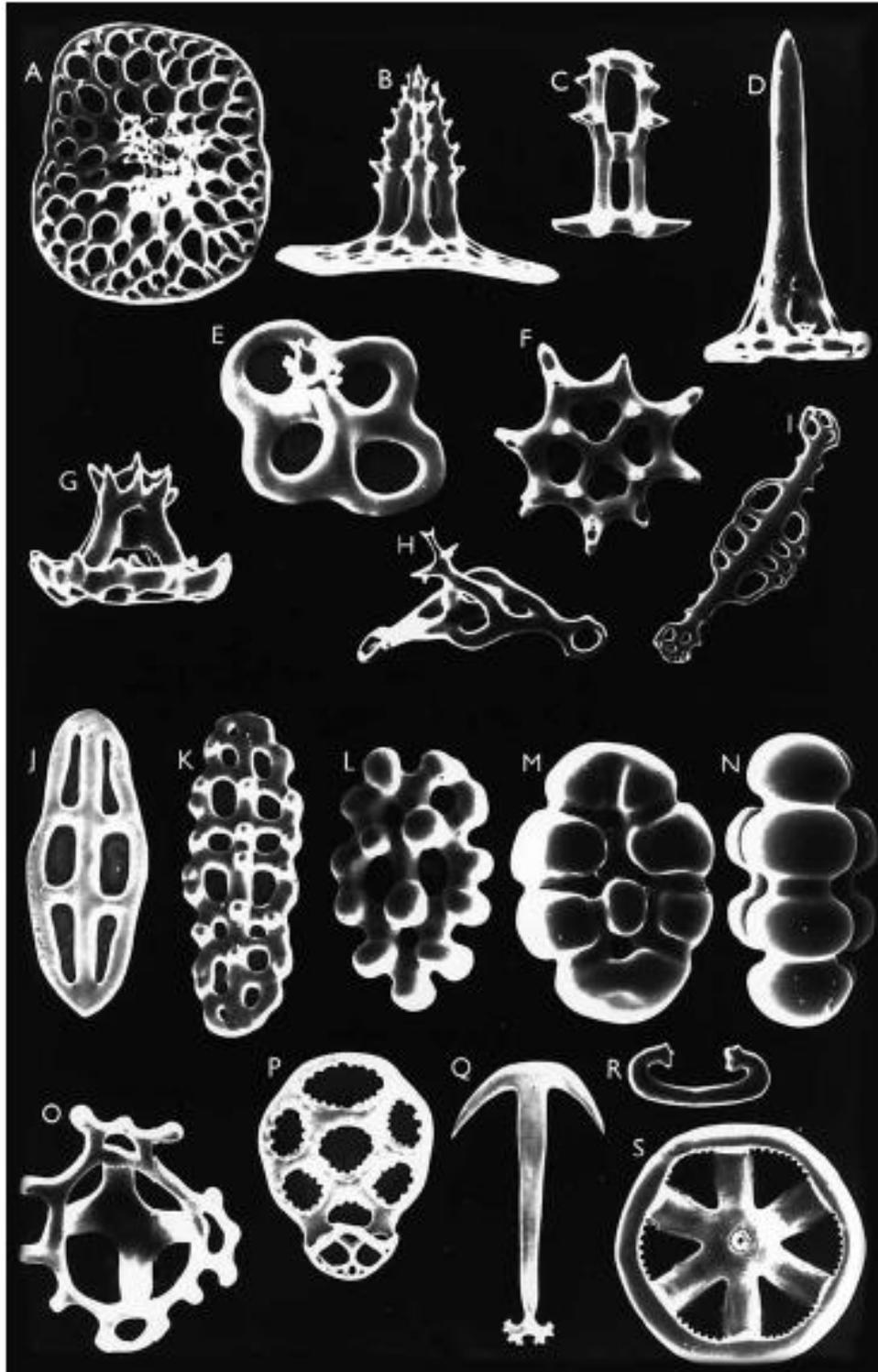


Figure 8: Différents types de sclérites des holothuries. **A-E, G-H.** Tables vues sous différents angles, **F.** Tasse croisée. **I.** Plaque perforée, **J-N.** Boutons lisses et à boutons, **O.** Tasse, **P.** Plaque d'ancrage, **Q.** Ancre, **R.** Bâtonnet en forme de « C », **S.** Roue (*in Pawson et al., 2010*).

2.2. Biologie et écologie

2.2.1. Distribution et habitat

Les holothuries sont distribuées dans toutes les régions océaniques et écosystèmes marins, à toutes les latitudes, des régions polaires aux tropiques et des zones intertidales aux régions profondes (**Perez-Ruzafa et al., 1992 ; Roberts et al., 2000 ; Conand, 2006a**). Ces espèces vivent sur presque tous les types de substrats ; meubles, durs, récifs coralliens, en épibioses sur des plantes ou des invertébrés et associées à des herbiers tel que l'herbier à *Posidonia oceanica* (**Mezali, 2008 ; Purcell et al., 2012 ; Belbachir et al., 2014**). La plupart des holothuries sont épibenthiques, cependant, il existe quelques-unes d'eaux profondes qui sont pélagiques (**Harms, 2012**) ayant le corps ressemblant à une méduse nageant librement. C'est le cas de *Pelagothuria natatrix* Ludwig, 1893 (Ordre Elasipodida) et *Eynyniastes eximia* Théel, 1882 (Ordre Elasipodida) qui sont des espèces pélagiques et benthopélagiques respectivement (**Solís-Marín et al., 2012 ; Selig et al., 2019**).

2.2.2. Reproduction

Les échinodermes sont itéropares (se reproduisent plusieurs fois) et la semelparité (espèces qui se reproduisent une seule fois) n'a été signalée pour aucune espèce (**Pandian, 2018**). La majorité des Holothuroidea sont gonochoriques (les deux sexes sont séparés) mais la plupart ne présentent pas de dimorphisme sexuel et les gonades doivent être examinées au microscope pour déterminer le sexe (**Hyman, 1955 ; Slater et Chen, 2015 ; Pandian, 2018**), cependant, il existe quelques espèces hermaphrodites telles que *Pentactella laevigata* Verrill, 1876 (Ordre Dendrochirotida), *Mesothuria intestinalis* (Ascanius, 1805) (Ordre Holothuriida) et un certain nombre de Synaptidae (**Mortensen, 1927 ; Hyman, 1955**). Chez les gonochores, les bénéfices issus de la recombinaison lors de la gamétogenèse et de la fusion des gamètes de deux individus sexuellement différents lors de la fécondation augmentent la diversité génétique, matière première de l'évolution (**Pandian, 2018**).

2.2.2.1. La reproduction sexuée

En général, le schéma de reproduction des holothuries présente un cycle saisonnier (**Smiley et al., 1991**). La maturité sexuelle est déterminée par des facteurs environnementaux tels que la disponibilité de la nourriture, la densité de population et autres. Par conséquent, l'âge et la taille à la maturité sexuelle varient dans l'espace et dans le temps (**Pandin, 2018**). Les espèces tempérées ont généralement des périodes de frai au printemps et en été en raison de l'élévation de la température à ces saisons dans ces zones (**Hyman, 1955 ; Hamel et al., 1993 ; Mezali et al., 2014 ; Slimane-Tamacha et al., 2019 ; Mezali et al., 2022**), tandis que les espèces tropicales se reproduisent pendant de plus longues périodes tout au long de l'année (**Pearse, 1968 ; Conand, 1993**).

Les holothuries sont ovipares c'est-à-dire qu'elles libèrent leurs cellules sexuelles directement dans l'eau de mer (**Figure 9**) et la fécondation s'ensuit immédiatement (**Hyman, 1955**). Les holothuries utilisent des signaux chimiques pour frayer (**Conand, 2006a**), un principe actif présent dans le liquide coelomique préviscéral est signalé comme induisant la ponte (**Pandin, 2018**). Pour assurer un recrutement plus élevé, les individus doivent être proches et l'émission des spermatozoïdes est synchronisée avec la ponte chez les femelles (**Pandin, 2018**). Lors de la ponte, en particulier chez les Holothuriida, les individus se dressent sur leur partie postérieure en adoptant une position presque verticale suivi d'un balancement d'avant en arrière pendant la libération des gamètes mature vers le milieu (**Samyn et al., 2006 ; Navarro et al., 2012 ; Purcell et al., 2012**). Les mâles sont les premiers à pondre, suivis par les femelles (**Hyman, 1955 ; Conand, 2006a**). Le frai dure ainsi entre 15 minutes à plus de 4 heures selon les espèces (**Hyman, 1955**). Les cellules sexuelles qui sortent du gonopore en un flux lent sont dispersées par des mouvements tentaculaires (**Hyman, 1955**).

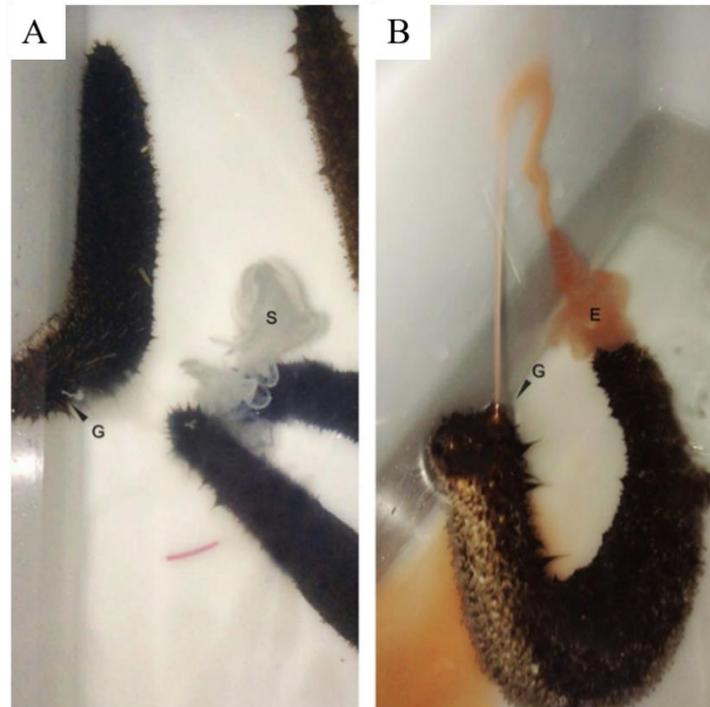


Figure 9: Frai de *Holothuria tubulosa*. **A.** Mâle, **B.** Femelle. **G.** Gonopore, **S.** Sperme, **E.** Œufs (Rakaj *et al.*, 2017).

Les œufs fertilisés (100 et 200 μm) sont portés par le courant puis donnent naissance à une larve *auricularia* qui nage et se nourrit de microalgues, après 12 à 40 jours, elle se développe en une larve *doliolaria* non nourrissante qui durent 24 h avant qu'elle se métamorphose en *pentactula* qui se fixent sur le fond puis donne un stade juvénile précoce (**Figure 10**) (Samyn *et al.*, 2006 ; Zamora et Jeffs, 2013 ; Slater et Chen, 2015). Ce modèle de développement est le plus commun dans les tropiques où les Holothuriidae, les Stichopodidae et les Synaptidae sont les familles dominantes, cependant, chez la grande majorité des familles d'holothuries, le stade *auricularia* est inexistant et le développement passe tout de suite du stade *doliolaria* au stade juvénile (Samyn *et al.*, 2006).

Bien que les holothuries soient ovipares, certaines espèces comme *Leptosynapta minuta* (Becher, 1906), *Synaptula hydriformis* (Lesueur, 1824) et *Chiridote rotifera* (Pourtalès, 1851) de l'ordre Apodida sont vivipares (Mortensen, 1927 ; Cherbonnier, 1953 ; Hyman, 1955 ; Navarro *et al.*, 2012). Ces espèces ont une capacité de copulation et les mâles déposent le sperme directement sur les œufs à travers une papille génitale digitiforme. Cette dernière est fréquemment située entre la paire de tentacules dorsaux. Les femelles n'ont qu'une papille en forme de bouton et

rassemblent les œufs dans cinq poches internes, chacune avec une ouverture externe pour l'activité copulatoire. Il existe donc chez ces espèces un dimorphisme sexuel externe (O'Loughlin *et al.*, 2016).

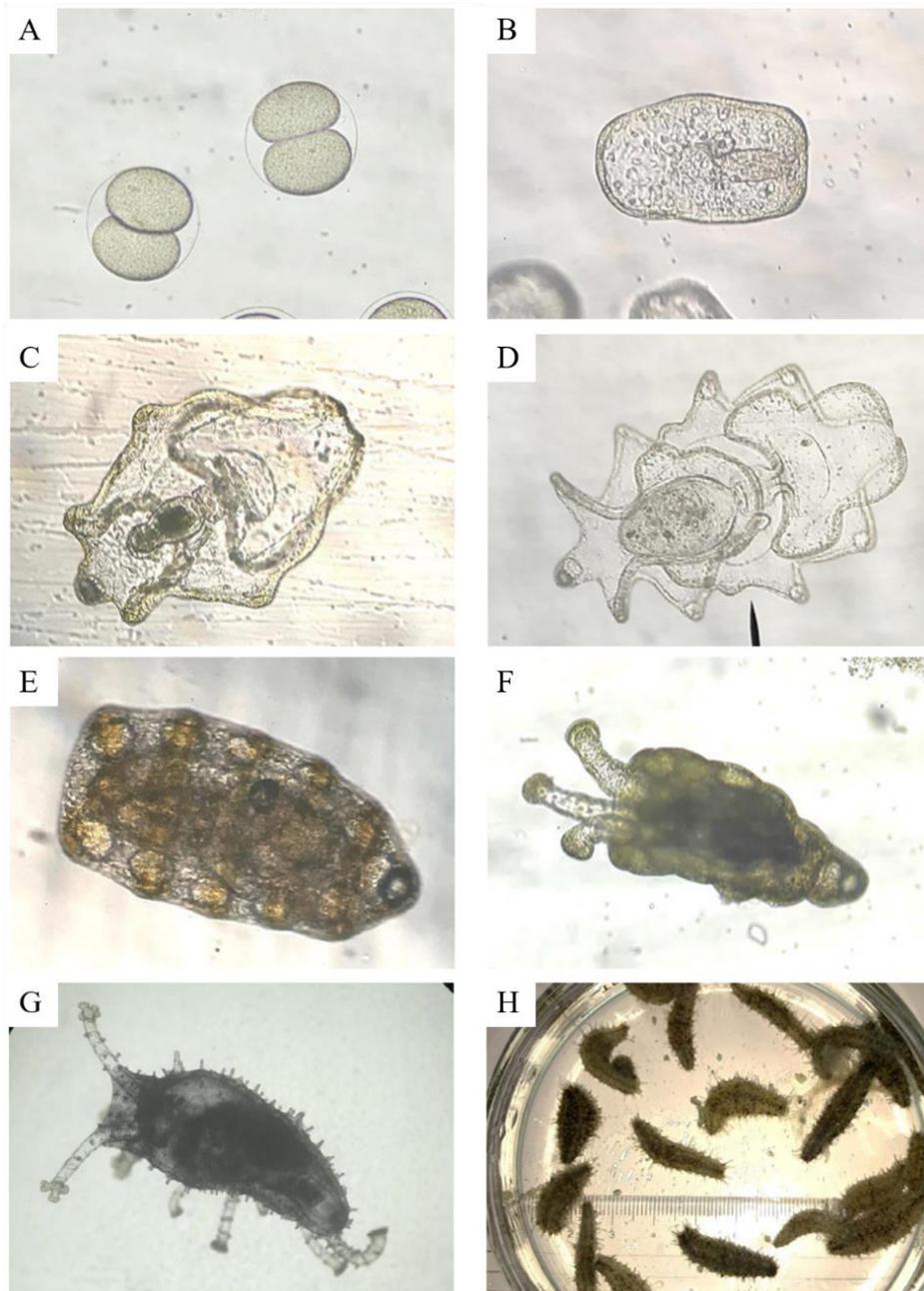


Figure 10: Développement larvaire de *Holothuria scabra*. **A.** Œufs fécondés. **B.** Gastrule. **C.** *Auricularia* précoce. **D.** *Auricularia* tardive. **E.** *Doliolaria*. **F.** *Pentactula*. **G.** et **H.** Juvéniles (Han et Hua, 2022).

2.2.2.2. L'hermaphrodisme

Deux types d'hermaphroditismes existent chez les holothuries à savoir l'hermaphroditisme simultané autofécondant et l'hermaphroditisme séquentiel (**Pandian, 2018**). Dans ce dernier, le changement de sexe se produit naturellement une fois dans la vie des espèces dans une seule direction. En conséquence, les protandres changent de sexe de mâle à femelle et les protogynes le font dans le sens inverse (**Pandian, 2018**). Une protandrie a été signalé chez *Holothuria atra* Jaeger, 1833 (Ordre Holothuriida), *Leptosynapta inhaerens* (O.F. Müller, 1776) (Ordre Apodida), *Leptosynapta clarki* Heding, 1928 (Ordre Apodida) et *Labidoplax media* Östergren, 1905 (Ordre Apodida) (**Sewell, 1994 ; Pandian, 2018**) et une protogynie chez *Cladodactyla crocea crocea* (Lesson, 1860) (Ordre Dendrochirotida) et *Pentactella leavigata* (Ordre Dendrochirotida) (**Pandian, 2018**). Dans l'hermaphroditisme simultané, les œufs et les spermatozoïdes se développent dans la même gonade pouvant entraîner une autofécondation associée à un développement interne et une protection du couvain des embryons, c'est le cas de l'espèce *Pentactella perrieri* (Ekman, 1927) de la famille des Cucumaridae (Ordre Dendrochirotida) (**Figure 11**) (**Mortensen, 1927 ; O'Loughlin et al., 2016 ; Martinez et al., 2020**).



Figure 11: L'hermaphrodisme simultané chez l'holothurie *Pentactella perrieri* (Ordre Dendrochirotida). **A.** Coupes histologiques de *P. perrieri* montrant l'hermaphrodisme dans le même spécimen avec les ovocytes (oo) et les spermatozoïdes (sg) (Echelle = 200 μ m). **B.** *P. perrieri* éviscéré montrant un sac de couvain rempli d'individus couvés et un autre, séparé manuellement du corps et ouvert (bs) avec les individus couvés (br) extraits de l'intérieur à côté (Echelle = 5 mm) (Martínez *et al.*, 2020).

2.2.2.3. La reproduction asexuée

Certaines espèces d'holothuries sont capables de reproduction asexuée par une constriction en deux moitiés qui se régénèrent (**Figure 12A**) (Hyman, 1955 ; Pandian, 2018). Les principaux facteurs qui influencent le taux de reproduction asexuée sont une faible stabilité environnementale, une mortalité élevée, une petite taille individuelle et une faible activité de reproduction sexuelle (Mladenov, 1996 ; Abdel Razeq *et al.*, 2007). Toutes les espèces d'holothuries scissipares actuellement connues appartiennent à deux ordres : Holothuriida et Dendrochirotida où la reproduction asexuée a été décrite pour la première fois (Dolmatov, 2014). La reproduction asexuée chez les holothuries adultes se produit sous forme de fission transversale (architomie) et de fragmentation (Dolmatov, 2014). Trois mécanismes de fission ont été différenciés chez *Ocnus planci* (Ordre Dendrochirotida) à savoir la constriction, la torsion ou l'étirement (Monticelli, 1896). Les holothuries peuvent utiliser différentes combinaisons de ces méthodes et la fission se produit approximativement au milieu du corps chez la plupart des espèces (O'Loughlin *et al.*,

2009 ; Dolmatov *et al.*, 2012 ; Dolmatov, 2014), par conséquent, certains organes internes tels que les intestins, les muscles longitudinaux et la paroi du corps sont rompus (Dolmatov, 2014). Ainsi, le fragment antérieur conserve le système aquifère, les gonades et un ou deux segments de l'intestin (Conand, 1995 ; Dolmatov *et al.*, 2012 ; Dolmatov, 2014) tandis que le fragment postérieur contient le cloaque, une plus grande partie de l'intestin, les arbres respiratoires et les « tubes de Cuvier » lorsqu'ils sont présents (Dolmatov, 2014).

Etant donné que les holothuries sont dotées du pouvoir de régénération, lorsque l'animal est coupé en deux, chaque partie se développe en deux individus entièrement fonctionnels (Figure 12B) (Pandian, 2018). Dans le fragment antérieur, la plaie à l'extrémité postérieure est réparée, la fin de la première partie descendante de l'intestin commence alors à se développer vers l'arrière, le cloaque se développe à l'extrémité postérieure du fragment antérieur. L'ébauche de l'intestin s'allonge et se développe dans le cloaque et l'intégrité du système digestif est restaurée. Les spécimens à ce stade de régénération restaurent les régions terminales des bandes musculaires longitudinales, après la fusion de l'intestin et du cloaque, les ébauches des arbres respiratoires apparaissent sur la face dorsale du cloaque et les arbres respiratoires se développent avec la croissance de l'extrémité postérieure. De l'autre côté, l'événement principal dans le fragment postérieur est la régénération du système aquifère. Tout d'abord, un gonflement du tissu conjonctif, qui représente l'ébauche du système aquifère se forme à l'extrémité antérieure de l'animal et les régions terminales des cordons nerveux radiaux et des canaux hydrovasculaires radiaux se transforment et forment respectivement l'anneau nerveux et le canal hydrovasculaire circulaire autour du complexe aquifère. L'intestin se développe et l'intégrité du système digestif est restaurée. Par la suite, la croissance du corps commence lorsque les organes internes sont formés et l'animal commence à grandir. La durée de croissance du corps varie largement et dépend apparemment des espèces (Dolmatov, 2014).

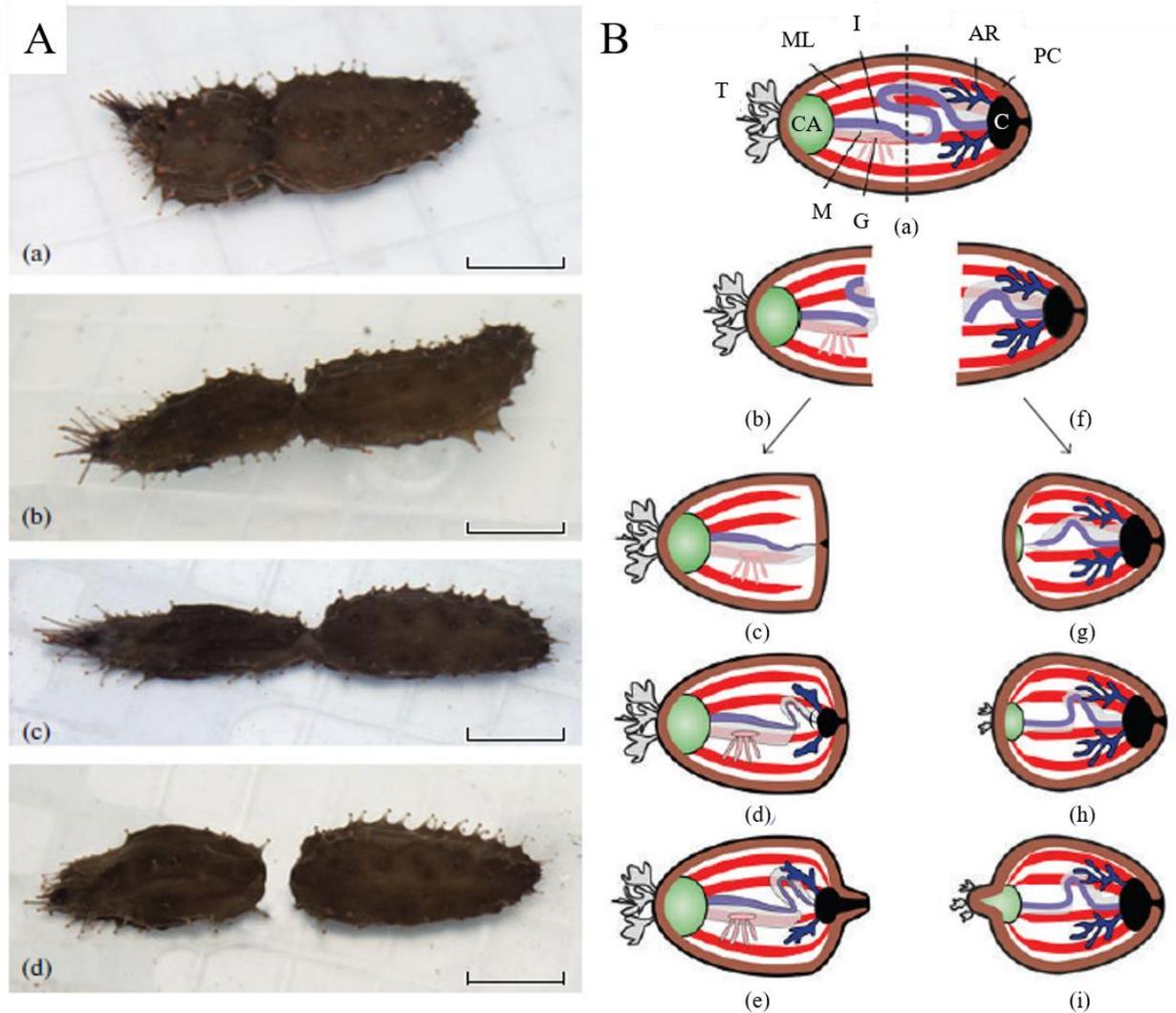


Figure 12: Reproduction asexuée chez les holothuries. **A.** Étapes consécutives de la fission chez l'holothurie *Cladolabes schmeltzii* (Ludwing, 1875) (Ordre Dendrochirotida) (Échelle = 1 cm). **B.** Schéma de régénération des organes internes après fission chez les holothuries. **(a)** Animal avant la fission ; **(b)** Fragment antérieur juste après la scission, **(c)** Formation de l'intestin et du cloaque dans le fragment antérieur, **(d)** Formation des arbres respiratoires dans le fragment antérieur, **(e)** Croissance de la partie postérieure du corps, **(f)** Fragment postérieur juste après la scission, **(g)** Formation du complexe aqua-pharyngien et de rudiments intestinaux dans le fragment postérieur, **(h)** Fragment postérieur avec organes internes régénérés, **(i)** Croissance de la partie antérieure du corps. **CA.** Complexe aqua-pharyngien ; **PC.** Paroi du corps ; **C.** Cloaque ; **I.** Intestin ; **G.** Gonade ; **ML.** Muscle longitudinal ; **M.** Mésentère ; **AR.** Arbre respiratoire ; **T.** Tentacules (Dolmatov, 2014).

2.2.3. Nutrition et mode d'alimentation

Les holothuries emploient une gamme de stratégies d'alimentation et de digestion en fonction de l'environnement particulier auquel elles sont adaptées (**Jangoux et Lawrence, 1982 ; Roberts et al., 2000 ; Slater et Chen, 2015**). La collecte de la nourriture se fait avec les tentacules buccaux qui présentent une grande diversité et où se reflète la spécialisation de l'habitat et de l'alimentation. Les holothuries peuvent être dépositives ou suspensives (**Jangoux et Lawrence, 1982 ; Roberts et al., 2000 ; Harms, 2012 ; Mezali et al., 2003 ; Purcell et al., 2016**). La taille des particules de nourriture est limitée étant donné que le diamètre de l'anneau est d'environ un dixième de la longueur du corps en particulier au stade juvénile précoce (**Slater et Chen, 2015**).

Les dépositives collectent les sédiments et les particules avec leurs tentacules buccaux sur des fonds meubles ou durs. Sur les fonds meubles, les tentacules creusent dans le sédiment et ne prennent que la couche superficielle par ratissage. Sur les fonds durs (rochers ou algues), les tentacules balayent et ramassent les particules de la surface (**Jangoux et Lawrence, 1982 ; Roberts et al., 2000 ; Moore, 2006**). Les sédiments ingérés passent par le tube digestif et sont excrétés sous forme de boulettes fécales « ressemblant à des vers » (**Slater et Chen, 2015**).

Les sédiments ingérés par les dépositives sont composés principalement de composés inorganiques (silice et/ou calcaire), débris organiques (matières animales ou végétales mortes et en décomposition), micro-organismes (bactéries, diatomées, protozoaires, cyanophycées, foraminifères) et des boulettes fécales des holothuries ou d'autres animaux (**Jangoux et Lawrence, 1982 ; Belbachir et al., 2014 ; Belbachir et Mezali, 2018 ; Belbachir et Mezali, 2020a ; Elakkermi et al., 2021**). L'intestin des holothuries dépositives est parfois plein de gros fragments d'herbes marines qui ne sont pas digérés mais supportent des organismes épiphytes dont se nourrissent les holothuries (**Bakus, 1973 ; Belbachir et Mezali, 2018**). Les microorganismes associés aux sédiments, en particulier les bactéries, sont la principale source de nutriments et peuvent influencer la distribution de ces organismes dans une zone benthique (**Bakus, 1968 ; Bakus, 1973 ; Yingst, 1976**). Une corrélation très élevée a été rapportée entre leur taille du corps et la taille des particules ingérées, cette dernière varie également selon l'espèce et la localité (**Bakus, 1973**). En fait, ces espèces se nourrissent sélectivement (de fines ou de grosses particules de sédiments) et sont capables de discriminer les particules riches et pauvres en éléments nutritifs et de sélectionner les plus riches grâce aux récepteurs gustatifs situés sur leurs tentacules (**Mezali et**

al., 2003 ; Ramón *et al.*, 2019), cette sélectivité a pour rôle de réduire la compétition interspécifique entre les espèces benthiques dépositives (Mezali et Soualili, 2013). Les holothuries dépositives sont largement adaptées pour traiter de grandes quantités de sédiments souvent pauvres en nutriments dont elles extraient les composés labiles (Roberts *et al.*, 2000).

Les suspensivores quant à eux, tendent leurs tentacules dans le courant d'eau et piègent le phytoplancton et les micro-organismes qui y adhèrent par la sécrétion muqueuse. Lorsqu'ils sont chargés de particules, ils se contractent et se plient dans la bouche, cette dernière se referme et à mesure que les tentacules sont retirés, la matière alimentaire qui y adhère est essuyée dans le pharynx (Hyman, 1955 ; Roberts *et al.*, 2000 ; O'Loughlin *et al.*, 2016 ; Purcell *et al.*, 2016). Les suspensivores sont de deux types ; actif et passif, les premiers utilisent de l'énergie pour générer des courants tandis que les passifs dépendent exclusivement des mouvements de l'eau ambiante pour faire passer l'eau à travers leurs tentacules (Singh *et al.*, 1998).

La nourriture des holothuries suspensivores est composée de petits végétaux (diatomées, algues unicellulaires), d'animaux (protozoaires, nématodes, copépodes, ostracodes, méduses et larves) et des matières organiques en suspension associées ou non à des matières inorganiques (Hyman, 1955 ; Roberts *et al.*, 2000). Les diatomées représentent une source de nourriture très importante pour les suspensivores car elles ne possèdent pas une paroi cellulaire aussi épaisse que les autres algues (Jørgensen, 1966). Les suspensivores ont tendance à vivre dans des situations à haute énergie et à capturer les particules en suspension dans la colonne d'eau ou juste au-dessous du fond (Roberts *et al.*, 2000).

Les holothuries de l'ordre Dendrochirotida sont des suspensivores qu'on trouve plus fréquemment dans les eaux tempérées et subtropicales peu profondes où la production de phytoplancton est généralement élevée (Pawson, 1970 ; Bakus, 1973). Les cinq ordres d'holothuries restantes sont principalement des dépositives obligatoires que l'on trouve soit dans les eaux tropicales claires, soit en haute mer, où les voies d'alimentation détritique peuvent être plus importantes que dans les eaux peu profondes (Roberts *et al.*, 2000).

2.2.4. Prédation

Les holothuries sont des proies de plusieurs espèces prédatrices, transférant ainsi l'énergie des microalgues et des détritiques organiques aux consommateurs qui sont à des niveaux trophiques plus élevés (Purcell *et al.*, 2016). Bien que les holothuries possèdent des défenses chimiques et des « tubes de Cuvier » gluants (Caulier-Mezali *et al.*, 2016), elles sont consommées par divers prédateurs d'au moins sept embranchements (Purcell *et al.*, 2016) incluant des étoiles de mer, des crustacés, des gastéropodes, des poissons et des tortues de mer (Figure 13) (Francour, 1997 ; Purcell *et al.*, 2016 ; Atkinson *et al.*, 2018 ; Rogers *et al.*, 2020 ; Richard, 2022).

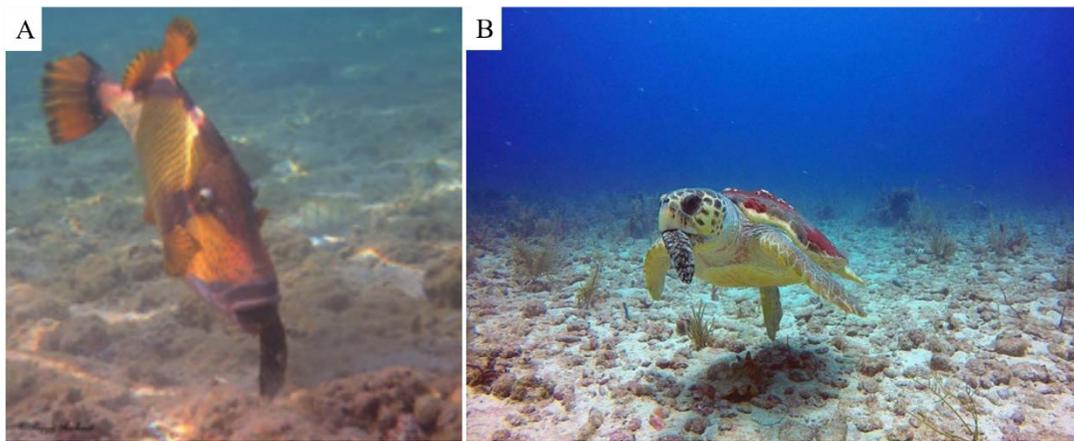


Figure 13: A. Prédation sur l'holothurie *Holothuria leucospilota* par le baliste titan. B. Prédation sur l'holothurie *Holothuria mexicana* par *Caretta caretta* (Rogers *et al.*, 2020 ; Richard, 2022).

2.2.5. Mécanismes de défenses

En réponse aux pressions de prédation, les holothuries ont développé une grande variété de mécanismes de défense. Pour les contrer les prédateurs, les holothuries disposent de trois lignes de défense : morphologique (paroi du corps épaisse et présence de sclérites), comportementale (gonflement du corps, éviscération, autotomie, nage, activité nocturne et comportement cryptique) et chimique avec la présence de substances dissuasives toxiques appelées saponines (détaillées dans les parties suivantes) (Kropp, 1968 ; Bingham et Braithwaite, 1986 ; Francour, 1997). Les réponses comportementales, en particulier l'autotomie et le comportement de nage sont des techniques d'évasion efficaces pour les prédateurs spécialistes (Kropp, 1982 ; Morton, 1991 ;

Francour, 1997) tandis que la défense chimique est utilisée contre les non-spécialistes ou les généralistes (**Bakus, 1968 ; Bingham et Braithwaite, 1986 ; Francour, 1997**).

2.2.5.1. Éviscération et autotomie

La nature de l'éviscération et l'autotomie varient selon la morphologie de l'espèce, certaines procèdent par la fragmentation du corps en deux ou en plusieurs parties tandis que d'autres éjectent leurs viscères ou une partie d'eux (tube digestif ou arbres respiratoires) à travers la paroi du corps (**Bakus, 1973**). Quand elles sont irritées, les holothuries contractent leurs muscles ainsi que leur paroi du corps et étant donné que le liquide dans la cavité corporelle est pratiquement incompressible, l'effet est de créer une énorme pression qui expulse les viscères ou une partie d'eux à travers le cloaque (**Hegner, 1933**). Ce phénomène va dissuader les prédateurs et permet aux holothuries d'effectuer un saut pour s'échapper (**Moore, 2006 ; Mohsen et Yang, 2021**). L'éviscération se produit dans des conditions naturelles (**Mosher, 1956 ; Byrne, 1985**) ainsi qu'en réponse à des signaux environnementaux non naturels ou expérimentaux tels que la manipulation, la température, le pH et l'O₂ (**Russell, 1984**), les chocs électriques (**Kille, 1936**), les produits chimiques (**Pearse, 1909**), la lumière directe du soleil (**Crozier, 1914**) et l'eau sale (**Domantay, 1931**). Dans les conditions naturelles, l'éviscération diminue généralement le métabolisme, ainsi l'holothurie peut être capable de survivre jusqu'à ce que de meilleures conditions environnementales se présentent à nouveau (**Domantay, 1931**). Les holothuries sont connues pour présenter une capacité de régénération étendue et régénérer un large éventail de parties du corps, tel que leur paroi du corps, le système nerveux et les organes internes (**Okada et Kondo, 2019**).

2.2.5.2. Organes de défense « Tubes de Cuvier »

Les « tubes de Cuvier » sont un système de défense très particulier et spécialisé présent chez plusieurs espèces d'holothuries appartenant toutes exclusivement à la famille des Holothuriidae et précisément les genres *Actinopyga*, *Bohadschia* et *Holothuria* (**VandenSpiegel et al., 1995 ; Flammang, 2005**). Lorsqu'elle est stimulée physiquement, l'holothurie courbe son extrémité anale vers l'objet stimulant, expulse quelques tubules par l'anus qui une fois expulsés, sous la pression de l'eau, s'allongent considérablement, augmentent environ 20 fois leur longueur et deviennent

collants au contact de n'importe quel objet (Hyman, 1955 ; VandenSpiegel et Jangoux, 1987 ; Flammang, 2005 ; Samyn *et al.*, 2006). Chez les espèces qui possèdent un « tube de Cuvier », ces derniers sont expulsés avant l'appareil digestif qui ne sort que quelque temps après (Samyn *et al.*, 2006). Comme pour presque tout le reste des organes des holothuries, les « tubes de Cuvier » se régénèrent facilement (Hamel et Mercier, 2014 ; Giribet et Edgecombe, 2020). Ces organes contiennent également une forte concentration de saponines qui sont toxiques (Van Dyck *et al.*, 2010a ; Caulier-Mezali *et al.*, 2016).

2.2.6. Relations symbiotiques

De nombreux organismes infestent les échinodermes en particulier les holothuries (Eckhaut *et al.*, 2004 ; Purcell *et al.*, 2016). Les associés aux holothuries sont soit des commensaux, soit des parasites. Les premiers bénéficient de l'avantage du transport (phorésie) ou de l'abri (inquilinisme) lorsqu'ils sont sur ou à l'intérieur de leur hôte sans qu'il y ait un bénéfice pour ce dernier (Eckhaut *et al.*, 2004 ; Parmentier et Michel, 2013). Pour les parasites, les holothuries représentent des substrats biotiques où ils peuvent vivre et servent parfois de nourriture et/ou de source de développement sans lesquelles, les espèces parasites ne peuvent pas accomplir leur cycle de vie. Les parasites sont toujours nocifs pour leurs hôtes et ils induisent des maladies qui sont dans la plupart du temps non mortelles mais peuvent entraîner la mort dans quelques cas (Eckhaut *et al.*, 2004). Les symbiotes des holothuries sont des commensaux et des parasites d'au moins neuf embranchements (Jangoux, 1990 ; Eckhaut *et al.*, 2004).

2.2.6.1. Hôtes d'endocommenseaux

Les endocommenseaux (Figure 14A) vivent librement dans divers organes et espaces corporels des holothuries, mais principalement dans le tube digestif où ils peuvent sortir de leurs hôtes (Purcell *et al.*, 2016). Les endocommenseaux des holothuries comprennent des espèces de nombreux phylums différents, notamment des protozoaires, des plathelminthes et neuf espèces de poissons (Purcell *et al.*, 2016). Parmi ces derniers on retrouve les espèces de la famille des Carapidae qui présente trois genres [*Onuxodon*, *Carapus* et *Encheliophis* (Eckhaut *et al.*, 2004)]. Les espèces appartenant aux deux premiers genres sont des commensaux utilisant les arbres respiratoires ou la

cavité cœlomique des holothuries comme abri qu'ils quittent pour attraper des proies, ne causant ainsi que de légères blessures en perçant la paroi digestive pour rentrer ou sortir (**Mezali, 1998 ; Parmentier et al., 2000 ; Eeckhaut et al., 2015**). Les associations entre échinodermes et poissons Carapides sont particulièrement intéressantes car elles concernent des relations symbiotiques typiques entre un hôte invertébré et un associé vertébré (**Jangoux, 1990**).

En Méditerranée, *Carapus acus* (Brünnich, 1768), communément appelé « poisson perle » fait partie des espèces qui infestent les holothuries (**Markle et Olney, 1990**). Ce poisson peut vivre en association avec plusieurs espèces du genre *Holothuria* (*H. tubulosa*, *H. poli*, *H. helleri*, *H. sanctori* et *H. stellati*), cependant, il a une préférence pour l'espèce *Parastichopus regalis* (**Meyer Rochow, 1977 ; Mezali, 1998 ; Eeckhaut et al., 2004 ; Parmentier et al., 2006 ; Mezali et Khodja, 2021**).



Figure 14: Relations symbiotiques des holothuries. **A.** Endocommensalisme par *Carapus acus* de *Holothuria tubulosa*. **B.** Deux crabes arlequins *Lissocarcinus orbicularis* ectocommensaux sur la paroi du corps d'*Holothuria scabra*. **C.** Mollusque parasite de la Famille des Eulimidae sur *Holothuria verrucosa* (**Purcell et al., 2016**).

2.2.6.2. Hôtes d'ectocommensaux

De nombreuses espèces ectocommensales (**Figure 14B**) sont connues pour vivre sur des holothuries commerciales. Les ectocommensaux appartiennent à plusieurs phylums et les espèces les plus couramment signalés sont les plathelminthes, les polychètes, les arthropodes (copépodes, crabes et quelques crevettes) et les gastropodes (**Eeckhaut et al., 2004**). La présence de ces espèces sur l'hôte leur permet de se réfugier contre les prédateurs, tout en se nourrissant de sources de

nourritures externes (**Purcell et al., 2016**). Dans certains cas, l'hôte fournit aux commensaux un site de ponte protégé et peut-être considéré comme crucial pour la biologie de leur population (**Mercier et Hamel, 2005 ; Purcell et al., 2016**). Certaines espèces telles que les crabes utilisent les saponines sécrétées par les holothuries pour repérer leurs hôtes (**Caulier et al., 2013**).

2.2.6.3. Hôtes des parasites

De même pour les commensaux, les parasites (**Figure 14C**) peuvent être ectobiotiques ou endobiotiques. Les endoparasites se trouvent le plus souvent dans le tube digestif et les systèmes cœlomique ou hémal des holothuries hôtes (**Jangoux, 1990 ; Eeckhaut et al., 2004**). Des exemples de parasites peuvent être cités tels que certaines espèces de plathelminthes qui rivalisent avec leur hôte pour les nutriments et nagent dans l'intestin ou le liquide cœlomique où ils se reproduisent (**Shinn, 1983**) ; le crabe *Pinnotheres halingi* qui vit dans l'arbre respiratoire d'*Holothuria scabra* et leur induit une atrophie (**Hamel et al., 1999**) ; une autre espèce d'ectoparasite utilise sa trompe pour pénétrer la paroi du corps des holothuries et se nourrit du liquide cœlomique (**Jangoux, 1990**). Ces parasites peuvent également être trouvés dans les gonades telles que les kystes du parasites coccidien (ordre Eucoccidiorida) retrouvé dans les ovocytes de *Apostichopus japonicus* (**Unuma et al., 2020**).

Les espèces du troisième genre de la famille des Carapidae à savoir *Encheliophis* sont considérées comme des parasites (**Parmentier et Das, 2004 ; Parmentier et Michel, 2013**) qui se nourrissent des tissus internes (gonades et arbres respiratoires) de l'hôte (**Arnold, 1953**).

2.3. Rôle écologique

Selon **Purcell et al. (2016)**, les holothuries sont des membres importants des communautés d'invertébrés benthiques, présents dans tous les principaux océans et mers du monde. Les rôles que jouent les holothuries dans les écosystèmes marins varient d'une espèce à l'autre. Ils se résument dans le maintien et l'amélioration de la santé des sédiments, le recyclage des nutriments, la chimie de l'eau, ce qui profite à la santé et à la productivité des écosystèmes, l'augmentation de la richesse spécifique grâce à des symbioses avec des organismes parasites et commensaux plus petits ; et la

formation d'un lien substantiel dans le transfert d'énergie dans les détritiques et les microalgues déposés vers les niveaux trophiques supérieurs des réseaux trophiques marins.

2.3.1. Maintient et amélioration de la santé des sédiments

Le rôle écologique principal des holothuries dépositives est supposé être la bioturbation des sédiments (**Bakus, 1973 ; Massin, 1982**) qui désigne le mélange des couches de sédiments par des organismes (**Purcell *et al.*, 2016**). Cette dernière a de nombreux effets physico-chimiques sur la perméabilité et la teneur en eau des sédiments ainsi que sur la composition particulaire des sédiments supérieurs (**Lohrer *et al.*, 2004 ; MacTavish *et al.*, 2012 ; Purcell *et al.*, 2016**). L'amélioration de la perméabilité des sédiments et le fait que les couches de sédiments inférieurs remontent vers la surface augmentent les concentrations d'oxygène dans les sédiments (**Purcell *et al.*, 2016**) et par conséquent améliorent la production primaire, la biodiversité et la biomasse de l'endofaune (**Purcell *et al.*, 2016**).

Certaines holothuries telles que les Holothuriida restent à la surface des sédiments et perturbent la couche supérieure par ingestion et libération de déjections fécales ainsi que par leur locomotion à travers la surface tandis que d'autres s'enfouissent partiellement ou totalement sous la surface des sédiments mélangeant ainsi les couches de sédiments de surface et souterraine (**Purcell *et al.*, 2016**).

Etant donné que les habitats benthiques peuvent fournir jusqu'à la moitié des nutriments nécessaires à la production primaire dans les mers côtières, la perte à grande échelle des bioturbateurs benthiques pourrait nuire au fonctionnement des écosystèmes marins (**Lohrer *et al.*, 2004 ; Solan *et al.*, 2004**).

Les holothuries en tant que dépositives contribuent dans la voie de régénération et de minéralisation des sédiments de surface (**Purcell *et al.*, 2016**). Presque toutes les holothuries de l'ordre Holothuriida se nourrissent de détritiques organiques mélangés à du sable et du limon dans les quelques millimètres supérieurs des sédiments, et elles défèquent du sable qui est généralement moins riche en matière organique que celui qu'elles ont consommé (**Amon et Herndl, 1991 ; Mercier *et al.*, 1999**) ce qui laisse supposer qu'ils agissent pour nettoyer les sédiments et inhiber la prolifération d'algues (**Amon et Herndl, 1991 ; Mercier *et al.*, 1999 ; Michio *et al.*, 2003 ;**

Paltzat et al., 2008 ; MacTavish et al., 2012). Le volume de sédiments ingérés et déféqués par individu et par an est souvent remarquable (jusqu'à $82 \text{ kg ind}^{-1} \text{ an}^{-1}$) (**Bonham et Held, 1963 ; Francour, 1989 ; Coulon et Jangoux, 1993 ; Uthicke, 1999 ; Mangion et al., 2004 ; Purcell et al., 2016).**

Les holothuries empêcheraient la formation des conditions d'anaérobies (**Nixon, 1995 ; Uthicke, 2001**) en consommant de grandes quantités de matières organiques à l'intérieur des sédiments (**Massin, 1982 ; Moriarty, 1982**). Il a été suggéré que la présence d'holothuries dépositives peut réduire l'accumulation de la matière organique en excès dans les sédiments côtiers où sont installées les fermes aquacoles (**Işgören-Emiroğlu et Günay, 2007 ; Slater et Carton, 2007**). Dans une expérience réalisée sur des sédiments issus de la culture de crevette, le processus d'ingestion et d'excrétion de *H. scabra* a éliminé les composants à fort potentiel de consommation d'oxygène y compris la matière organique (**Kodama et al., 2015**).

2.3.2. Recyclage des nutriments

Les holothuries sont des composants importants d'un système de recyclage benthique (**Figure 15A**), leur présence est bénéfique à la production des microalgues benthiques dans les récifs coralliens et les fèces enrichies en ammonium augmentent la disponibilité des nutriments (**Uthicke, 2001 ; Mangion et al., 2004**).

La digestion des composés riches en Azote (par exemple, les protéines) par les holothuries conduit à sa conversion de la forme organique à la forme inorganique, qui à son tour peut être absorbée par les producteurs primaires comme sources de nutriments (**Wolkenhauer et al., 2010 ; Purcell et al., 2016**). De petites quantités de phosphate sont également libérées (**Uthicke 2001**).

Cela montre la capacité des holothuries à décomposer la matière organique qui est alors probablement plus facilement disponible pour d'autres organismes comme les bactéries. Cette hypothèse confirmerait le rôle clé des holothuries dans le système de recyclage benthique (**Mangion et al., 2004**).

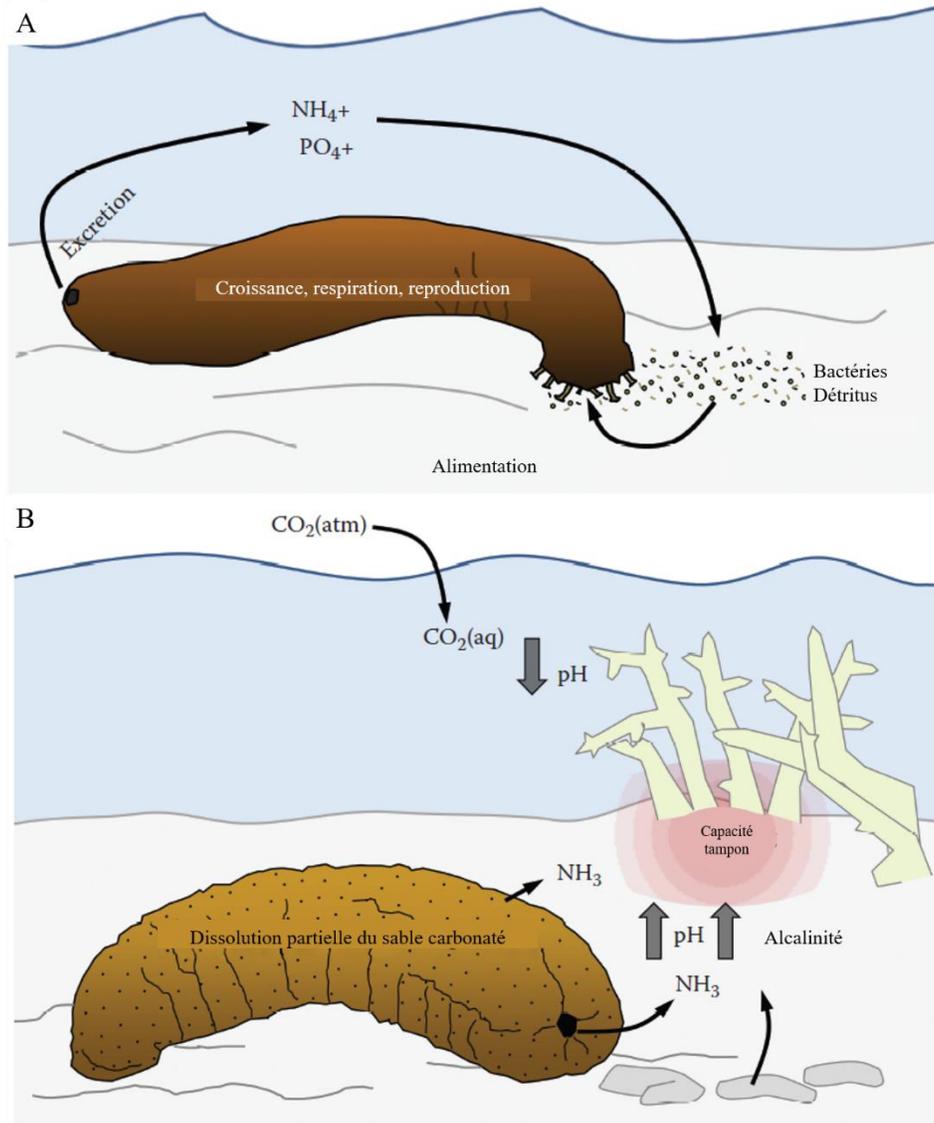


Figure 15: Rôle écologique des holothuries. **A.** Recyclage des nutriments par les holothuries. **B.** Influence potentielle des holothuries sur la chimie locale de l'eau (Purcell *et al.*, 2016).

2.3.3. Influence sur la chimie de l'eau de mer

L'augmentation de l'acidification des océans due aux émissions anthropiques de CO_2 (Kleypas *et al.*, 1999) altère la capacité des espèces calcifiantes à produire du CaCO_3 (Figure 15B) et entraîne une réduction marquée de la calcification des récifs (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2007).

Des études ont indiqué que plusieurs espèces d'holothuries de l'ordre Holothuriida peuvent augmenter l'alcalinité de l'eau de mer par leurs processus digestifs et la libération d'ammoniac, facilitant ainsi la calcification par des organismes associés tels que les coraux et les algues calcaires (**Schneider *et al.*, 2011, 2013**). Ces dépositivores traitent le sable carbonaté et les gravats dans leur tube digestif et dissolvent le CaCO_3 dans le cadre de leur processus de digestion. La dissolution du CaCO_3 et la sécrétion d'ammoniac sont responsables de l'augmentation de l'alcalinité (**Schneider *et al.*, 2011**).

Dans les écosystèmes des récifs coralliens, la libération d'ammoniac par les holothuries fournit potentiellement des nutriments aux symbiotes zooxanthelles des coraux, augmentant potentiellement leur productivité (**Purcell *et al.*, 2016**).

2.4. Pêche et aquaculture

2.4.1. Situation de la pêche

Les Chinois se sont intéressés aux holothuries depuis la dynastie Ming (1368–1644 avant J-C.) (**Chen, 2003**), par la suite elles sont devenues populaires dans les autres pays asiatiques profondément influencés par la culture traditionnelle chinoise telle que la Corée, le Japon, le Vietnam et Singapour (**Liao, 1997**).

Dans le monde, 66 espèces d'holothuries sont couramment exploitées (**Purcell, 2010**). Un grand nombre de communautés côtières à travers le monde exploitent les ressources locales des holothuries pour l'exportation comme source de revenus supplémentaires en raison de la demande chinoise (**Conand et Byrne, 1993 ; Sicuro et Levine, 2011**). Les pêcheries reposent majoritairement sur les espèces appartenant à l'ordre Holothuriida (**Conand, 2004**), en Chine et au Canada une espèce de l'ordre des Dendrochirotida (**Hamel et Mercier, 2008**) et une autre de Molpadida sont également comestibles (**Chen, 2004**).

Au cours des trois dernières décennies, il y a eu une augmentation marquée de l'expansion et du développement de la pêche aux invertébrés dans le monde entier en matière de prises et de valeur (**Conand et Byrne, 1993 ; Conand, 2004 ; Anderson *et al.*, 2011 ; Purcell *et al.*, 2011**). Contrairement au commerce des holothuries en Asie et dans l'Indo-Pacifique qui date d'environ

1000 ans (**Conand, 2001**), l'exploitation commerciale en Amérique du Nord est récente puisqu'elle a commencé dans les années 1970 à la côte Ouest des États-Unis d'Amérique et les années 1980 à la côte Ouest du Canada (**Bruckner, 2005 ; Therkildsen et Petersen, 2006**).

Les principaux pays importateurs de ces espèces sont traditionnellement Hong Kong, Singapour, Taïwan, la Chine et la Malaisie (en plus petites quantités) (**Conand, 1990 ; Conand et Byrne, 1993 ; Conand, 2001 ; Conand, 2004 ; Ferdouse, 2004**). L'Espagne, la France et la Belgique importent également les holothuries mais probablement pour les réexporter plus tard vers d'autres pays, compte tenu de la faible consommation de ces espèces en Europe (**González-Wangüemert et al., 2018a**).

La pêche des holothuries est pratiquée à la main, à la lance, au crochet ou en plongeant en apnée et dans certains cas en plongée sous-marine (**Anderson et al., 2011**), ces techniques sont très sélectives et il n'y a donc pas de prises accessoires (**Conand, 2006a**). Dans quelques cas, le dragage ou le chalutage sont utilisés pour des espèces qui sont trouvées accessoirement avec les crevettes telles que *Holothuria scabra* à Madagascar et *Parastichopus regalis* en Turquie (**Conand, 2006a ; Aydın, 2017**). Au Québec, L'espèce *Cucumaria frondosa* est accidentellement draguées pendant la saison de récolte des pétoncles et renvoyées en mer où la plupart des spécimens meurent (**Hamel et Mercier, 1998**).

Dans les régions tempérées, la sensibilisation du public à la conservation est généralement plus forte et les nouvelles pêcheries, lorsqu'elles ont commencé, elles ont été suivies, surveillées et leur gestion décidée. C'est le cas pour la côte Est et Ouest du Canada et des États-Unis. Au Japon, la pêche d'*Apostichopus japonicus* a également été gérée à l'aide de plusieurs mesures telles que des lois sur la pêche, des permis et un système complexe d'ajustement de la pêche (**Conand, 2006b**).

Dans les régions tropicales, la pêche est à petite échelle et a une grande importance socio-économique pour ces pays moins développés néanmoins, elle n'est pas réglementée. Certaines îles du Pacifique (Fidji, Tonga) ont mis en place des limites de taille légales voire une interdiction en Mozambique et les Iles Salomon. Dans d'autres pays, comme le Mexique, les Galápagos, Cuba et le Venezuela, les pêcheries sont plus récentes et l'attention s'est portée sur leur gestion mais malgré cela, plusieurs conflits ou pêches illégales ont eu lieu pour ces ressources (**Conand, 2006b**).

Avec cet intérêt croissant pour l'holothurie, la productivité des océans est loin de satisfaire la demande actuelle, par conséquent, plus de 70 % des pêcheries d'holothuries dans le monde sont pleinement surexploitées ou épuisées (**Purcell *et al.*, 2011**).

La surexploitation entraîne le risque d'extinction des espèces les plus précieuses sur le plan commercial, avec 16 espèces d'holothuries désormais classées comme « vulnérables » ou « en danger » sur la liste rouge de l'UICN (**Conand *et al.*, 2014a, b**). Une étude de **Purcell *et al.* (2010)** basée sur 69 pêcheries a révélé une incidence alarmante de surexploitation et d'épuisement des stocks d'holothuries, en particulier dans l'Indo-Pacifique (**Figure 16**), dans l'ensemble, 20% des pêcheries sont épuisées, 38% surexploitées, 14% pleinement exploitées sans possibilités d'expansion supplémentaire, 27% sous-exploitées ou modérément exploitées et se trouvent principalement dans les eaux tempérées plus profondes où les pêcheries sont en phase de développement.

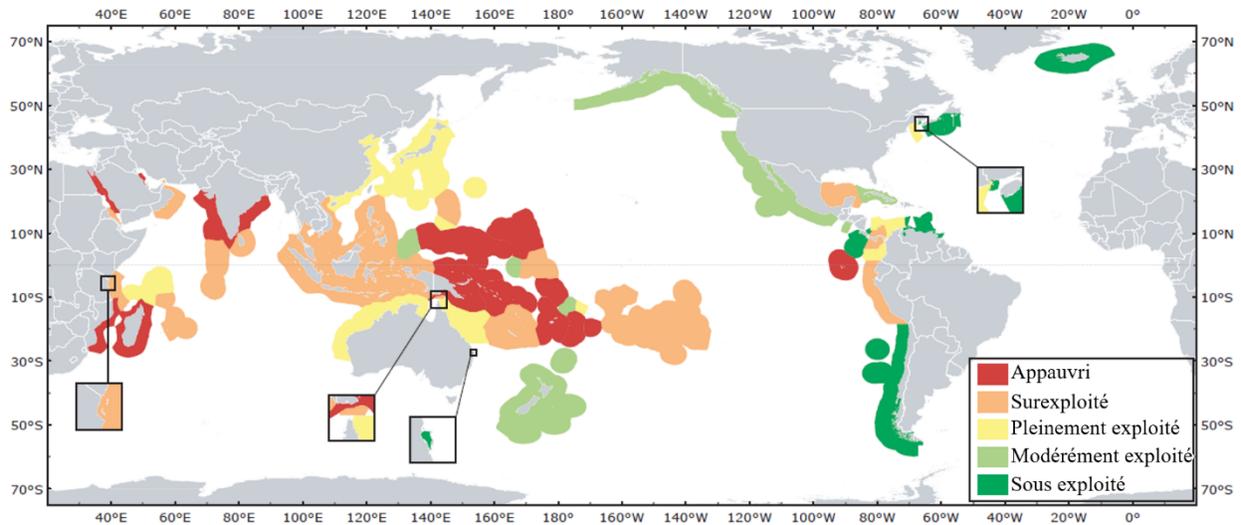


Figure 16: Situation actuelle des pêcheries d'holothuries à l'échelle mondiale (**Purcell *et al.*, 2010**).

Suite à cette surexploitation, les marchés asiatiques se sont intéressés à de nouvelles espèces cibles principalement de l'océan Atlantique Nord Est et de la mer Méditerranée dont l'Italie, l'Espagne, la Grèce et en particulier la Turquie qui monopolise le marché d'exportation (**Conand, 2006a ; González-Wangüemert *et al.*, 2014b ; Marquet *et al.*, 2017**). Les espèces les plus importantes sont *H. poli* et *H. tubulosa* de la mer Méditerranée ; *H. mammata*, *H. sanctori*, *H. forskali* et *Parastichopus regalis* présents à la fois dans la mer Méditerranée et dans l'océan Atlantique Nord-Est ; et *H. arguinensis* qui montre une répartition géographique comprenant la

côte portugaise, la côte Atlantique espagnole, les Iles Canaries, la côte Nord-Ouest de l'Afrique ainsi que la mer Méditerranée où elle a été signalée récemment (à Alicante au Sud de l'Espagne et en Algérie) (**González-Wangüemert et Borrero-Perez, 2012 ; Mezali et Thandar, 2014 ; González-Wangüemert et al., 2018a**).

En Espagne, des pêcheries illégales par des citoyens chinois principalement d'*H. arguinensis* ont été enregistrés depuis 2010 pour approvisionner les restaurants locaux puis l'exploitation a augmenté pour atteindre un maximum de plus de 2 tonnes enregistrées par la police espagnole en 2016 (**González-Wangüemert et al., 2018a**). Cependant, aucune législation n'a été élaborée pour réglementer sa pêche et des entreprises exportent différentes espèces d'holothuries (*H. tubulosa*, *H. forskali*, *H. mammata* et *H. arguinensis*) vers la chine (**González-Wangüemert et al., 2016 ; González-Wangüemert et al., 2018a**).

En Turquie, la pêche d'holothuries a commencé en 1996 avec l'exportation de *P. regalis* (**Aydın, 2008 ; González-Wangüemert et al., 2014b**). Par la suite, d'autres espèces sont devenues cibles telles que *H. tubulosa*, *H. mammata* et *H. poli*. Ces espèces ne sont pas consommées localement et sont destinées à l'exportation vers les pays asiatiques (**Çakli et al., 2004 ; Özer et al., 2004 ; Aydın, 2008 ; Aydın et al., 2011**).

En Algérie, la pêche des holothuries est autorisée par l'arrêté du 16 juillet 2008, les pêcheurs professionnels et les amateurs les utilisent depuis longtemps comme appâts de pêche à la place petits pélagiques et céphalopodes à prix élevé (**Francour, 1997 ; Mezali, 1998**). Néanmoins, leur commercialisation n'est pas autorisée étant donné qu'ils ne sont pas répertoriés dans le texte réglementaire sur les ressources marines vivantes qui définit les tailles minimales autorisées pour les ressources commercialement exploitées (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). Leur exploitation a commencé en 2013 et les individus sont le plus souvent récoltés à la main et en apnée sur substrat meuble ou dur. Lorsqu'ils ne sont plus disponibles à ces faibles profondeurs, les pêcheurs utilisent de petites embarcations motorisées pour les collecter à des profondeurs plus importantes par plongée sous-marine (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). La collecte cible toutes les espèces à savoir *H. poli*, *H. tubulosa*, *H. arguinensis* et *H. sanctori* par ordre de préférence et toutes les tailles (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). Le taux de capture des holothuries le plus élevé est obtenu dans la région Centre (Tipaza et Alger) suivie de Jijel à l'Est et de Chlef à l'Ouest (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). La récolte destructrice des holothuries

a mené l'administration en charge du secteur de la pêche à chercher à déterminer une taille individuelle minimale dans l'espoir de réguler l'exploitation et d'empêcher la surpêche (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**).

2.4.2. Commercialisation et consommation

La consommation d'holothuries est fortement ancrée dans la coutume chinoise en particulier dans les zones côtières ainsi que d'autres pays asiatiques (**Chen, 2003**), ce produit a été signalé pour la première fois comme un aliment tonique (**Chen, 2004**), il est utilisé en médecine traditionnelle et consommé comme un mets délicat (**Conand, 1990 ; Liao, 1997 ; Pandian, 2018**).

La paroi du corps constitue la partie qui est destinée à la consommation humaine et l'épaisseur, la texture des tissus et le goût du derme sont des éléments importants influençant leur valeur sur le marché international, raison pour laquelle, les espèces commerciales sont caractérisées par une paroi épaisse et appartiennent majoritairement à l'ordre des Dendrochirotida et Holothuriida (**Purcell *et al.*, 2011 ; Purcell *et al.*, 2012 ; Slater et Chen, 2015**).

Cette paroi du corps est commercialisée sous différentes formes ; crue, bouillie, congelée, marinée mais le plus souvent, elle est transformée en un produit séché appelé « Trépang » dans l'océan Indien, « Bêche-de-Mer » dans le Pacifique tropical, « Hai-som » par les Chinois et « Iriko » par les Japonais (**Figure 17A**) (**Sloan, 1984 ; Conand, 1990 ; Jangoux, 1990 ; Preston, 1993 ; Ferdouse, 2004 ; Robinson et Lovatelli, 2015 ; Pandian, 2018**). Le prix de la « bêche-de-mer » dépend de la qualité du produit, de la taille de l'espèce ainsi que des manipulations effectuées lors de son traitement tel que la coupe réalisée pour éviscérer les holothuries ou la méthode de sa cuisson (**Purcell, 2014a**). Il oscille entre 50 USD/Kg et 450 USD/Kg, bien que certains d'entre eux puissent atteindre jusqu'à 4 000 USD/Kg sur certains marchés chinois (**Purcell, 2014b ; Robinson et Lovatelli, 2015**). La transformation, traditionnellement artisanale, comporte plusieurs étapes pour obtenir un produit sec de bonne qualité (**Conand, 1990 ; Purcell, 2014b ; Conand, 2017**).



Figure 17: A. « Bêche-de-mer » au marché des fruits de mer séchés à Hong Kong (Robinson, 2013). B. « Espardenyes », plat Catalan préparé à base de muscles longitudinaux de *Parastichopus regalis* (<https://www.atlasobscura.com/foods/espardenyes-sea-cucumbers-catalonia>).

Ce traitement en « bêche-de-mer » est complexe mais en général, il consiste en l'éviscération, le salage, l'ébullition et le séchage (Lavitra *et al.*, 2008 ; Aprianto *et al.*, 2019). Plusieurs méthodes de transformation existent et diffèrent principalement en fonction des espèces étant donné que la chair de chaque espèce a un caractère différent et nécessite ainsi un traitement différent pour produire un produit de bonne qualité (Aprianto *et al.*, 2019).

Purcell (2017) a décrit deux méthodes de préparation de la « bêche-de-mer » dans les régions pacifiques, la première comprend 1) La cuisson des holothuries dans de l'eau de mer ; 2) Refroidissement dans l'eau froide ; 3) Découpage adéquat pour l'éviscération ; 4) Salage avec le gros sel et enfin 5) Deuxième cuisson dans l'eau de mer. La seconde méthode diffère par l'enchaînement des étapes, les holothuries sont d'abord éviscérées, salées puis cuites dans l'eau de mer. Dans les deux méthodes, les individus sont par la suite fumés, séchés, cuits autant de fois qu'il le faut puis séchés et conservés. Dans la région de Toliara, d'autres méthodes sont utilisées pour transformer les holothuries en « bêche-de-mer ». Les transformateurs grattent les holothuries avec la pierre ou les traitent avec les feuilles de papaye broyées pour enlever les sclérites du tégument grâce à l'action de la papaine (Lavitra *et al.*, 2008).

Il existe différents produits et sous-produits qui peuvent être obtenus à partir de différentes parties des holothuries autres que la paroi du corps et sont disponibles sous différents noms commerciaux :

- « Konowata », un aliment japonais typique, créé à partir d'intestins salés, qui est vendu pour environ 60 USD/Kg (**Conand, 2006a ; Robinson et Lovatelli, 2015**) ;
- « Konoko » et « Hoshiko », gonades femelles fraîches et séchées, atteignant 200 USD/Kg (**Conand, 2006a ; Robinson et Lovatelli, 2015**) ;
- « Espardenya » ou « Ilongo » qui sont les bandes musculaires internes de *Parastichopus regalis* en Espagne et qui atteignent 130 EUR/Kg (**Figure 17B**) (**Ramón et al., 2010**) ;
- « L'huile de gamat » en Malaisie (**Baine et Choo, 1999**).

En Algérie, Les holothuries commercialisées sont vendues frais ou transformées en « bêche-de-mer » à un prix qui varie d'une wilaya à une autre, il dépend également de la demande, de la taille, de la disponibilité et de la destination des produits, il varie de 200 à 700 DZD/Kg (1,5 à 5,9 €/Kg), tandis que le prix des spécimens séchés « bêche-de-mer » varie de 4 800 à 12 000 DZD/KG (36 à 90 €/Kg) (**Mezali et Slimane-Tamacha, 2020**). Le produit frais ou ses dérivés n'ont jamais existé sur le marché local. Selon une enquête en ligne menée par **Mezali et al. (2021)** sur 453 personnes, les consommateurs algériens ne connaissent pas cette ressource et ont tendance à favoriser les espèces de poissons. Néanmoins, en portant à leur connaissance les bienfaits des holothuries, presque 80% étaient pour l'idée de le goûter. Par la suite et dans le but de sensibiliser et d'introduire ce produit dans le régime alimentaire de la population algérienne, une séance de dégustation a été organisée où quatre plats ont été préparés à base de « bêche-de-mer » à savoir « L'holothurie à la sauce blanche », « Salade d'holothurie marinée », « Le bourek au holothuries » et « Les boulettes d'holothuries hachées » (**Belkacem et Mezali, 2022**). Ces plats ont été appréciés par 93 % des participants (n = 42) qui ont exprimé leur volonté à les introduire dans leurs habitudes alimentaires (**Belkacem et Mezali, 2022**).

2.4.3. Holothuriculture

La valeur commerciale des holothuries est en constante évolution et l'augmentation de la pression de pêche a entraîné un risque élevé pour les populations sauvages. Dans ce contexte, l'élevage de ces espèces pourrait augmenter l'approvisionnement du marché, relâchant ainsi les pressions sur les populations sauvages (**Chatzivasileiou et al., 2019**). L'aquaculture d'holothuries a commencé en Chine dans les années 1980 pour : 1) approvisionner le marché asiatique en « bêche-de-mer » ; 2) compenser la réduction des stocks sauvages et 3) permettre le repeuplement pour renforcer les

populations épuisées (**Chen, 2004**). L'aquaculture commerciale et expérimentale actuelle des holothuries, vraisemblablement en raison de l'accessibilité et de la valeur commerciale, est limitée aux holothuries intertidales et subtidales de grande valeur, principalement l'espèce tempérée *Apostichopus japonicus* et l'espèce tropicale *Holothuria scabra* (**Slater et Chen, 2015**). Traditionnellement, les holothuries ont été élevées dans des étangs en terre, dans des systèmes d'élevage en mer et dans des systèmes de polyculture avec d'autres espèces (**Domínguez-Godino et González-Wangüemert, 2019**).

L'aquaculture multi-trophique intégrée (AMTI) est une approche écosystémique de l'aquaculture qui s'est avérée respectueuse de l'environnement, principalement dans les eaux tempérées (**Troell et al., 2003**). Le système AMTI est basé sur le concept que les déchets constitués d'aliments non consommés, d'excréments et de produits métaboliques d'une espèce peuvent être utilisés comme intrants pour la croissance d'une autre espèce, fonctionnant dans un cycle d'autonettoyage naturel (**Chopin et al., 2001 ; Jena et al., 2017**).

L'utilisation d'holothuries dans l'aquaculture multi-trophique intégrée a été tentée dans diverses parties du monde étant donné que plus de leur valeur économique élevée dans le monde entier, elles consomment dans une large mesure des sédiments, des détritiques et de la matière organique produites par des espèces de poissons et de crustacés élevés dans des fermes aquacoles comme source de nourriture diminuant ainsi les déchets rejetés dans le milieu benthique (**Figure 18**) (**Tolon et al., 2017 ; Chatzivasileiou et al., 2019**). Plusieurs études ont prouvé leur compatibilité avec ce type d'élevage et sont devenues un élément indispensable des systèmes d'AMTI pour leur rôle important dans la bio-conversion des déchets organiques excrétés par les fermes piscicoles (**Cranford et al., 2013 ; Capinpin Jr et al., 2020 ; Bayoğullari et Tolon, 2021**). Les holothuries peuvent être intégrées avec plusieurs espèces d'élevage tel que les ormeaux, les algues, les oursins, les crevettes et les bivalves et il est reporté que les holothuries montrent un taux de survie élevé et une bonne croissance (**Mills et al., 2014 ; Capinpin Jr et al., 2020 ; Bayoğullari et Tolon, 2021**).

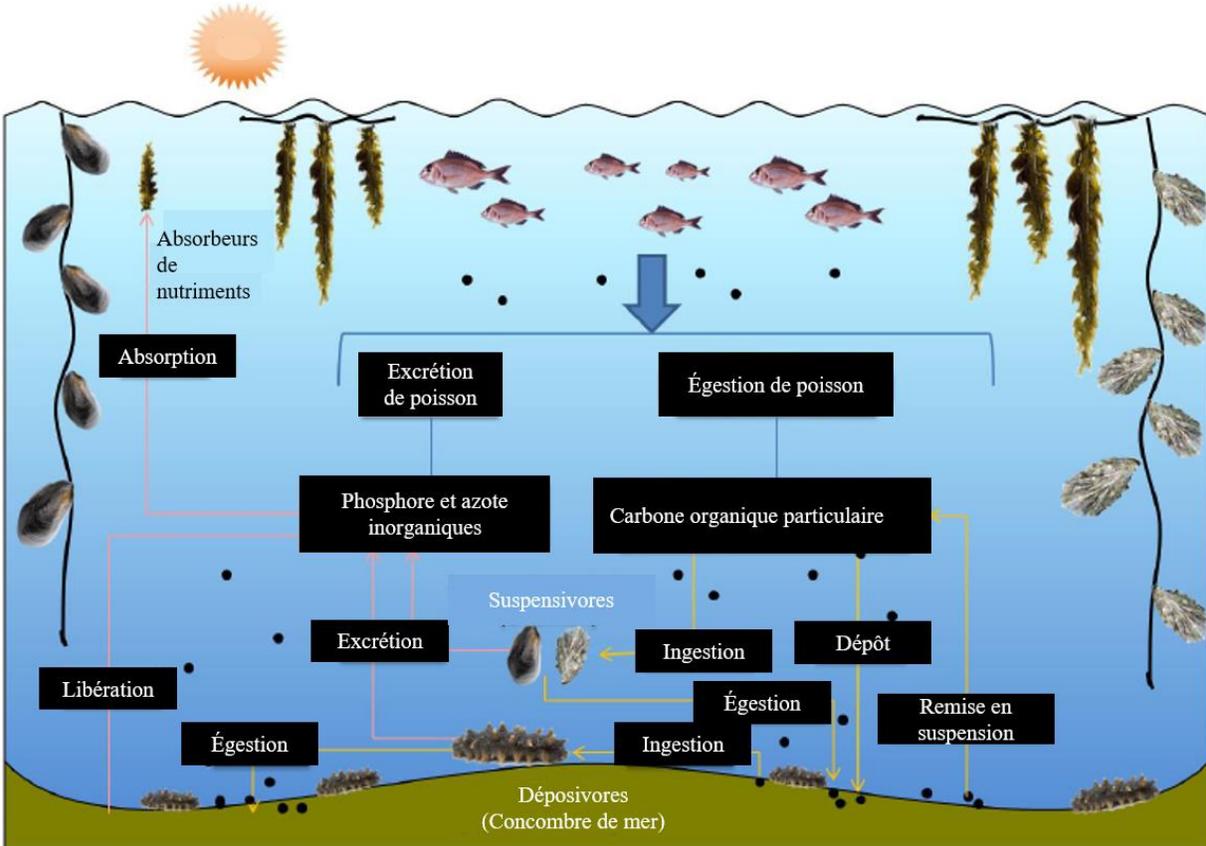


Figure 18: Cycle schématisé des nutriments dans un système d'aquaculture multi-trophique intégré (Zhang *et al.*, 2019).

2.5. Valeur nutritionnelle, nutraceutique et cosmétique

Au cours des dernières décennies, le concept d'aliments fonctionnels a offert une approche nouvelle et pratique pour atteindre une santé optimale en favorisant l'utilisation des produits naturels aux bienfaits physiologiques réduisant ainsi le risque de diverses maladies chroniques (Webb, 2006 ; Shahidi, 2009). La plupart des aliments fonctionnels et des agents thérapeutiques actuellement disponibles sont dérivés directement ou indirectement de sources naturelles, en particulier des plantes alimentaires terrestres et des espèces marines (Hu, 2005 ; Shahidi, 2009 ; Guérard, 2010). En raison de la riche biodiversité océanique, les organismes marins sont des sources précieuses d'aliments nutritifs et représentent de nouveaux réservoirs de composants biologiquement actifs (Blunden, 2001 ; Hu, 2005 ; Guérard, 2010). Les holothuries sont l'un des

animaux marins potentiels à haute valeur alimentaire et médicinale (**Bordbar *et al.*, 2011 ; Sicuro et Levine, 2011 ; Mohsen et Yang, 2021**).

Du point de vue nutritionnel, les holothuries sont considérées comme un aliment précieux car ils contiennent des nutriments importants pour la physiologie humaine. Leurs compositions organiques et non organiques varient selon les espèces, la saison, l'habitat et probablement l'ontogénèse (**Khotimchenko, 2015**). Ces espèces sont un tonique idéal et ont un profil impressionnant de nutriments de grande valeur tels que la vitamine A, la vitamine B1, la vitamine B2, la vitamine B6 et les minéraux, en particulier le Calcium, le Magnésium, le Fer et le Zinc (**Chen, 2003 ; Çakli *et al.*, 2004**).

Les holothuries contiennent une combinaison intéressante d'acides aminés précieux dont la Glutamine, l'Asparagine, l'Alanine et l'Arginine (**Wen *et al.*, 2010 ; Khotimchenko, 2015**). En raison de la présence de ces acides aminés, les holothuries ont une fonction remarquable dans la régulation immunitaire (**Zhao *et al.*, 2008**). Leurs protéines sont également caractérisées par une faible valeur du rapport Lysine/Arginine et donc un effet hypocholestérolémique (**Wen *et al.*, 2010 ; Khotimchenko, 2015 ; Roggatz *et al.*, 2015 ; González-Wangüemert *et al.*, 2018b ; Roggatz *et al.*, 2018**).

Le profil lipidique des holothuries varie selon les espèces. A part quelques exceptions, les espèces montrent une quantité inférieure d'acides gras monoinsaturés par rapport aux acides gras saturés (SFA) et aux acides gras polyinsaturés (PUFA) (**Wen *et al.*, 2010 ; Mecheta *et al.*, 2020**).

La médecine traditionnelle chinoise vante les mérites des holothuries, notamment pour les douleurs articulaires, les problèmes urinaires et certains cancers (**Chen, 2004 ; Bordbar *et al.*, 2011 ; Fabinyi, 2011**). Elles ont été bien reconnues comme remède tonique et traditionnel dans la littérature chinoise et malaisienne pour leur efficacité contre l'hypertension, l'asthme, les rhumatismes, les coupures et les brûlures (**Chen, 2003 ; Wen *et al.*, 2010 ; Bordbar *et al.*, 2011**).

Plusieurs activités biologiques et pharmacologiques uniques telles que l'activité anti-angiogénique (**Tian *et al.*, 2005**), anticancéreuse (**Roginsky *et al.*, 2004 ; Janakiram *et al.*, 2015**), anticoagulante (**Chen *et al.*, 2011**), anti-hypertenseur (**Zhao *et al.*, 2007**), anti-inflammatoire (**Kareh *et al.*, 2018**), antimicrobienne (**Sukmiwati *et al.*, 2019**), antioxydante (**Wulandari *et al.*, 2021**), antitumorale (**Tian *et al.*, 2005 ; Ru *et al.*, 2022**) et cicatrisante (**Miguel-Ruiz et García-**

Arrarás, 2007) ont été attribuées à des composés chimiques extraits de différentes espèces d'holothuries. Plus récemment, malgré leur utilisation comme ingrédients dans les aliments et les médicaments, un marché a émergé pour leur utilisation dans le domaine cosmétique (**Siahaan et al., 2017**).

Les bienfaits médicaux et les fonctions de santé des holothuries peuvent être attribués à la présence de quantités appréciables de composés bioactifs (**Figure 19 ; Tableau 2**), en particulier les glycosides triterpéniques (saponines) (**Van Dyck et al., 2010a, 2010b ; Caulier et al., 2011 ; Caulier-Mezali et al., 2016**), les sulfates de chondroïtine (**Vieira et al., 1991**), les glycosaminoglycanes (**Pacheco et al., 2000**), les polysaccharides sulfatés (**Mourão et Pereira, 1999**), des stérols (glycosides et sulfates) (**Goad et al., 1985**), des composés phénoliques (**Mamelona et al., 2007**), des peptides (**Rafiuddin Ahmed et al., 2004**), des fucoïdanes (polysaccharides sulfatés) et des lectines (**Mojica et Merca, 2004**).

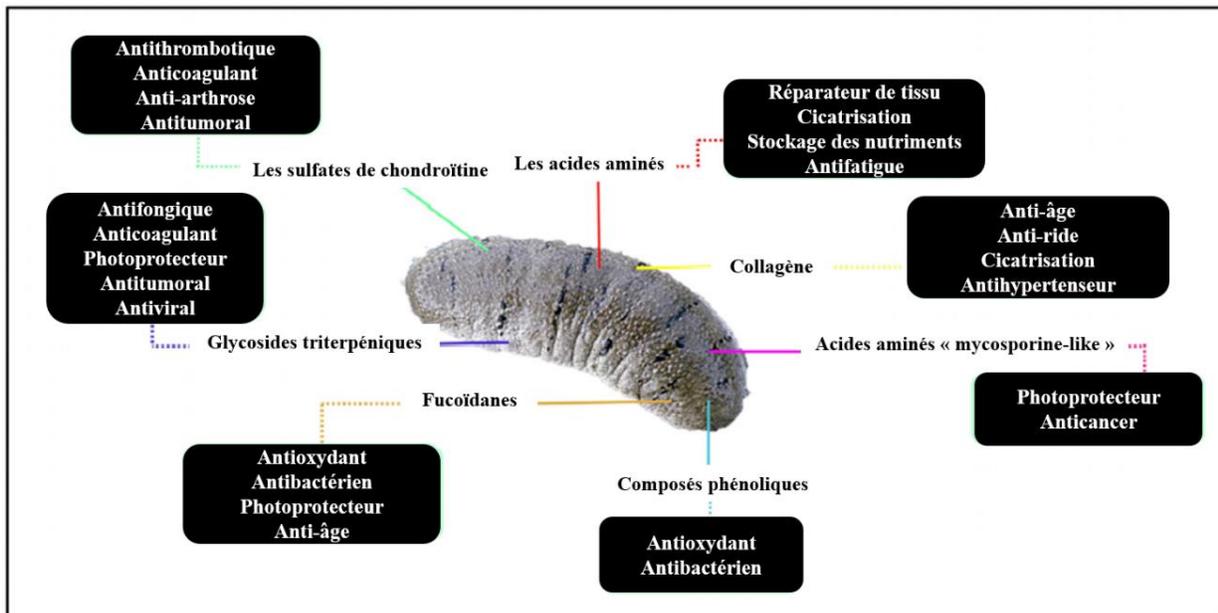


Figure 19: Composés bioactifs des holothuries et leurs activités biologiques (**Siahaan et al., 2017**).

Tableau 2: Activités pharmacologiques et médicinales des composés bioactifs des holothuries.

Espèce	Composés bioactifs	Activité pharmacologique et médicinale	Références
<i>Pentacta quadrangularis</i>	Saponines sulfatées (Philinospide A)	Anti-angiogénique	Tian <i>et al.</i> (2005) ; Tong <i>et al.</i> (2005)
<i>Holothuria scabra</i> , <i>Holothuria leucospilota</i> , <i>Stichopus chloronotus</i> <i>Cucumaria frondosa</i> <i>Acaudina molpadioides</i>	Phénols Polypeptides de collagène	Antioxydante	Mamelona <i>et al.</i> (2007) ; Althunibat <i>et al.</i> (2009) ; Jin <i>et al.</i> (2019)
<i>Mensamria intercedens</i> <i>Cucumaria frondosa</i> <i>Apostichopus japonicus</i> <i>Pearsonothuria graeffei</i>	Saponines	Anticancéreuse	Zou <i>et al.</i> (2003) ; Ogushi <i>et al.</i> (2005) ; Janakiram <i>et al.</i> (2010) ; Zhao <i>et al.</i> (2010)
<i>Ludwigothurea grisea</i> <i>Holothuria edulis</i>	Sulfate de chondroïtine fucosylé Fucane sulfaté	Anti-coagulante	Mourão <i>et al.</i> (1996) ; Wu <i>et al.</i> (2015)
<i>Cucumaria frondosa</i> <i>Psolus patagonicus</i> <i>Stichopus ocellatus</i>	Peptides Saponines Saponines, alcaloïdes et composés phénoliques	Anti-microbienne Antifongique Antibactérienne	Beauregard <i>et al.</i> (2001) ; Murray <i>et al.</i> (2001) ; Sukmiwati <i>et al.</i> (2021)
<i>Holothuria leucospilota</i> <i>Pentacta quadrangularis</i> <i>Cucumaria frondosa</i>	Protéine Saponines sulfatées (Philinospide A) Saponines monosulfatées	Antitumorale	Tong <i>et al.</i> (2005) ; Aminin <i>et al.</i> (2010)
<i>Staurocucumis liouvillei</i> <i>Stichopus chloronotus</i>	Saponines trisulfatées Acides gras	Antivirale Cicatrisation des plaies	Maier <i>et al.</i> (2001) Fredalina <i>et al.</i> (1999)

Une proportion majeure (environ 70 %) des protéines de la paroi du corps des holothuries est constituée de collagène qui est reconnu comme un composant précieux dans les tissus conjonctifs (Saito *et al.*, 2002 ; Rafiuddin Ahmed *et al.*, 2004). Il peut être converti en gélatine par ébullition, pour agir comme une substance bioactive fonctionnelle (Zhao *et al.*, 2007). Le collagène a été largement utilisé dans des applications industrielles, en particulier dans l'alimentation, les produits pharmaceutiques et les cosmétiques. La plupart du collagène industriel est produit à partir d'origine animale terrestre. Cependant, l'utilisation de collagène et de gélatine de cette origine a diminué en raison de la transmission de maladies animales et des restrictions religieuses. À l'heure actuelle, l'utilisation de collagène dérivé de sources marines est devenue une nouvelle tendance (Siahaan *et al.*, 2017) et plusieurs produits alimentaires, nutraceutiques et cosmétiques à base de collagène issu des holothuries sont actuellement disponibles sur le marché (Figure 20).



Figure 20: Produits commerciaux développés à base de collagène des holothuries (Senadheera *et al.*, 2020).

Chapitre I.2 : Les glycosides triterpéniques (saponines)

Chapitre I.2 : Les glycosides triterpéniques (saponines)

1. Généralités

Les saponines sont une classe importante de produits naturels isolés pour la première fois des diverses plantes supérieures où elles sont largement répandues (**Li et al., 2006**). En effet, le nom « saponine » provient de « *sapo* » en latin qui veut dire « savon » car ils possèdent des propriétés tensioactives et créent des mousses stables et savonneuses lorsqu'ils sont agités dans une solution aqueuse (**Hostettmann et Marston, 1995**). En raison de leur grande variété d'activités biologiques et pharmacologiques, les saponines végétales font partie des composés les plus efficaces de la médecine populaire chinoise (**Guo et al., 2006**). En milieu marin, les holothuries (dont l'Ordre des Holothuriida et Dendrochirotida) (**Nigrelli, 1952 ; Yamanouchi, 1955**), les étoiles de mer (**Mackie et Turner, 1970 ; Mackie et al., 1970**) et les éponges (**Pawlik, 1993**) sont les seuls organismes dans lesquels des saponines ont été trouvées jusqu'à présent et les échinodermes abritent de loin la plupart des 350 composés de saponines signalés (**Kamyab et al., 2020**).

2. Structures

Les saponines sont de nature amphiphile et comportent deux parties : l'aglycone (lipophile et liposoluble) et le glycone (hydrophile et hydrosoluble) (**Mondol et al., 2017 ; Khotimchenko, 2018 ; Kamyab et al., 2020**) relié par une liaison β -glycosidique (**Zhao et al., 2018**).

Selon l'aglycone appelé également génine ou sapogénine, les saponines sont divisées en trois classes majeures ; les glycosides triterpéniques, les glycosides stéroïdiens et les glycosides alcaloïdes stéroïdiens (**Hostettmann et Marston, 1995**). Les aglycones triterpènes sont retrouvés chez les holothuries et contiennent 30 atomes de carbone, les aglycones stéroïdiens sont retrouvés chez les étoiles de mer et comptent 27 atomes de carbone tandis que les aglycones alcaloïdes stéroïdiens présentent un atome d'azote (**Kerr et Chen, 1995 ; Savarino et al., 2021**). Chez les holothuries, les aglycones triterpéniques de deux types sont retrouvés ; holostane ayant une caractéristique structurelle 3β -hydroxy- 5α -lanostano- $\gamma(18,20)$ -lactone et non holostane n'ayant pas de $\gamma(18,20)$ -lactone (**Maier, 2008 ; Mondol et al., 2017**). Selon la position de la double liaison dans le cycle B et C de l'aglycone (**Figure 21B**), les aglycones de type holostane peuvent être subdivisés en trois groupes : les aglycones avec le 3β -hydroxyholost-7(8)-ène, 3β -hydroxyholost-9(11)-ène, et 3β -hydroxyholost-8(9)-ène (**Mondol et al., 2017**).

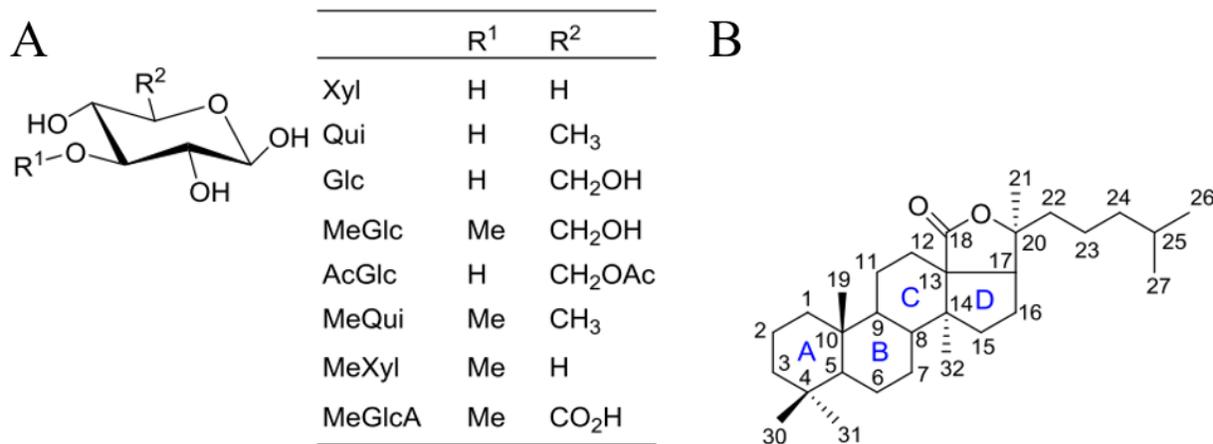


Figure 21: Structure des composants des saponines d'holothuries. **A.** Structure des différentes possibilités de glycone monosaccharide. **B.** L'holostane aglycone portant une 18(20)-lactone (**Bahrami et Franco, 2016**).

Les aglycones triterpéniques des holothuries et stéroïdiens des étoiles de mer sont synthétisés du squalène. Chez les étoiles de mer, le squalène est cyclisé en lanostérol qui cède la place aux saponines stéroïdiennes. Cependant, chez les holothuries, le squalène est cyclisé en parkéol qui est ensuite réarrangé pour former l'aglycone le plus abondant à savoir l'holostanol (**Lucinda Cordeiro et Djerassi, 1990 ; Mitu et al., 2017**). Ces deux squelettes aglycones diffèrent par la position de la double liaison qui est positionnée entre C8 et C9 dans le lanostérol et entre C9 et C11 dans le parkéol (**Watson, 1971**).

La partie glycosidique peut contenir jusqu'à six unités de monosaccharides liées de manière covalente au C-3 de l'aglycone. Les fragments de sucre sont principalement constitués de D-xylose (Xyl), D-quinovose (Qui), D-glucose (Glc), 3-O-méthyl-D-glucose (MeGlc), 3-O-méthyl-D-xylose (MeXyl) et parfois de 3-O-méthyl-D-quinovose (MeQui), acide 3-O-méthyl-D-glucuronique (MeGlcA) et 6-O-acétyl-D-glucose (AcGlc) (**Figure 21B**) (**Bahrami et Franco, 2016 ; Mondol et al., 2017 ; Kamyab et al., 2020**). Dans la chaîne glucidique, la première unité de sucre est toujours un Xylose et la deuxième, majoritairement, est le quinovose, tandis que le 3-O-méthyl-D-glucose et/ou le 3-O-méthyl-D-xylose sont toujours les unités monosaccharidiques terminales. La présence de deux résidus de quinovose dans une chaîne glucidique est unique pour les glycosides d'holothuries et d'étoiles de mer (**Mondol et al., 2017**). Tous les monosaccharides

sont présents sous la forme pyranose et les liaisons glycosides ont la configuration β (**Stonik et Elyakov, 1988**).

Soixante pour cent des glycosides triterpéniques isolés jusqu'à présent des holothuries ont des groupes sulfate liés aux unités monosaccharidiques de la chaîne glucidique. La plupart d'entre eux sont monosulfatés, mais de nombreux glycosides di- et trisulfatés ont également été isolés (**Mondol et al., 2017**).

3. Activités biologiques

Les saponines des holothuries présentent une variété d'activités biologiques notamment les activités antitumorales, antifongiques, antivirales, hémolytiques, cytotoxiques, améliorant l'hyperlipidémie, le foie gras, limitant l'accumulation de graisse, régulant la glycémie, prévenant la goutte, soulageant l'hyperuricémie et favorisant la fonction hématopoïétique de la moelle osseuse (**Verbist, 1993 ; Zhao et al., 2018**). La plupart des activités de ces saponines résultent de leurs propriétés tensioactives et de leurs interactions avec les membranes cellulaires (**Vo et al., 2016**). La nature des chaînes latérales et les positions des différents résidus glucidiques, ou compositions monosaccharidiques, affectent les propriétés fonctionnelles de ce groupe chimique (**Kamyab et al., 2020**) et la diversité structurale des saponines des holothuries est causée par la combinaison des différentes positions des groupes fonctionnels sur l'aglycone et des groupes hydroxyle sur la chaîne de sucre (**Zhao et al., 2018**). Le **Tableau 3** résume quelques activités biologiques des saponines reportées chez les holothuries.

Tableau 3: Activités biologiques remarquables de certaines saponines d'holothuries.

Espèce	Saponines	Activité biologique	Référence
<i>Pearsonothuria graeffei</i>	Mélange de saponines	Améliore l'hyperlipidémie	Hu et al. (2010)
<i>Stichopus chloronotus</i>	Stichloroside C1	Antifongique	Kitagawa et al. (1981)
<i>Bohadschia marmorata</i>	17-Hydroxy Impatienside A, Marmoratoside A, Bivittoside D, Impatienside A	Antifongique	Yuan et al. (2009)
<i>Apostichopus japonicus</i>	Holotoxins B, A, A1	Antifongique	Yano et al. (2013)
<i>Staurocucumis liouvillei</i>	Liouvilloside A	Virucide	Maier et al. (2001)
<i>Holothuria poli</i>	Holothurinoside	Antisalissure	Mert Ozupek et Cavas (2017)
<i>Holothuria forskali</i>	Holothurinosides A–D	Antitumorale, antivirale	Rodriguez et Riguera (1991)
<i>Cucumaria frondosa</i>	Frondoside A	Effet immunomodulateur	Amini et al. (2014)
<i>Cucumaria japonica</i>	Cucumarioside A2-2	Effet immunomodulateur	Amini et al. (2014)
<i>Pentacta quadrangularis</i>	Philinopside A	Antitumorale	Tong et al. (2005)
<i>Psolus patagonicus</i>	Patagonicoside A	Antitumorale	Careaga et al. (2008)
<i>Holothuria poli</i>	Bivittoside	Cytotoxique	Omran et Khedr (2015)
<i>Holothuria scabra</i>	Holothurin A3 et A4	Cytotoxique	Dang et al. (2007)
<i>Pearsonothuria graeffei</i>	Desholothurin A, Holothurinoside C, Holothurinoside J1	Hémolytique	Van Dyck et al. (2010b)
<i>Cucumaria japonica</i>	Cucumarioside A2-2	Hémolytique	Kalinin et al. (1996)

3.1. Propriétés membranolytiques

L'effet toxique et le large spectre des activités biologiques et pharmaceutiques des glycosides triterpéniques seraient liés à la perturbation dans le maintien de la membrane cellulaire jusqu'à la lyse (**Kalinin et al., 1996**). Lorsque les saponines s'intègrent dans la membrane avec leur partie hydrophobe, ils forment des complexes avec les stérols Δ^5 qui par la suite, par les interactions de leurs résidus saccharidiques orientés extra-membraneux, s'accumulent en plaques (**Augustin et al., 2011**). L'interférence stérique de ces fractions saccharidiques provoque une courbure de la membrane (**Figure 22**) conduisant ensuite à la formation de pores (**Armah et al., 1999 ; Kalinin et al., 2000**) ou des protubérances entraînant une extraction des stérols par vésiculation (**Keukens et al., 1995**). Les saponines peuvent migrer vers des domaines membranaires enrichis en sphingolipides/stérols avant la formation de complexes avec les stérols incorporés, ceci peut

provoquer une courbure membranaire (**Lin et Wang, 2010 ; Augustin et al., 2011**). En raison de cette interaction irréversible, la perméabilité sélective des membranes cellulaires est altérée et les composés cellulaires sont transférés dans la matrice extracellulaire, entraînant finalement la mort cellulaire (**Segal et Schlösser, 1975**). Les membranes cellulaires des étoiles de mer et des holothuries sont résistantes à leurs propres saponines en raison de la présence de stérols Δ^7 et $\Delta^{9,11}$, de stérols Δ^5 sulfatés et de β -xylosides de stérols à la place des stérols Δ^5 libres (**Makarieva et al., 1993**). Néanmoins, l'activité des saponines ne se limite pas à cette action hémolytique (**Augustin et al., 2011**), certaines saponines influencent les propriétés de différents types de protéines membranaires telles que les canaux Ca^{2+} et les pompes sodium potassium (**JY Chen et al., 2009**) ou se lient aux récepteurs des glucocorticoïdes qui sont des hormones stéroïdiennes impliquées dans la régulation du métabolisme, la neurobiologie et l'apoptose (**Yudt et Cidlowski, 2002**). La ressemblance des aglycones de saponines et les stéroïdes leur permettent d'interagir avec les récepteurs des hormones glucocorticoïdes et d'avoir plusieurs activités pharmacologiques telles que les effets anti-inflammatoires (**Giner et al., 2000**), neuroprotecteurs (**Zhang et al., 2008**) ainsi que l'induction de l'apoptose (**Jia et al., 2004**).

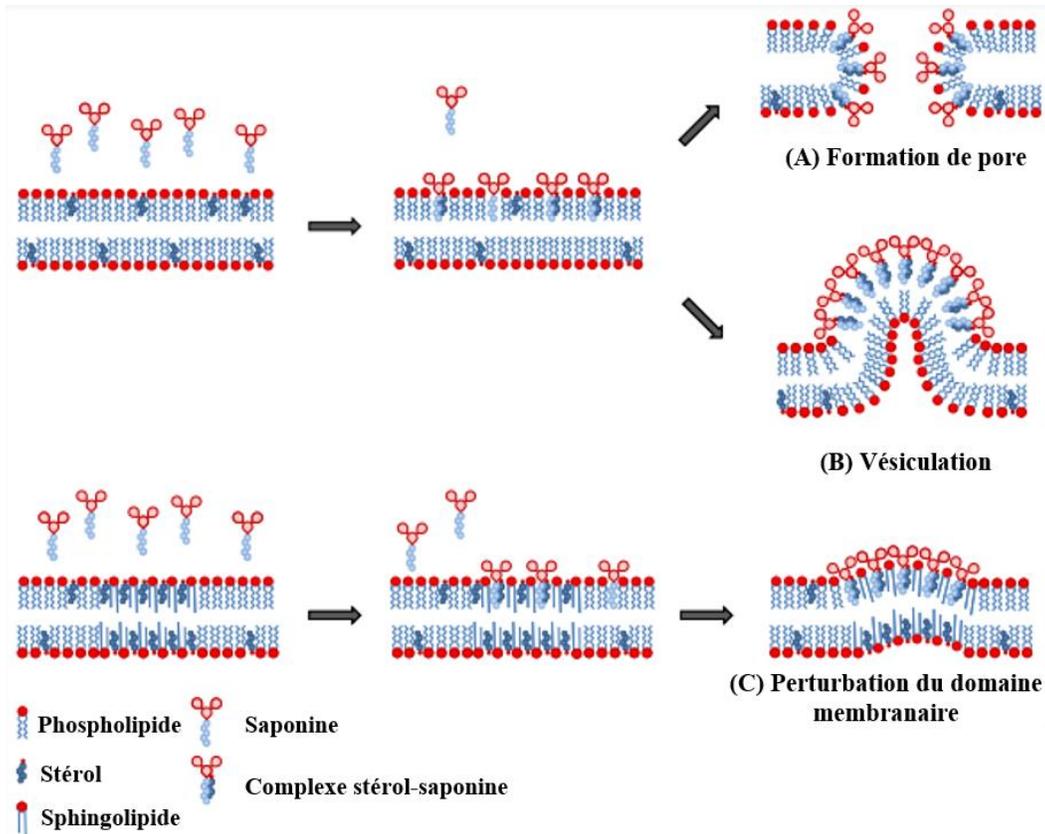


Figure 22: Action des saponines sur la membrane. **A.** Formation de pores dans la membrane. **B.** Vésiculation. **C.** Perturbation du domaine membranaire (Augustin *et al.*, 2011).

3.2. Propriétés tensioactives

En solution aqueuse, les saponines, et du fait de leur structure amphiphile, ont tendance à s'accumuler en surface avec la tête hydrophile orientée vers l'eau et la tête hydrophobe à l'extérieur jusqu'à atteindre la concentration micellaire critique (CMC), au-dessus, les molécules en excès s'agrègent pour former un amas appelé micelles (**Figure 23**) (Rai *et al.*, 2021). Ces propriétés tensioactives des saponines et leur pouvoir nettoyant de l'eau en réduisant sa tension superficielle leur permettent une application dans plusieurs domaines chimiques, pharmaceutiques et cosmétiques (Sparg *et al.*, 2004 ; Vincken *et al.*, 2007).

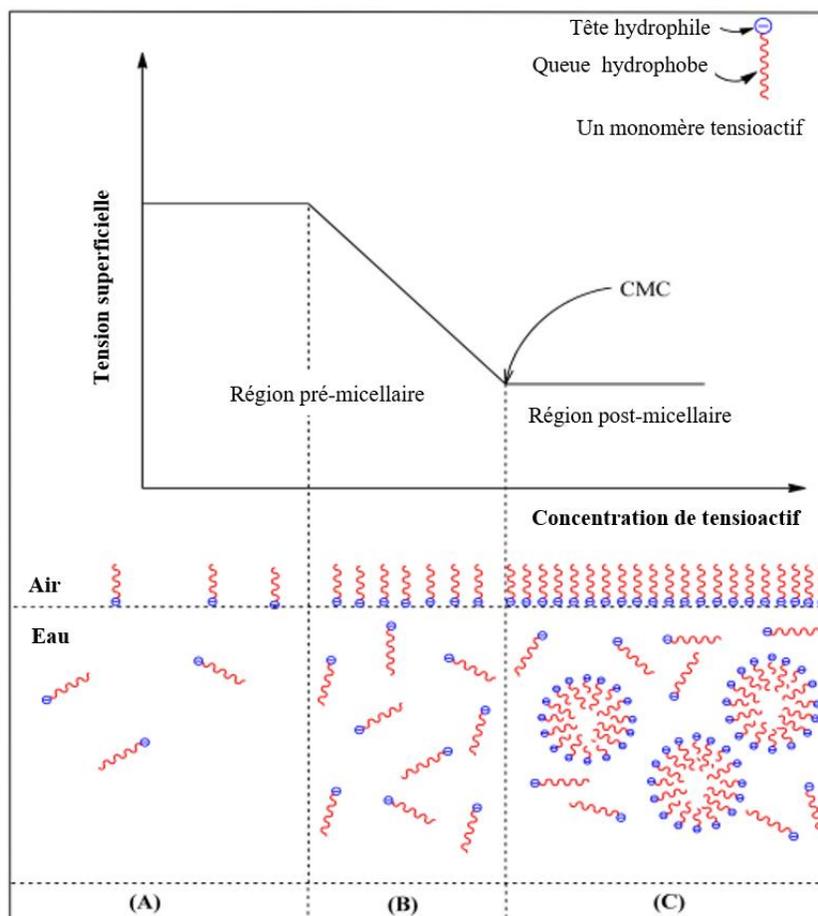


Figure 23: Illustration schématique de l'organisation des saponines en solution aqueuse en fonction de leur concentration. **A.** À faible concentration de tensioactif, une réduction très moindre de la tension superficielle est observée. **B.** Avec l'augmentation de la concentration de surfactant, la tension superficielle diminue régulièrement jusqu'à ce que la CMC (concentration micellaire critique) soit atteinte. **C.** Au-delà de la CMC, plus aucun changement de tension superficielle n'est observé (Rai *et al.*, 2021).

4. Rôle dans la chimiotaxonomie

Les glycosides triterpéniques ont des structures assez compliquées et peuvent être distingués par de nombreux caractères indépendants tels que le type et le nombre d'unités monosaccharidiques dans la chaîne glycosidique ; le nombre et les positions des groupes sulfate attachés aux unités monosaccharidiques ; la position de la double liaison dans le système cyclique de l'aglycone ; le nombre et la position des doubles liaisons dans la chaîne latérale de l'aglycone ; le nombre et la

position différente des groupes hydroxy, époxy, acétyle et oxo dans l'aglycone ...etc. (**Kalinin et al., 2005**).

Les glycosides triterpéniques ont une spécificité taxinomique pour différentes espèces et genres d'holothuries et même pour des taxons de niveau super-genre (**Kalinin et al., 2005 ; Bondoc et al., 2013**). Les profils de saponine diffèrent en fonction de l'espèce (**Caulier et al., 2011**), de la composante corporelle (**Kobayashi et al., 1991 ; Van Dyck et al., 2009, 2010a**), du sexe (**Decroo et al., 2017**) et de la maturité de l'individu (**Iyengar et Harvell, 2001**), à la fois qualitativement (différents mélanges de saponines) et quantitativement (concentrations relatives différentes) (**Claereboudt et al., 2019**). En fonction de l'habitat marin et des réponses défensives des holothuries, chaque groupe contient son propre mélange de saponines, qui est souvent une signature chimique unique. Ainsi elles sont considérées comme des marqueurs chimiotaxonomiques et peuvent donc être utilisées pour différencier la plupart des holothuries au niveau familial (**Kamyab et al., 2020 ; Malyarenko et al., 2021**).

Plusieurs saponines sont spécifiques à différents groupes taxinomiques d'holothuries et les caractéristiques structurelles des glycosides triterpéniques ont été utilisées pour résoudre quelques problèmes taxinomiques de la classe Holothuroidea (**Kalinin et al., 2005**). Plusieurs exemples peuvent être cités tels que :

- La révision du statut taxinomique de l'holothurie *Bohadschia graeffei* suivi de son isolement dans un nouveau genre établi à savoir *Paerosonothuria* (**Levin et al., 1984**) ;
- La séparation taxinomique de deux Stichopodidae du Pacifique Nord *Stichopus japonicus* et *Stichopus californicus* du genre *Stichopus* et leur placement dans un nouveau genre *Apostichopus* (**Levin et al., 1986**) ;
- La révision des holothuries appartenant au genre *Cucumaria* (**Avilov et al., 2004**) ;
- La reclassification de l'holothurie néo-zélandaise *Stichopus mollis* dans le nouveau genre *Australostichopus* (**Moraes et al., 2004**).

5. Rôle écologique et biologique

Les saponines ont une fonction écologique importante et complexe, la plus importante étant probablement la défense (**Van Dyck et al., 2011 ; Eeckhaut et al., 2015**). Elles sont produites dans

la peau, les viscères et les « tubes de Cuvier » des holothuries et sont relâchées dans le milieu extérieur quand les individus sont stressés (Maier, 2008 ; Van Dyck *et al.*, 2011). Leurs concentrations semblent augmenter dans les « tubes de Cuvier » et leur structure peut même être parfois modifiées avant d'être émise pour les rendre plus hydrophiles et plus membranolytiques, c'est-à-dire plus toxiques (Bakus, 1973 ; Kalinin *et al.*, 2000 ; Maier, 2008 ; Van Dyck *et al.*, 2011). Cette localisation des saponines est cohérente avec leur effet cytotoxique sur la plupart des organismes car ils agissent comme une défense chimique repoussant les prédateurs (Kalinin *et al.*, 1996).

La plupart des glycosides triterpéniques signalés chez les holothuries ont montré une cytotoxicité ainsi que des effets antisalissures, antifongiques et antibactériens (Aminin *et al.*, 2015 ; Khattab *et al.*, 2018), fournissant aux holothuries une substance chimique efficace et un mécanisme de défense contre les attaques microbiennes, les organismes salissants et potentiellement les prédateurs (Khattab *et al.*, 2018).

Les saponines sont toxiques pour les poissons marins et d'eau douce qui sont plus résistants que les premiers (Yamanouchi, 1955). Elles sont considérées comme les composants actifs de nombreux poisons de pêche traditionnellement utilisés pour empoisonner les poissons (Bakus, 1973 ; Kalinin *et al.*, 1996). En fait, lorsque les poissons sont exposés aux saponines, leur mouvement operculaire augmente jusqu'à 200% puis chute entre 105% et 133% jusqu'à ce qu'ils meurent. Les saponines affectent les lamelles secondaires des branchies et provoquent le décollement de l'épithélium, l'œdème et la formation des pores au niveau des cellules épithéliales conduisant à leur destruction (Eeckhaut *et al.*, 2015). Contrairement aux autres poissons, les poissons perles (*Carapus acus*) sont moins sensibles aux saponines (Parmentier et Vandewalle, 2005 ; Eeckhaut *et al.*, 2015) en raison de leur capacité à produire six à dix fois plus de mucus, fonctionnant comme une barrière mécanique contre les toxines (Brasseur *et al.*, 2016).

De plus leur rôle dans la défense, il a été suggéré que les saponines pourraient contribuer à la digestion (Garneau *et al.*, 1989), à la reproduction notamment la synchronisation du frai (Hamel et Mercier, 1999) ainsi qu'à la signalisation chimique intra ou interspécifique où ils sont utilisés pour dissuader les prédateurs (Van Dyck *et al.*, 2011 ; Caulier *et al.*, 2013 ; Claereboudt *et al.*, 2023).

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II.1 : Présentation de la zone d'étude et des espèces étudiées

Chapitre II : Matériel et méthodes

Chapitre II.1 : Présentation de la zone d'étude et des espèces étudiées

1. Cadre géographique de la mer méditerranée

La mer Méditerranée englobe un certain nombre de caractéristiques physiques, chimiques, biologiques et socio-économiques qui rendent cette mer unique. C'est un bassin marginal et semi-fermé (avec environ 2,5 millions de km² hors mer Noire), où l'évaporation (934–1 176 mm/an) dépasse les précipitations (331–477 mm/an) et les débits fluviaux (160–180 mm/an) (**Lionello *et al.*, 2012**). Cela génère un déficit hydrique qui est compensé par l'afflux d'eau Atlantique dans la couche de surface à travers le détroit de Gibraltar qui est l'unique connexion avec l'océan ouvert avec 12,8 km de largeur et plus de 300 m de profondeur. La sortie d'eau plus dense se produit au même point dans les couches plus profondes (**Tovar-Sánchez *et al.*, 2020**).

La mer Méditerranée est considérée comme une province oligotrophe étant l'une des plus grandes régions appauvries en nutriments au monde (**Siokou-Frangou *et al.*, 2010**). Les nutriments dans l'afflux de surface de l'Atlantique sont consommés le long du chemin vers le bassin oriental et exportés vers les eaux intermédiaires et profondes (**Pasqueron de Fommervault *et al.*, 2015**). Cette faible disponibilité de nutriments inorganiques (principalement du Phosphate, du Nitrate et de l'Ammoniac dissous) fait que la production primaire offshore dans les Etats membres de la Méditerranée est l'une des plus faibles observées dans l'océan mondial (**Tovar-Sánchez *et al.*, 2020**).

La mer Méditerranée est enrichie en de nombreux éléments-traces métalliques par rapport aux eaux similaires appauvries en nutriments (**Boyle *et al.*, 1985 ; Sarthou et Jeandel, 2001 ; Bonnet *et al.*, 2013**). Bon nombre de ces éléments jouent un rôle important dans les processus biogéochimiques dans la mer Méditerranée (**Tovar-Sánchez *et al.*, 2020**).

Cette mer est habitée par un biote très riche et diversifié. Différents auteurs ont tenté d'évaluer la santé de l'environnement de la mer Méditerranée en estimant sa richesse en espèces marines (**Tovar-Sánchez *et al.*, 2020**). La dernière estimation compte plus de 17 000 espèces marines (**Coll *et al.*, 2010**). Ce chiffre représente 4 à 18 % de la biodiversité marine mondiale avec 28 % des espèces marines considérées comme endémiques au bassin, ainsi, la mer Méditerranée

est considérée comme un véritable hotspot de biodiversité (Gubbay *et al.*, 2016 ; Mannino *et al.*, 2017). La Méditerranée occidentale possède la plus grande diversité d'espèces, suivie de la Méditerranée centrale, de l'Adriatique et de la mer Égée (Mannino *et al.*, 2017). Elle est également l'habitat de nombreuses espèces emblématiques menacées, telles que la tortue verte (*Chelonia mydas*), la tortue caouanne (*Caretta caretta*), le phoque moine de Méditerranée (*Monachus monachisa*), le thon rouge de l'Atlantique (*Thunnus thynnus*), le mérrou sombre (*Epinephelus marginatus*) ou la noble plume (*Pinna nobilis*) (Tovar-Sánchez *et al.*, 2020).

2. Cadre géographique du bassin algérien

La côte algérienne s'étend de Marsat Ben M'Hidi à l'Ouest (Tlemcen) à Cap Roux à l'Est (Annaba) sur 1 662 km. Elle se présente comme une succession de baies et de golfes plus ou moins ouverts séparées par un relief très escarpé (Grimes, 2010 ; Maatallah et Borhane, 2014 ; Dauvin *et al.*, 2017 ; Belhaouari et Belguermi, 2020).

Le littoral algérien est caractérisé par un plateau continental étroit et couvre une variété d'habitats différents allant des rivages rocheux (parfois avec de hautes falaises) aux plages de sable et aux dunes retrouvés dans de nombreuses baies (Bakalem *et al.*, 2020). Le réseau hydrographique qui alimente le milieu marin en apports terrigènes compte 31 oueds dont les plus importants sont : Tafna, Cheliff, Mazafran, El Harrache, Soummam, Sebaou, Isser, El Saf Saf et Seybouse (In Grimes, 2010).

Les eaux peu profondes du bassin algérien sont caractérisées par certains habitats spécifiques tels que les zones d'herbiers marins y compris les herbiers à *Posidonia oceanica* et les formations coralligènes, les deux types ayant une valeur patrimoniale naturelle élevée et une faune très diversifiée (Altobelli *et al.*, 2017 ; Bakalem *et al.*, 2020).

Le bassin algérien est subdivisé en trois secteurs caractérisés par des fonds différents comme suit (Hemida, 2005) ;

-Le secteur Ouest s'étend des frontières algéro-marocaines à Ténès regroupant les Wilayas de Tlemcen, Aïn Témouchent, Oran, Mostaganem et Chlef. Les fonds de la région de Ghazaouet à Oran sont parsemés d'accidents topographiques entourés de coraux qui apparaissent de 200 m à

600 m de profondeur. Près des îles Habibas, les fonds sont caractérisés par des vases sableuses à *Alcyonium palmatum*, des vases profondes, des sables et graviers grossiers et des sables vaseux. Dans le golf d'Arzew, les fonds rencontrés sont la vase terrigène côtière à Alcyonaire (entre 80 et 280 m), la vase jaunâtre molle en surface et compacte en profondeur (entre 280 et 450 m) et la vase jaune fluide (entre 450 et 700 m). A Mostaganem, la région de Stidia à l'Ouest est une zone rocheuse interrompue par quelques criques, parfois sableuses avec un herbier à *Posidonia oceanica* à partir de 1,5 m de profondeur (**Belbachir, 2018**). Plus à l'Est, les fonds sont caractérisés par le sable fin et des argiles entre 0 et 60 m (**Benzait, 2020**) ;

-Le secteur Centre s'étend de Ténès à Dellys incluant les Wilayas de Tipaza, Alger et Boumerdès. Dans la baie de Bou-Ismaïl et la région Est d'Alger, les fonds retrouvés sont la vase collante terrigène (entre 200 et 400m), la vase plus ou moins argileuse (entre 350 et 500 m) et la vase à *Isidella* à partir de 500 m. Quant à la zone de Dellys, les fonds sont plutôt rocheux.

-Le secteur Est s'étend de Dellys à la frontière algéro-tunisienne et regroupe les Wilayas de Tizi Ouzou, Béjaïa, Jijel, Skikda, Annaba et El Taref. Les baies de Skikda et Béjaïa présentent des fonds à vase profonde sableuse (entre 300 et 400 m) puis des fonds à *Isidella* (entre 400 et 700 m). À Annaba, les fonds sont à vase détritique (entre 160 et 300 m) puis à vase profonde à *Isidella* (entre 300 et 450 m).

La circulation des courants marins le long des côtes algériennes est principalement influencée par les eaux de surface de l'Atlantique Nord qui se jettent dans la mer Méditerranée par le détroit de Gibraltar. Dans le bassin occidental de la mer Méditerranée, l'afflux des eaux de l'Atlantique est d'abord dirigé vers le Nord-Est en raison de l'orientation du détroit de Gibraltar, puis forme généralement un tourbillon antihoraire à l'Est de la mer d'Alboran entre l'Espagne et le Maroc (**Robinson et al., 2001 ; El-Geziry et Bryden, 2010**). Le courant d'eau Atlantique développe généralement des méandres dès 0–1° E, créant un upwelling et deux autres gyres dans le sens des aiguilles d'une montre, d'un rayon d'environ 100 km, se forment devant les côtes algériennes (**Ruiz et al., 2002**). Au fur et à mesure qu'elles progressent vers l'Est, les eaux de l'Atlantique se mélangent progressivement aux eaux de la Méditerranée, qui ont un niveau de salinité plus élevé (**Dauvin et al., 2013**). Le courant Algérien devient également plus instable à mesure que les eaux de l'Atlantique progressent vers l'est, créant des gyres cycloniques et anticycloniques (**Millot, 1999**).

L'eau de l'Atlantique entrant à Gibraltar dans la couche de surface, après avoir voyagé dans le sous-bassin levantin le plus à l'est, est transformée en l'une des masses d'eau de mer les plus salées par les flux de chaleur et d'humidité air-mer. Cette eau relativement salée, qui traverse toute la mer Méditerranée dans le sens inverse des eaux de surface de l'Atlantique, sort finalement du détroit de Gibraltar à mi-profondeur (**Hassoun *et al.*, 2015**).

3. Les stations étudiées

Les échantillons étudiés dans la présente thèse proviennent de 27 stations situées le long de la côte algérienne entre 35°11,392' N et 37°05,766'N et 02°05,491'O et 08° 18,627'E réparties sur les trois secteurs comme suit (**Figure 24 ; Tableau 4**) ;

-13 stations dans le secteur Ouest réparties sur les Wilayas de Tlemcen, Ain Timouchent, Oran et Mostaganem ;

-5 stations dans le secteur Centre réparties sur les Wilayas de Tipaza, Alger et Boumerdes ;

-9 stations dans le secteur Est réparties sur les Wilayas de les Wilayas de Béjaia, Jijel, Skikda, Annaba et El Taref.

A l'exception de la station de Stidia à Mostaganem qui est situé à 4 m de profondeur, l'ensemble des stations se situent entre 36 et 532 m de profondeur.

Tableau 4: Caractéristiques des stations étudiées (P = Profondeur).

Méthode d'échantillonnage	Stations	Coordonnées géographiques	P (m)	Secteur
Campagne océanographie	El Kala (1)	37° 01,808' N, 8° 18,627' E	85	Est
	Annaba (2)	37° 00,715' N, 7° 59,982' E	97	
	Annaba (3)	37° 04,127' N, 7° 52,547' E	180	
	Skikda (4)	37° 00,272' N, 7° 03,249' E	148	
	Skikda (5)	36° 59,679' N, 7° 06,926' E	110	
	Skikda (6)	37° 05,766' N, 6° 56,790' E	532	
	Skikda (7)	37° 01,114' N, 6° 51,236' E	254	
	Ziama (8)	36° 43,998' N, 5° 28,031' E	138	
	Béjaia (9)	36° 40,992' N, 5° 18,612' E	79	
	Boumerdes (10)	36° 49,377' N, 3° 25,259' E	171	Centre
	Ain Bénian (11)	36° 48,756' N, 2° 48,164' E	157	
	Bou-Ismaïl (12)	36° 45,266' N, 2° 41,519' E	159	
	Bou-Ismaïl (13)	36° 45,854' N, 2° 38,281' E	318	
	Mostaganem (14)	36° 05,077' N, 0° 00,490' E	225	Ouest
	Mostaganem (15)	36° 02,611' N, 0° 01,823' O	117	
	Mostaganem (16)	35° 59,109' N, 0° 01,089' E	68	
	Arzew (17)	35° 55,443' N, 0° 16,166' O	77	
	Bouzedjar (18)	35° 38,068' N, 1° 08,766' O	96	
	Béni-Saf (19)	35° 20,186' N, 1° 21,456' O	36	
	Béni-Saf (20)	35° 25,160' N, 1° 29,428' O	125	
	Ghazaouet (21)	35° 12,066' N, 1° 55,639' O	118	
	Ghazaouet (22)	35° 11,392' N, 2° 05,491' O	113	
Prises accessoires des chalutiers professionnels et des petits métiers	Cherchell (23)	36° 41,611' N, 2° 14,045' E	-	
	Bahara Mostaganem (24)	36° 27,978' N, 0° 38,431' E	73	Ouest
	Kharrouba 2 Mostaganem (25)	36° 12,199' N, 0° 18,507' E	60	
	Kharrouba 1 Mostaganem (26)	36° 00,354' N, 0° 03,314' E	48	
Plongée en apnée	Stidia Mostaganem (27)	35° 50,061' N, 0° 00,830' O	4	

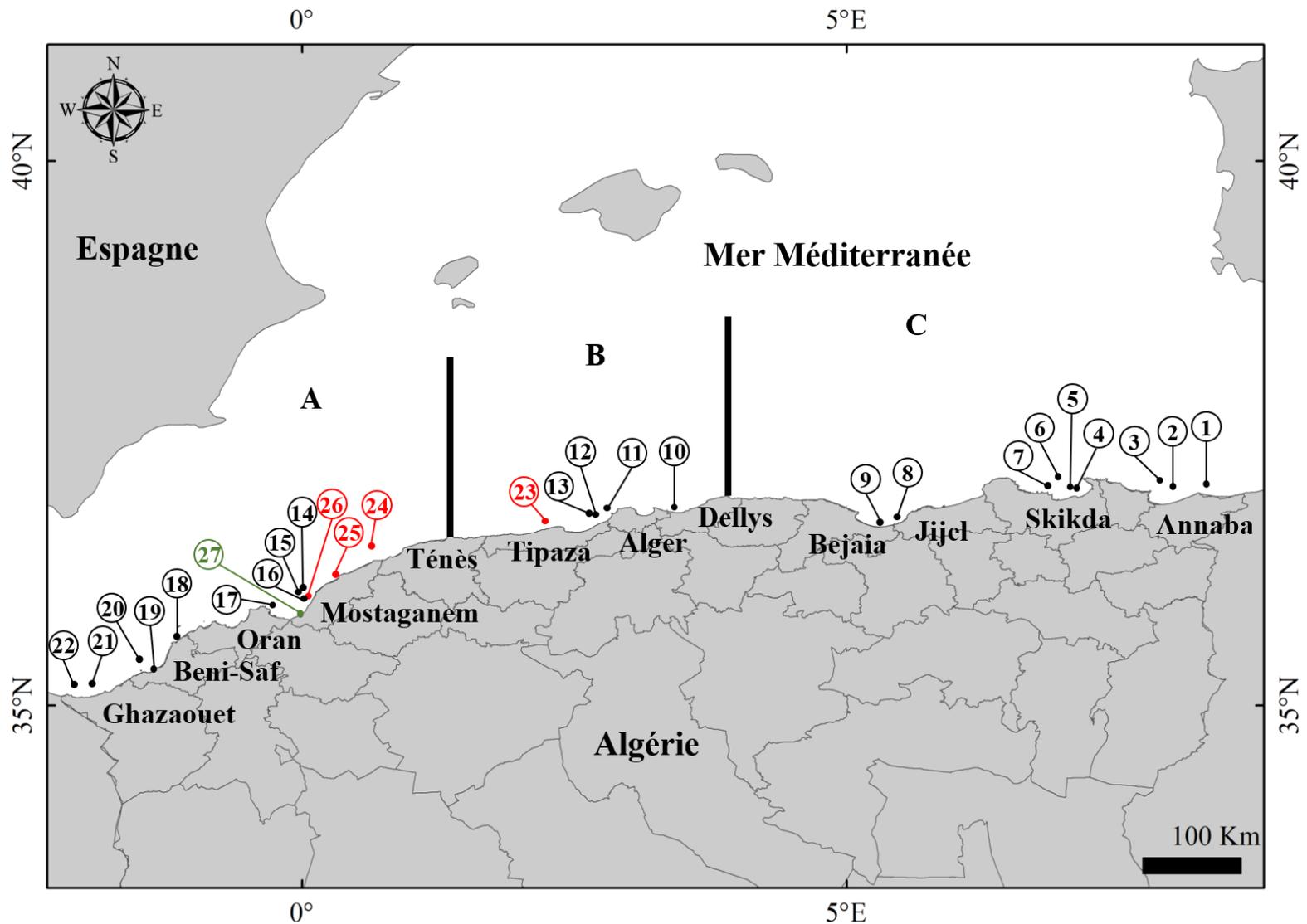


Figure 24: Stations d'échantillonnage de *Parastichopus regalis*, *Holothuria arguinensis* et *Holothuria algeriensis* (voir le **Tableau 4** pour les détails des stations). Stations en noir = campagne océanographique, stations en rouge = prises accessoires des chalutiers professionnels et petits métiers, Station en vert = Plongée en apnée. **A.** Secteur Ouest, **B.** Secteur Centre, **C.** Secteur Est

4. Les espèces d'holothuries étudiées

4.1. *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817)

La famille des Stichopodidae comprend un assemblage diversifié d'espèces d'holothuries, dont la plupart se trouvent dans l'Indo-Pacifique (Byrne *et al.*, 2010). Elle est représentée en Méditerranée par seulement deux espèces du genre *Parastichopus*. Ce dernier est limité à l'océan Atlantique Nord et diffère du genre *Stichopus* qui est caractéristique des régions tropicales et subtropicales par l'absence de sclérites de type bouton (Byrne *et al.*, 2010).

Parastichopus regalis appelé communément « holothurie royale » est la seule espèce signalée jusqu'à présent sur les côtes algériennes, elle est retrouvée entre 5 et 800 m de profondeur (Clark, 1922 ; Tortonese, 1965 ; Mercier et Hamel, 2013 ; Ramón *et al.*, 2019) sur des fonds marins composés principalement de sable, de limon et d'argile (Ramón *et al.*, 2019).

Parastichopus regalis est caractérisée par un corps jaune brunâtre plus ou moins aplati sur la face ventrale, convexe sur la face dorsale et peut atteindre jusqu'à 30 cm de long avec une largeur moyenne de 6 à 7 cm. Les bords de son corps sont garnis de grosses papilles et sa bouche est ventrale. Les sclérites de cette espèce sont constitués principalement de tables, des plaques perforées et des bâtonnets (Voir les **Figure 39** et **Figure 42** dans le chapitre résultats et discussion) (Koehler, 1921).

Comme la plupart des Synallactida, *Parastichopus regalis* est un dépositivore qui ingère des sédiments fins dont la taille varie de 0,103 μm à 1 mm (Ramón *et al.*, 2019). Cette espèce est présente dans l'Atlantique Est [de l'Angola (Cherbonnier, 1965) à l'Irlande du Nord, en passant par les Iles Canaries (Hernández *et al.*, 2013), les Açores (Madeira *et al.*, 2019), Madère (Augier, 1985) et le Portugal (Santos *et al.*, 2015)], l'Atlantique Ouest [Antilles occidentales et golfe du Mexique (Ramón *et al.*, 2010)] et la mer Méditerranée où elle a été signalée dans plusieurs régions [mer d'Alboran, dont l'Espagne et l'Ouest algérien (Abad *et al.*, 2007 ; Ramón *et al.*, 2010 ; González-Wangüemert *et al.*, 2014a ; Maggi et González Wangüemert, 2015 ; Galimany *et al.*, 2018 ; Benzait *et al.*, 2020), la mer Ionienne (Tursi *et al.*, 2004), Malte (Leonard *et al.*, 2020), la mer de Marmara (Aydin, 2008) et la mer Égée (Aydin, 2018)].

En Méditerranée, quelques études ont été consacrées à l'espèce *P. regalis*, Il s'agit notamment des études sur sa distribution et sa pêche (Ramón *et al.*, 2010), son endosymbionte *Carapus acus* (González-Wangüemert *et al.*, 2014a), la différenciation génétique entre ses populations (Maggi et González-Wanguemert, 2015), son système immunitaire en réponse à différentes températures pour son implication dans l'aquaculture (Galimany *et al.*, 2018) et certains aspects qualitatifs de son comportement alimentaire (Elakkermi *et al.*, 2021).

Sur les côtes italiennes, quoique cette espèce ne soit pas exploitée et considérée comme prises accessoires des pêcheurs professionnels, les chercheurs ont remarqué une diminution significative de son abondance ce qui les a menés à étudier la relation entre cette dernière et les facteurs environnementaux. Les résultats ont montré qu'en réalité, la distribution de cette espèce a changé avec le temps avec un léger approfondissement et une raréfaction de la distribution spatiale, de plus, des corrélations positives ont été observées entre cette diminution et 1) le pH dans les eaux de surface pendant la phase de dispersion des larves et 2) la concentration en nutriments au fond suggérant que cette espèce est sensible aux changements environnementaux et la disponibilité de la nourriture (Scannella *et al.*, 2022).

D'un point de vue économique, *P. regalis* présente un grand intérêt commercial, ses bandes musculaires longitudinales appelées « espardenya » ou « llongo » en Espagne, sont très appréciées des consommateurs locaux et des touristes asiatiques (Ramón *et al.*, 2010). En Catalogne, aux Baléares et à Valence, seules les bandes musculaires longitudinales sont vendues, contrairement à Galice où ils vendent les animaux entiers (González-Wanguemert *et al.*, 2018a). D'un point de vue pharmaceutique et nutritionnel, il a été montré que l'extrait de la paroi du corps de *P. regalis* présente une activité antimicrobienne, antifongique et antitumorale (Santos *et al.*, 2015) ainsi qu'une nutrition équilibrée adaptée à la consommation humaine en raison de son pourcentage important d'acides gras polyinsaturés (Santos *et al.*, 2015 ; Roggatz *et al.*, 2018).

4.2. *Holothuria (Holothuria) algeriensis* Mezali, Thandar et Khodja, 2021

L'espèce *Holothuria algeriensis*, anciennement appelé *Holothuria tubulosa* « B » dans les travaux de Mezali (2008, 2011) et Mezali et Francour (2012) a récemment été séparée de *Holothuria tubulosa* classique déjà décrite par Kohler (1921) et nommée depuis plusieurs années *Holothuria*

tubulosa « A » (**Mezali, 2008 ; 2011 ; Mezali et Francour, 2012**) suite à une révision taxinomique des espèces du genre *Holothuria* présentes sur les côtes algériennes (**Mezali et al., 2021b**). Cette espèce est souvent retrouvée avec *Holothuria tubulosa* qui fréquente des biotopes sableux, vaseux et herbier à *Posidonia oceanica* entre 0 et 40 m de profondeur (**Koehler, 1921**). Elle a été signalée dans la région Centre et Ouest algérienne (**Mezali, 1998 ; Mezali et al., 2021b**) mais son aire de répartition est probablement plus répandue en méditerranée due à sa confusion avec d'autres espèces voisines (ie : *Holothuria mammata*) (**Mezali, comm. pers.**).

Holothuria algeriensis présente un corps convexe sur la partie dorsale et aplatie sur la face ventrale, la bouche est ventrale et les pédicelles sont irrégulièrement répartis sur la face ventrale. Les verrucosités coniques de la face dorsale sont très petites et peuvent faire défaut. Le corps présente une couleur marron acajou à marron bitume, la face ventrale est beaucoup plus claire que la face dorsale et la démarcation entre les deux est très claire. Les sclérites qui caractérisent cette espèce sont les boutons avec des perforations larges et ovales, des tables, des plaques terminales, des plaques perforées et des bâtonnets (**Mezali, 2008 ; Mezali et al., 2021b**) (Voir la **Figure 45** dans le chapitre résultats et discussion).

4.3. *Holothuria (Roweothuria) arguinensis* Koehler et Vaney, 1906

Holothuria arguinensis, c'est une espèce qui à l'origine est présente dans l'Atlantique Nord-Est répartie du Portugal au Maroc et à la Mauritanie, y compris les Iles Canaries, cependant, sa répartition géographique a évolué et l'espèce s'est introduite en Méditerranée où elle a été signalée sur les côtes espagnoles (**González-Wangüemert et Borrero-Pérez, 2012**) et algérienne (**Mezali et Thandar, 2014**). Elle est associée aux zones sableuses, rocheuses et aux herbiers marins entre 0 et 50 m de profondeur (**González-Wangüemert et Borrero-Pérez, 2012 ; Navarro, 2012 ; Rodrigues et al., 2015**).

Le corps de *H. arguinensis* est semi-cylindrique, la face dorsale arquée est de couleur brune foncée tandis que la face ventrale est aplatie de couleur brune claire. La face dorsale présente plusieurs protubérances généralement organisées en deux rangés et les deux faces dorsale et ventrale sont séparées par plusieurs protubérances arquées. Cette espèce présente des sclérites sous forme de tables, boutons sous forme de « 8 », plaques perforées, plaques terminales et bâtonnet

(González-Wangüemert et Borrero-Pérez, 2012 ; Mezali et Thandar, 2014 ; Mezali *et al.*, 2021b) (Voir la **Figure 46** dans le chapitre résultats et discussion).

Bien qu'elle soit une espèce introduite en méditerranée, *H. arguinensis* ne concurrence pas certaines holothuries indigènes méditerranéennes (*H. tubulosa*, *H. poli*, *H. forskali* et *H. sanctori*), car elle consomme des ressources alimentaires qui sont rarement utilisées par ces dernières (Belbachir et Mezali, 2020b). La qualité nutritionnelle équilibrée adaptée à la consommation humaine et les fortes densités de ses populations la rend vulnérable à la surexploitation (Bruckner *et al.*, 2003 ; Roggatz *et al.*, 2015 ; Siegenthaler *et al.*, 2015 ; Mecheta *et al.*, 2020). En fait, elle a atteint une valeur économique élevée ces dernières années, faisant l'objet d'une récolte intensive et illégale sur les côtes de l'Algarve et de l'Andalousie (González-Wangüemert *et al.*, 2018a). Sa pêche illégale a également été observée sur les côtes algériennes (Mezali et Slimane-Tamacha, 2020) et les signes de sa surexploitation commencent à s'observer. Pour tenter de combler la demande des pays asiatiques avec moins d'impact sur les populations sauvages, les chercheurs tentent d'améliorer son aquaculture vue son potentiel aquacole élevé et son adaptation à l'aquaculture monospécifique et multitrophique intégrée (Domínguez-Godino *et al.*, 2015 ; Siegenthaler *et al.*, 2015 ; Domínguez-Godino et González-Wangüemert, 2019).

5. Stratégie d'échantillonnage

L'échantillonnage des espèces étudiées a été réalisé le long de la côte algérienne dans les stations citées précédemment en utilisant trois méthodes à savoir ; la campagne océanographique démersale ALDEM-2019 ; les prises accessoires des chalutiers professionnels et petits métiers et la plongée en apnée.

5.1. Campagne océanographique démersale ALDEM-2019

Cette méthode consiste à l'embarquement et à la participation à la campagne océanographique du Centre National de la Recherche et de Développement de la Pêche et de l'Aquaculture en collaboration avec la Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie de l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (<https://www.youtube.com/watch?v=-Ns7LkPi4W0>). Cette campagne qui

rentre dans le programme MEDITS a été réalisé au bord du navire océanographique « Grine Belkacem » en utilisant l'engin de pêche GOC73 grée aux panneaux morgère de fond. Elle s'est déroulée entre le 13 juin et le 16 Juillet 2019 de la frontière Est à la frontière Ouest algérienne. L'objectif lors de cette campagne était de récupérer l'ensembles des holothuries ciblées par la présente étude qui sont remontés par le chalut de fond, de les traiter et de les conserver pour la suite des études. Une fois remonté sur le bateau, les holothuries ont été gardées dans des bacs remplis d'eau de mer le temps de les photographier (face dorsale et ventrale) et de le conserver. Durant la première partie de la campagne qui s'est déroulée dans les secteurs Centre et Est, les échantillons d'holothuries ont été coupés en petits morceaux et conservés dans le méthanol tandis que les échantillons de la deuxième partie qui s'est déroulée dans le secteur Ouest, les individus ont été conservés entiers dans l'éthanol tout en injectant ce dernier dans leur cavité coelomique pour une meilleure conservation. La conservation des échantillons dans le méthanol a été préconisée durant la première partie de la campagne étant donné que l'objectif principal de l'étude était la caractérisation des saponines et leur extraction se fait dans le méthanol, cependant, il s'est avéré que la lyophilisation permettait un meilleur résultat, raisons pour laquelle ces échantillons n'ont pas été utilisés à cet effet.



Figure 25: *Parastichopus regalis* (flèche blanche) et *Holothuria arguinensis* (flèche noire) comme prise accessoire dans le chalut du « Grine Belkacem ».

5.2. Prises accessoires des chalutiers professionnels et petits métiers

Cette méthode indirecte repose sur la récupération des échantillons d'holothuries qui sont considérés par les pêcheurs des chalutiers et petits métiers comme des prises accessoires et sont d'habitude rejetées en mer étant donné qu'ils ne sont pas commercialisés. Entre Janvier 2020 et Juin 2021 nous avons demandé aux pêcheurs à travers des contacts directs ou via des intermédiaires de nous conserver les espèces cibles après leur avoir montré les photos avec une description. Par la suite, les échantillons ont été récupérés soit immédiatement dans des bacs remplis d'eau de mer soit congelés et ont été conservés pour la suite des études.

5.3. Plongée en apnée

L'échantillonnage par plongée en apnée est une méthode directe qui permet de sélectionner les espèces cibles avant de les prélever, elle est ainsi non destructive. Les échantillons qui ont été collectés par plongée en apnée en Janvier 2020 proviennent de la région de Stidia à 4 m de profondeur. Les spécimens vivants ont été transportés par la suite dans des bacs remplis d'eau de mer au laboratoire LPVRMLSM où ils ont été traités et conservés.

6. Echantillonnage

Au total, 104 individus de *P. regalis* ont été échantillonnées dans 26 stations entre 48 et 532 m dont 65 durant la campagne océanographique et 39 par les chalutiers professionnels et les petits métiers principalement de la région de Mostaganem et Cherchell (**Tableau 5 ; Figure 24**).

Tableau 5: Stations d'échantillonnage de *Parastichopus regalis* (P = Profondeur).

Stations	P (m)	Effectif	Stations	P (m)	Effectif
El Kala (1)	85	2	Mostaganem (14)	225	13
Annaba (2)	97	1	Mostaganem (15)	117	5
Annaba (3)	180	1	Mostaganem (16)	68	3
Skikda (4)	148	2	Arzew (17)	77	12
Skikda (5)	110	1	Bouzedjar (18)	96	7
Skikda (6)	532	1	Béni-Saf (19)	36	1
Skikda (7)	254	1	Béni-Saf (20)	125	1
Ziama (8)	138	1	Ghazaouet (21)	118	1
Béjaia (9)	79	1	Ghazaouet (22)	113	2
Boumerdes (10)	171	2	Cherchell (23)	-	12
Ain Bénian (11)	157	4	Bahara Mostaganem (24)	73	24
Bou-Ismaïl (12)	159	2	Kharrouba 2 Mostaganem (25)	60	1
Bou-Ismaïl (13)	318	1	Kharrouba 1 Mostaganem (26)	48	2

En ce qui concerne *H. algeriensis*, trois échantillons ont été récupérés des pêcheurs professionnels de la région de Stidia Mostaganem (27) (**Tableau 4 ; Figure 24**).

Quant à *H. arguinensis*, cinq individus ont été échantillonnées dont un provient de la station de Béni-Saf (19) à 36 m de profondeur récupéré lors de la campagne océanographique et quatre individus ont été collectés dans la station de Stidia Mostaganem (27) par plongée en apnée (**Tableau 4 ; Figure 24**).

7. Traitement et conservation des échantillons

Le traitement et la conservation des échantillons diffèrent selon la méthode d'échantillonnage et l'étude à laquelle ils vont servir par la suite. L'étude de la systématique nécessite des individus frais ou conservés dans l'éthanol tandis que pour l'étude de la biochimie, les individus doivent être congelés puis lyophilisés. L'étude des traits de vie prend en considération l'ensemble des individus.

Les spécimens récoltés ont été gardés dans des bacs remplis d'eau de mer (s'ils sont vivants), photographiés (faces dorsale et ventrale) à l'aide d'un appareil photo Canon EOS 1200D, puis soit 1) conservés dans des bocaux en verre étiquetés remplis d'éthanol (96 %) tout en injectant l'alcool dans leurs cavités cœlomique à l'aide d'une seringue soit 2) congelés. Les mensurations

(longueur et largeur contractée) à l'aide d'un ruban mètre ($\pm 0,1$ cm) et les pesés (poids total) à l'aide d'une balance ($\pm 0,001$ g) ont été réalisés au laboratoire LPVRMLSM.

7.1. Lyophilisation des échantillons

L'objectif de cette opération est d'éliminer l'eau contenue dans l'échantillon biologique par le phénomène de la sublimation sans altérer les autres composants chimiques sensibles à la haute température telles que les lipides et les saponines. Deux lots d'holothuries dédiés à l'étude biochimique ont été lyophilisés séparément. Six (06) individus de *P. regalis* et cinq (05) de *H. arguinensis* ont été lyophilisés au laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme avec le lyophilisateur Christ Alpha 1-2. Les individus ont été conservés à -80 °C pendant au moins 12 h avant de procéder à la lyophilisation à -60 °C pendant 72 h (**Figure 26A**). Le deuxième lot est composé de cinq (05) individus de *P. regalis* et trois (03) individus de *H. algeriensis* et a été lyophilisé au laboratoire pédagogique de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (Université de Mostaganem) avec le lyophilisateur Christ Alpha 2-4 LD plus à -84 °C pendant 52h (**Figure 26B et Figure 26C**). Par la suite, chaque individu a été conservé dans un sac en plastique dans un endroit sec.

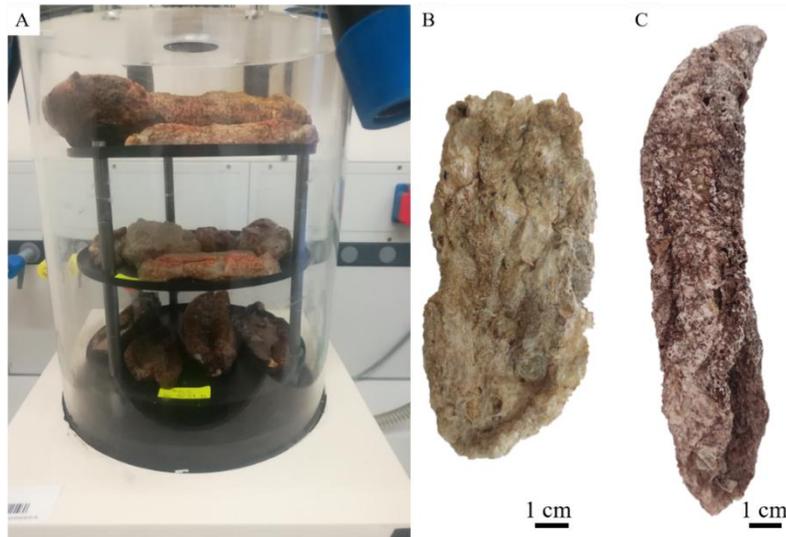


Figure 26: **A.** Lyophilisation des échantillons de *Parastichopus regalis* et *Holothuria arguinensis* au laboratoire de biologie des organismes marins et biomimétisme. **B.** Un individu de *P. regalis* lyophilisé. **C.** Un individu de *H. algeriensis* lyophilisé.

Chapitre II.2 : Les espèces d'holothuries étudiées

Chapitre II.2 : Les espèces d'holothuries étudiées

Dans ce chapitre, la systématique de *Parastichopus regalis* est étudiée en détail sur le plan morphologique, endosquelettique et morphométrique dans le but de déterminer s'il existe des différences entre les deux morphotypes observés (tacheté et non tacheté). Quant à la systématique de *H. algeriensis* et *H. arguinensis*, elle est abordée dans le but de confirmer l'identification des espèces par les caractères morphologiques et endosquelettiques sans pour autant les disséquer afin de les préserver entier pour la caractérisation des saponines.

1. *Parastichopus regalis*

Lors de l'échantillonnage de *Parastichopus regalis*, nous avons observé la présence de deux morphotypes, l'un pourvu de taches sombres au niveau de la face dorsale et l'autre dépourvue de celles-ci. L'objectif de cette étude est d'abord de décrire en détail l'espèce *P. regalis* ensuite de déterminer s'il existe des différences les deux morphotypes observés sur le plan morphologique et endosquelettique. Pour cela, 12 individus ont été sélectionnés et étudiés dont six tacheté et six non tacheté et cela, en se basant sur les travaux taxonomiques de **Selenka (1867)**, **Théel (1886)**, **Marenzeller (1893)**, **Koehler (1921)**, **Clark (1922)**, **Mortensen (1927)**, **Deichmann (1940)** et **Cattaneo (1981)**.

1.1. Etude morphologique

L'étude morphologique des deux morphotypes comprend une description morphologique externe et interne. Les caractères externes incluent la longueur et la largeur contractée ; le poids ; la forme et l'épaisseur du tégument des faces dorsales et ventrales ; la couleur ; la position de la bouche, de l'anus et des pédicelles ainsi que le nombre des tentacules. Par la suite, à l'aide d'un scalpel, chaque individu a été disséqué pour étudier les caractères anatomiques qui comprennent la longueur des ampoules tentaculaire, de la vésicule de Poli et du canal de pierre, la forme de la madréporite, la présence ou l'absence des « tubes de Cuvier », le type d'extrémité des muscles longitudinaux, leur épaisseur et la forme et le diamètre de l'anneau calcaire. La dissection des holothuries a été faite

par une incision longitudinale le long du sillon de la face ventrale de l'individu et va de part et d'autre du complexe aqua-pharyngien et la partie postérieure pour éviter de les abimer (**Figure 27**), les individus ont été ouverts dans des bacs remplis d'eau pour faciliter l'apparition des différents organes (**Figure 6**). Les différentes mensurations excepté la longueur ont été effectuées avec un pied à coulisse ($\pm 0,01$ mm).

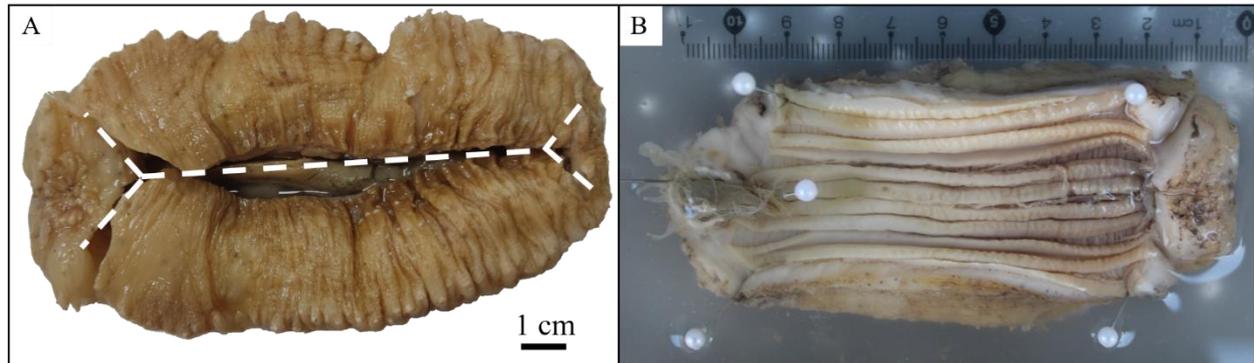


Figure 27: **A.** Incision réalisée sur les individus de *Parastichopus regalis*. **B.** Observations des caractères anatomiques de *P. regalis*.

1.2. Etude endosquelettique

Les sclérites ont été extraits selon la méthode de **Samyn et al. (2006)** résumé dans la **Figure 28**. Des fragments de tissus de la face dorsale, de la face ventrale, des tentacules, des papilles, des pédicelles, de la région anale et du cloaque ont été prélevés dans des tubes de 5 ml, quelques gouttes d'eau de javel commerciale pure ont été ajoutés à l'aide d'une pipette pour dissoudre les tissus organiques pendant environ 10 minutes (ou plus selon la taille du tissu et la force de l'eau de javel). Une fois le tissu décomposé, l'eau de Javel a été éliminée avec une pipette et les sclérites ont été ensuite rincés avec l'eau distillée plusieurs fois puis gardée dans une petite quantité de ce dernier.

Pour observer les sclérites, une goutte de la préparation des sclérites a été déposée sur une lame couverte d'une lamelle et observée au microscope optique Optika à caméra intégrée aux grossissements X4, X10 pour une vue générale, puis X40 pour le détail des sclérites. Ces derniers ont été photographiés avec le logiciel Optika View Lite puis les images ont été traitées avec Adobe Photoshop 7.0.

D'autre part, pour observer la disposition des sclérites dans le tégument, un morceau de ce dernier incluant la face dorsale et ventrale de l'individu a été congelé puis, découpé en fines lamelles et déposé sur une lame. Quelques gouttes de Xylène ont été ajoutées au tégument coupé puis l'ensemble a été couvert de lamelle. Le xylène a pour objectif de rendre les tissus transparents (clarification) permettant ainsi l'observation des sclérites. L'ensemble a été gardé dans l'obscurité pendant plusieurs jours puis observés sous microscope optique.

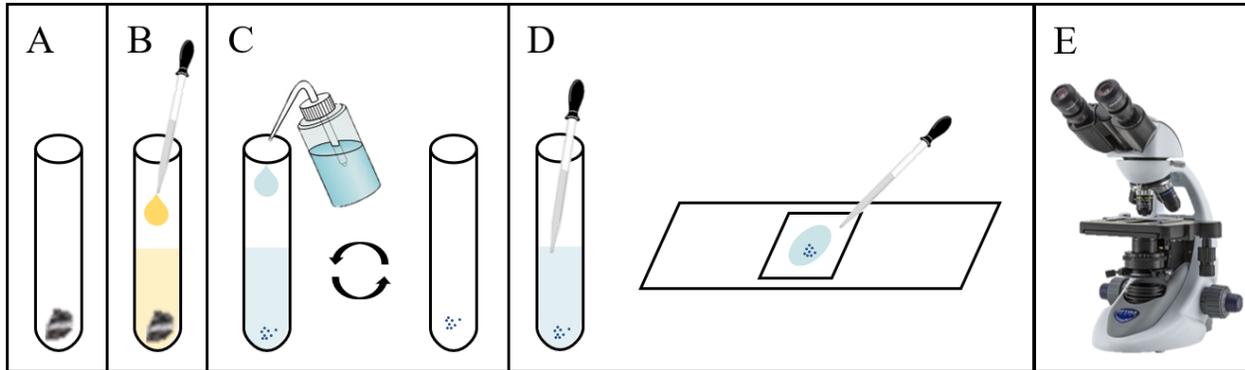


Figure 28: Les différentes étapes de l'extraction et la préparation des sclérites. **A.** Prélèvement des tissus des différentes parties du corps. **B.** Ajout de l'eau de Javel commercial pure. **C.** Plusieurs rinçages des sclérites à l'eau distillée. **D.** Prélèvement d'une goutte pour l'observation. **E.** Observation microscopique.

1.3. Etude morphométrique

Une étude morphométrique a été appliquée sur la forme la plus abondante de sclérite dans le derme de *P. regalis* à savoir les tables et ce, en prenant en considération deux mensurations qui sont le diamètre de la surface des disques (**Figure 29**). Pour chaque individu tacheté et non tacheté, 10 tables ont été mesurées (diamètre et surface) soit 120 au total à l'aide du logiciel ImageJ avec une précision de 0,001 μm .

Les différences entre les échantillons ont été vérifiées avec le test non paramétrique de Kruskal-Wallis H car les données se sont révélées non paramétriques après avoir testé la normalité et l'homogénéité de la variance par le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene, respectivement.

Lorsque des différences sont significatives, un test post-hoc de comparaison multiple de Dunn a été effectué pour identifier la source des différences. Les résultats des tests statistiques ont été considérés comme significatifs, lorsque $p < 0,05$. Les analyses ont été effectuées sous le logiciel R.

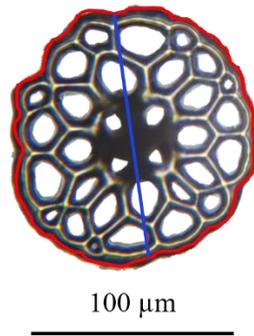


Figure 29: Mensurations effectuées sur les structures endosquelettiques (tables) de *Parastichopus regalis*. Rouge = Surface, Bleu = Diamètre.

2. *Holothuria algeriensis* et *Holothuria arguinensis*

L'identification des espèces *Holothuria algeriensis* et *H. arguinensis* a été faite sur la base d'une comparaison morphologique et endosquelettique avec les travaux taxinomiques de **González-Wangüemert et Borrero-Pérez (2012)**, **Mezali et Thandar (2014)** et **Mezali et al. (2021b)**. Dans un premier temps, les individus ont été décrit par la couleur du corps, la position de la bouche, de l'anus et des protubérances ainsi que le nombre des tentacules. Par la suite, les sclérites ont été extraits des morceaux de tissu de la face dorsale et ventrale des individus selon le protocole de **Samyn et al. (2006)** décrit ci-dessus pour l'espèce *P. regalis* afin de déterminer et comparer les formes caractéristiques de chaque espèce.

Chapitre II.3 : Biométrie des espèces d'holothuries étudiées

Chapitre II.3 : Biométrie des espèces d'holothuries étudiées

Dans ce chapitre, nous allons aborder uniquement la biométrie de *Parastichopus regalis* en étudiant la structure de sa population et sa croissance relative. Ces aspects n'ont pas été abordés pour les espèces *Holothuria algeriensis* et *H. arguinensis* à cause de leur effectif très faible.

1. Croissance relative

1.1. Relation biométrique

La longueur (L) et la largeur (l) des individus sont reliées par une relation linéaire ($y = b x + a$). La courbe de tendance linéaire permettra de déterminer les coefficients « b » qui est le coefficient de régression et le « a » qui est l'ordonnée à l'origine. Le test t de Student a été utilisé pour tester l'isométrie où la valeur de « b » observée a été comparée à une valeur théorique qui est égale à 1. Trois cas se présentent :

- a) $b < 1$, c'est-à-dire qu'il y a une allométrie minorante et la longueur croît moins rapidement que la largeur ;
- b) $b = 1$, c'est-à-dire qu'il y a une isométrie et la longueur et la largeur sont proportionnelles ;
- c) $b > 1$, c'est-à-dire qu'il y a une allométrie majorante et la longueur croît plus vite que la largeur.

1.2. Relation taille-poids

Pour éviter tout écart par rapport aux mesures précises des holothuries en raison de l'élasticité de la paroi du corps, nous avons utilisé la méthode décrite par **Yamana et Hamano (2006)** pour obtenir une taille plus précise. Cette méthode consiste à combiner la longueur et la largeur pour produire l'indice SLW qui est la racine carrée de la longueur multipliée par la largeur ($SLW = \sqrt{\text{Longueur} \times \text{Largeur}}$). Par la suite, la longueur du corps recalculée (L_e) a été estimée en utilisant la régression entre L vs SLW selon l'équation suivante : $L_e = b SLW + a$ (**Yamana et Hamano, 2006 ; Poot-Salazar et al., 2014 ; Siddique et Ayub, 2018 ; Haddi et al., 2021**).

La relation taille-poids a été estimée à l'aide de l'équation $Y = aX^b$ où « a » et « b » sont des coefficients, X est la longueur (L ou L_e) et Y est le poids. La courbe de tendance de type puissance

a permis de déterminer les coefficients « a » et « b ». Le test t de Student a été utilisé pour confirmer si les valeurs b obtenues sont significativement différentes des valeurs isométriques ($b = 3$). Trois cas se présentent (**Pauly, 1983**) :

- a) $b < 3$, c'est-à-dire qu'il y a une allométrie minorante et le poids croît moins rapidement que la longueur ;
- b) $b = 3$, c'est-à-dire qu'il y a une isométrie et le poids et la longueur sont proportionnelles ;
- c) $b > 3$, c'est-à-dire qu'il y a une allométrie majorante et le poids croît plus vite que la longueur.

Chapitre II.4 : Endosymbiote des espèces d'holothuries étudiées

Chapitre II.4 : Endosymbiote des espèces d'holothuries étudiées

Sur les trois espèces échantillonnées, nous avons trouvé le poisson *Carapus acus* associé uniquement à l'holothurie royale *Parastichopus regalis* qui est considérée comme son hôte préféré. L'objectif de ce chapitre est de décrire ce poisson et de comparer nos spécimens à ceux reportés dans la bibliographie dans d'autre région et ce, sur la base des mesures morphométriques.

1. Mensurations morphométriques de l'endosymbiote

Le poisson *Carapus acus* est souvent associé aux holothuries et a une préférence envers l'holothurie royale *P. regalis*. Lors de l'échantillonnage de *Parastichopus regalis*, sept individus de *C. acus* ont été trouvés associés à *P. regalis* soit à l'intérieur de leur cavité coelomique (trois individus) ou flottant dans les bacs d'eau de mer où les spécimens ont été mis avant la conservation. Les individus de poissons ont été conservés dans l'éthanol (96%).

Les spécimens collectés ont été pesés et mesurés. Huit mesures morphométriques ont été prises en considération (**Figure 30**) à savoir ; la longueur totale (LT), la hauteur du corps (HC), la longueur de la tête (LT), le diamètre des yeux (DY), la longueur pré-orbitaire (LPo), la longueur pré-pectorale (LPp), la longueur pré-dorsale (LPd) et la longueur pré-anale (LPa). Ces mensurations ont été choisies selon les travaux de **Enajjar et Bradai (2016)** et **El Aamri et Tamsouri (2018)** qui ont travaillé sur la même espèce de la côte tunisienne et marocaine respectivement et ce dans le but de comparer nos résultats aux siens.

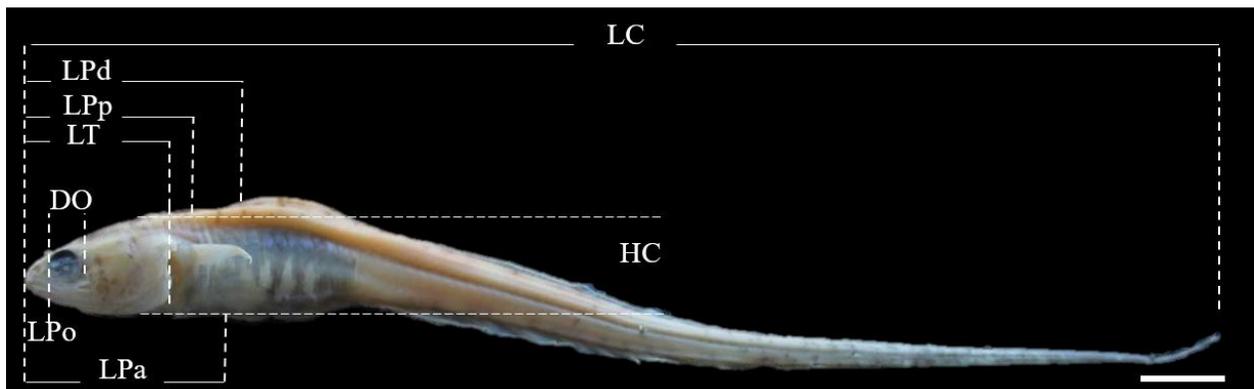


Figure 30: Mensurations effectuées sur les individus de *Carapus acus*.

Chapitre II.5 : Étude biochimique des espèces d'holothuries étudiées

Chapitre II.5 : Etude biochimique des espèces d'holothuries étudiées

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser dans un premier temps à la composition approximative du tégument de *Parastichopus regalis* et sa digestibilité par la pepsine. Ces analyses ont déjà été réalisées par **Mecheta et Mezali (2019)** et **Mecheta et al. (2020)** sur l'espèce *Holothuria arguinensis*. Quant à *H. algeriensis*, nous ne l'avons pas abordé ici étant donné que sa séparation de l'espèce *Holothuria tubulosa* n'était pas encore faite au moment de la réalisation des expérimentations de cette partie de la thèse. La deuxième partie de ce chapitre est consacrée à la caractérisation des glycosides triterpéniques des trois espèces d'holothuries étudiées étant donné que le profil des saponines n'est connu pour aucune d'entre elles.

1. Composition approximative du tégument

1.1. Taux d'humidité

Afin d'estimer le taux d'humidité du tégument de *P. regalis*, cinq (05) individus ont été pesés (poids humide), congelés, lyophilisés et repesés (poids sec). La lyophilisation a été choisie par rapport au séchage pour éviter d'altérer la composition biochimique des téguments par la température. La formule suivante a été utilisée pour calculer le taux d'humidité et le résultat a été exprimé en pourcentage en faisant la moyenne des échantillons traités.

$$\text{Taux d'humidité (\%)} = \frac{\text{Poids humide} - \text{Poids sec}}{\text{Poids humide}} \times 100$$

1.2. Taux de lipide

L'extraction des lipides du tégument de *P. regalis* a été réalisée selon la méthode de **Folch et al. (1957)** modifiée par **Low et Ng (1987)** sur deux individus. La méthode consiste à dissoudre 1 g de tégument lyophilisé dans 120 ml de la solution Folch qui est constitué d'un mélange de chloroforme/méthanol dans les proportions 2 : 1 (v/v). Le mélange a été homogénéisé pendant 2 h puis filtré sur papier filtre Whatman n° 1, par la suite, 30 ml (v/4) de NaCl à 0,73 % ont été ajoutés. La solution a été laissée à décanter pendant 2 h puis le chloroforme a été filtré sur sulfate de sodium

et récupéré dans un ballon préalablement pesé. Le méthanol a été rincé avec 40 ml de chloroforme et 10 ml de NaCl 0,58% et laissé à décanter pendant 30 min. Le chloroforme contenant les lipides a également été filtré sur le sulfate de sodium et récupéré dans le même ballon contenant déjà le chloroforme. Ce dernier a été éliminé avec l'évaporateur rotatif sous vide à 53°C. La teneur en lipides a été déduite par différence de poids selon la formule suivante et le résultat a été exprimé en pourcentage en faisant la moyenne des échantillons traités.

$$\text{Taux de lipide (\%)} = \frac{\text{Poids du ballon avec les lipides} - \text{Poids du ballon vide}}{\text{Poids de l'échantillon (1g)}} \times 100$$

1.3. Taux de cendre

Pour déterminer les cendres du tégument de *P. regalis*, environ 1 g de tégument lyophilisé a été complètement incinéré dans un four à moufle à 600°C pendant 6 h. les cendres exprimées en pourcentage représentent la différence entre le poids des échantillons avant et après incinération calculé selon la formule ci-dessous. Cette étape a été réalisée sur deux individus et le résultat a été exprimé en pourcentage en faisant la moyenne des échantillons traités.

$$\text{Cendre (\%)} = \frac{\text{Poids des creusets avant incinération} - \text{Poids des creusets après incinération}}{\text{Poids de l'échantillon (1g)}} \times 100$$

1.4. Teneur en sucres totaux

La détermination de la composition en sucres totaux a été réalisée selon la méthode colorimétrique de **Dubois *et al.* (1956)** adaptée pour les holothuries par **Wang *et al.* (2013)**. Le principe de la méthode repose sur le fait que les polysaccharides des holothuries sont solubles dans l'éthanol et après leur extraction dans ce dernier, ils sont d'abord hydrolysés en monosaccharides puis rapidement déshydratés pour produire des aldéhydes ou leurs dérivés qui réagissent avec le phénol pour donner des dérivés jaunes ayant une absorption maximale à une longueur d'onde (λ) de 490 nm.

Dans un premier temps, une gamme étalon de glucose anhydre a été réalisée de 0 à 100 µg/ml. D'autre part, l'extraction des sucres a été réalisée sur 1 g d'échantillon avec 50 ml d'éthanol 80% dans un bain-marie à 40 °C pendant 1 h. Le mélange a été ensuite filtré après refroidissement et rincé 2 à 3 fois avec l'éthanol avec un volume constant.

Pour 1 ml de solution standard ou d'échantillon, 1 ml de solution phénol à 5% et 5 ml d'acide sulfurique ont été ajoutés, le mélange a été incubé à température ambiante pendant 10 minutes puis au bain-marie à 40 °C pendant 20 minutes. La mesure de la densité optique a été faite à 490 nm et la teneur totale en sucre a été calculée selon la formule ci-dessous. Cette étape a été réalisée sur trois individus et le résultat a été exprimé en g/100g en faisant la moyenne des échantillons traités.

$$\text{Teneur en sucre (\%)} = \frac{p1 \times V0 \times 10^{-6}}{p0 \times V1} \times 100$$

Où p0 = poids de l'échantillon (g), p1 = la teneur en glucose trouvée à partir de la courbe d'étalonnage (µg), V0 = le volume final de l'éthanol après prétraitement de l'échantillon (ml), V1=Volume de filtrat prélevé lors de la mesure (ml).

2. Digestibilité du tégument par la pepsine

La digestibilité *in vitro* du tégument des individus de *P. regalis* a été réalisée à l'aide d'une enzyme digestive qui est la pepsine (1 : 10 000). Cette étape a été réalisée en trois répétitions sur trois individus différents selon le protocole d'**Escudero et al. (2010)** modifié par **Wen et al. (2015)**. Pour cette étude, 0,5 g de tégument sec lyophilisé a été homogénéisé deux fois dans 2 ml d'eau distillée pendant 1 min à 6000 rpm puis le pH a été ajusté à 2 avec l'HCL (1 M) avant d'ajouter de la pepsine 1:10 000 à raison de 5% par rapport au poids sec du tégument. Le mélange a été maintenu à 37°C pendant 2 h, puis le pH a été ajusté à 7 avec du NaOH (1 M) pour inactiver la pepsine. Le tégument non digéré a été séché à 60°C pendant 72 h puis pesé. La digestibilité du tégument par la pepsine a été calculée selon la formule suivante. Pour chaque individu, trois répliques ont été réalisés et le résultat a été exprimé en pourcentage en faisant la moyenne des échantillons traités.

$$\text{Digestibilité (\%)} = \frac{W_i - W_f}{W_i} \times 100$$

Où W_i = Poids sec du tégument avant la digestion par la pepsine et W_f = Poids sec du tégument digéré par la pepsine.

3. Caractérisation des saponines des espèces d'holothuries étudiées

La caractérisation des saponines a été réalisée au laboratoire de biologie des organismes marins et de biomimétisme (BOMB) ainsi que le laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs) de l'Université de Mons en Belgique pour les trois espèces d'holothurie à savoir *P. regalis*, *H. arguinensis* et *H. algeriensis* qui proviennent du Centre et de l'Ouest de la côte algérienne. Au total, 27 individus de *P. regalis*, trois individus de *H. algeriensis* et cinq individus de *H. arguinensis* ont été analysés lors de cette étude.

3.1. Extraction des saponines

L'extraction des saponines a été effectuée sur des individus lyophilisés et d'autres conservés dans l'éthanol en suivant le protocole de **Van Dyck et al. (2009)** modifiée par **Decroo et al. (2017)**. Etant donné que l'extraction s'effectue dans le méthanol, l'éthanol dans lequel ont été conservés les échantillons a été évaporé avec le l'évaporateur rotatif Heidolph Laborota 4001 à une température de 46°C. L'extrait sec a été récupéré dans le méthanol et les tissus ont été également coupés en petits morceaux et conservés dans le méthanol toute la nuit puis broyé avec un homogénéisateur 18h monté sur un mécanisme d'entraînement Heidolph Silent Crusher M ou d'un mortier (**Figure 31A**). Quant aux échantillons lyophilisés, ils ont été broyés et placés dans le méthanol toute la nuit. Par la suite, l'ensemble a été filtrés deux fois sous vide avec un entonnoir de type Büchner à l'aide d'un papier filtre Whatman n° 41 (20 µm) et un papier filtre Whatman n° 1 (11 µm). Dans certains cas, une étamine a été utilisée au préalable pour faciliter la filtration.

Les filtrats ont été ensuite dilués avec l'eau Milli-Q afin d'obtenir une concentration en méthanol de 70%. Trois décantations liquide-liquide ont suivi et la phase hydro-méthanolique a été conservée à chaque fois (**Figure 31B**).

La première décantation a été effectuée contre le n-hexane (v/v), celui-ci possède une masse volumique de 0,659 g/ml inférieure à celle du méthanol qui est de 0,791 g/ml. Ainsi, la phase récupérée est la phase inférieure. La deuxième et la troisième décantations ont été effectuées avec le dichlorométhane (v/v) et le chloroforme (v/v) respectivement. Ces derniers ont des masses volumiques supérieures à celle du méthanol (1,325 g/ml et 1,492 g/ml respectivement), ainsi, les phases récupérées sont les phases supérieures.

La phase hydro-méthanolique finale a été évaporée sous vide à une température de 46 °C au moyen d'un évaporateur rotatif (**Figure 31C**), l'extrait sec a été récupéré dans un mélange d'eau Milli-Q/ Iso-butanol (v/v). La fraction butanolique a été rincée une seconde fois avec de l'eau Milli-Q afin d'éliminer les sels.

La fraction butanolique a été récupérée et séchée à l'évaporateur rotatif pour ne laisser qu'environ 5 ml d'Iso-butanol contenant les saponines. Finalement, le volume de l'Iso-butanol a été partagé entre différents Eppendorf préalablement pesés à raison de 0,8 ml par Eppendorf pour éliminer le solvant restant avec un Speed Vac (Jouan RC 10.22) (**Figure 31D**) pendant 4h (deux cycles de 2 h). Les Eppendorf ont été ensuite pesés pour déterminer le poids des saponines puis conservées à 4 °C.



Figure 31: A. Broyage des échantillons. B. Séparations densitométriques. C. Roto-évaporation avec la formation de mousse. D. Séchage des extraits butanoliques au speed Vac Jouan RC 10.22.

3.2. Caractérisation des saponines par les techniques de la spectrométrie de masse

3.2.1. Présentation du spectromètre de masse et ses utilisations

La spectrométrie de masse est une technique analytique puissante qui mesure précisément les masses moléculaires de composés et d'atomes individuels en les convertissant en ions chargés (Dass, 2007). Ainsi, elle est probablement la technique analytique la plus polyvalente et la plus complète actuellement à la disposition des chimistes et des biochimistes et elle est devenue intimement liée aux nombreux domaines scientifiques notamment la pharmacie, la médecine, la biologie, la physique, l'industrie pétrolière ...etc. (Dass, 2007 ; Gross, 2017).

Le principe de base de la spectrométrie de masse (MS) est dans un premier temps de générer des ions à partir de composés inorganiques ou organiques par toute méthode appropriée et de les convertir dans la phase gazeuse. Cette étape nécessite le retrait ou l'ajout d'un électron ou d'un ou plusieurs protons, l'énergie excédentaire transférée lors d'un événement d'ionisation peut briser la molécule en fragments caractéristiques. Par la suite, ces ions sont séparés par leur rapport masse sur charge (m/z) et enfin détectés qualitativement et quantitativement par leur m/z et abondance respective. Le logiciel de contrôle présente ces données sous forme de spectre de masse. L'analyte peut être ionisée thermiquement, par des champs électriques ou par impact d'électrons, d'ions ou de photons énergétiques. La séparation des ions est effectuée par des champs électriques ou magnétiques statiques ou dynamiques mais peut également être effectuée dans des régions sans champ, à condition que les ions possèdent une énergie cinétique bien définie à l'entrée de la trajectoire de vol (Dass, 2007 ; Watson et Sparkman, 2007 ; Gross, 2017 ; Kaltashov *et al.*, 2022). Ainsi, le spectromètre de masse se compose d'une source d'ions, d'un analyseur de masse et d'un détecteur (Figure 32) (Gross, 2017 ; Smoluch *et al.*, 2019). Les trois premières étapes de la spectrométrie de masse sont réalisées sous vide, ce qui permet aux ions de se déplacer librement dans l'espace sans entrer en collision ni interagir avec d'autres espèces. Les collisions peuvent conduire à la fragmentation des ions moléculaires et peuvent également produire une espèce différente par le biais de réactions ion-molécule. Ces processus réduiront la sensibilité, augmenteront l'ambiguïté de la mesure et diminueront la résolution (Dass, 2007).

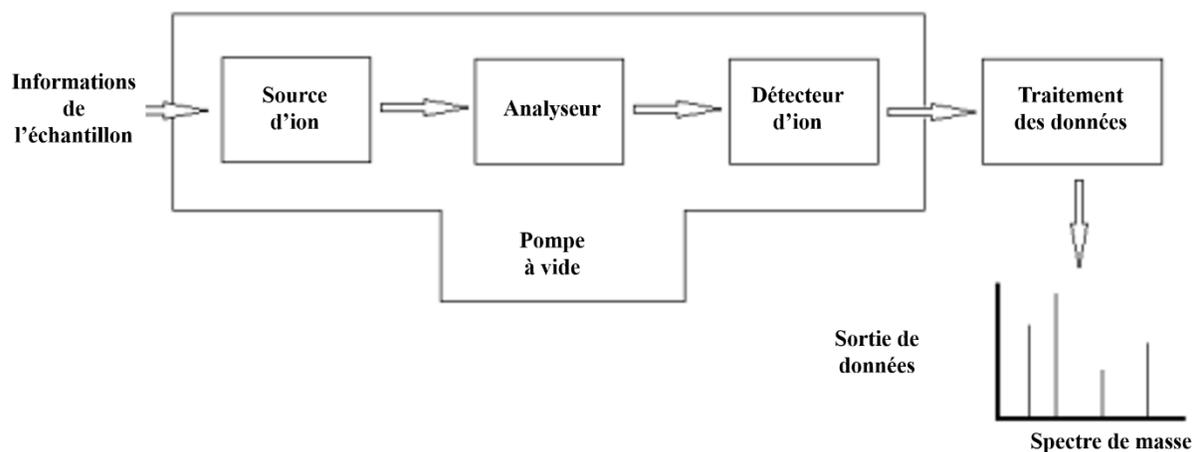


Figure 32: Schématisation des composants du spectromètre de masse (Saang'onyo, 2011)

Lors de l'interprétation des données obtenues de l'analyse, il convient de noter avec soin que la valeur m/z ne peut pas toujours être directement liée à la masse moléculaire du composé analysé. Cela se produit lorsque plusieurs charges sont attachées à la molécule (ionisation multiple). La multiplicité des ionisations dépend de la source d'ions utilisée et de leurs différents types (Watson et Sparkman, 2007 ; Smoluch *et al.*, 2019).

Selon le type de molécule à analyser, il existe différents moyens d'introduction des molécules [Direct, chromatographie liquide (LC), chromatographie gazeuse (GC), ...etc.], différents types de source d'ionisation [Ionisation par électronébuliseur (ESI), Désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI), Ionisation électronique (EI), Ionisation chimique (CI) ...etc.], d'analyseurs [Orbitrap, Piège à ion (IT), Temps de vol (ToF), quadripôle (Q), Mobilité ionique (IM) ... etc.] et de détecteurs (canaux multiplicateur d'électrons (MCP), électromultiplicateur ...etc.) (Smoluch *et al.*, 2019).

La désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI) (Figure 33A) fait partie des techniques d'ionisation qui produisent des ions moléculaires à partir de surfaces solides en combinant les processus de désorption et d'ionisation. Ceci est généralement réalisé en incorporant les molécules d'analyte (par exemple, des protéines ou d'autres biopolymères) dans des microcristaux constitués des molécules dites de matrice simplement en séchant les solutions de matrice concentrées qui incorporent de petites quantités de l'analyte (Kaltashov *et al.*, 2022). L'échantillon est mélangé avec la matrice et co-cristallisé pour obtenir un rapport molaire

d'environ 1 :5000 ensuite déposé dans une plaque en acier inoxydable avant l'analyse dans le spectromètre de masse (**Watson et Sparkman, 2007**).

La MALDI produit principalement des ions à charge unique, généralement par protonation (MH^+) et/ou formation d'adduits d'ions de métaux alcalins (par exemple, MNa^+). Bien que la majorité des mesures MALDI-MS soient effectuées en mode ions positifs, la génération d'ions négatifs est également possible (généralement via la déprotonation ou la formation d'adduits d'anions, par exemple, $[M-H]^-$ ou $[M + Cl]^-$) (**Kaltashov et al., 2022**).

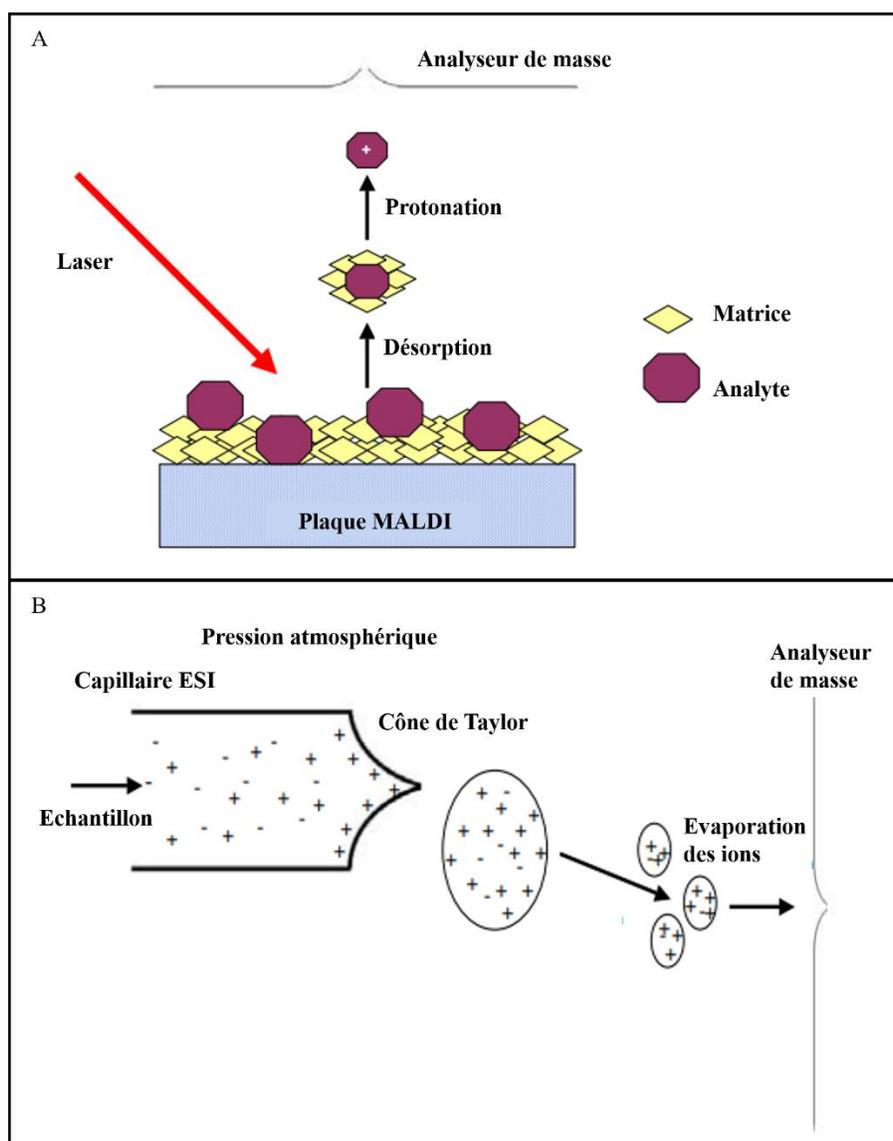


Figure 33: **A.** Représentation simplifiée du processus MALDI. **B.** Représentation simplifiée du processus ESI (**Graham et al., 2007**)

L'ionisation par électronébuliseur (ESI) (**Figure 33B**) est une autre méthode couramment utilisée pour générer des ions biomoléculaires. Contrairement au MALDI, l'ESI désorbe et ionise les molécules d'analyte directement à partir d'une solution, plutôt qu'à partir d'un état solide. La solution d'analyte est généralement pompée à travers un capillaire qui est porté à un potentiel électrostatique élevé appliqué à l'extrémité du capillaire et crée des conditions d'instabilité particulières entraînant la formation d'un fin jet de liquide chargé qui sort à travers la pointe du capillaire appelé cône de Taylor libérant ainsi des molécules d'analyte sous forme d'ions (**Graham et al., 2007**). Contrairement au MALDI, l'ESI peut produire des ions à charges multiples (**Watson et Sparkman, 2007**).

3.2.2. Analyse par spectrométrie de masse

Dans le but de sélectionner les extraits contenant les saponines et déterminer leur formule moléculaire, tous les échantillons ont été analysés par la méthode d'ionisation MALDI sur le spectromètre de masse hybride Waters Q-ToF Premier (Waters, Manchester, RU) (**Figure 34**) muni de deux analyseurs ; le Quadripôle et le ToF à accélération orthogonale (ao).



Figure 34: Spectromètre de masse Waters Q-ToF premier du laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs).

Les extraits secs de saponines ont été dissous dans une solution eau Milli-Q/Acétonitrile à 60/40 pour arriver à une concentration de 1 mg/ml puis passé dans un bain à ultrasons pendant 5 à 10 minutes (**Figure 35A**).

La matrice utilisée pour l'analyse des saponines a été préparée d'un mélange de 25 mg d'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB) et de 6 µl de n,n-diméthylaniline (DMA) dans 250 µl d'eau Milli-Q/Acétonitrile (v/v). La réaction du DHB avec le DMA est une réaction acide/base, elle permet la formation d'un cation qui à son tour permet de désorber les saponines.

D'autre part, pour calibrer les spectres, le polymère PEG 600–2000 à une concentration de 1 mg/ml a été utilisé avec une matrice composée de 4 mg de 2-[(2E)-3-(4-tert-Butylphényl)-2-méthylprop-2-enylidène]malononitrile (DCTB) dilué dans 100 µl de chloroforme.

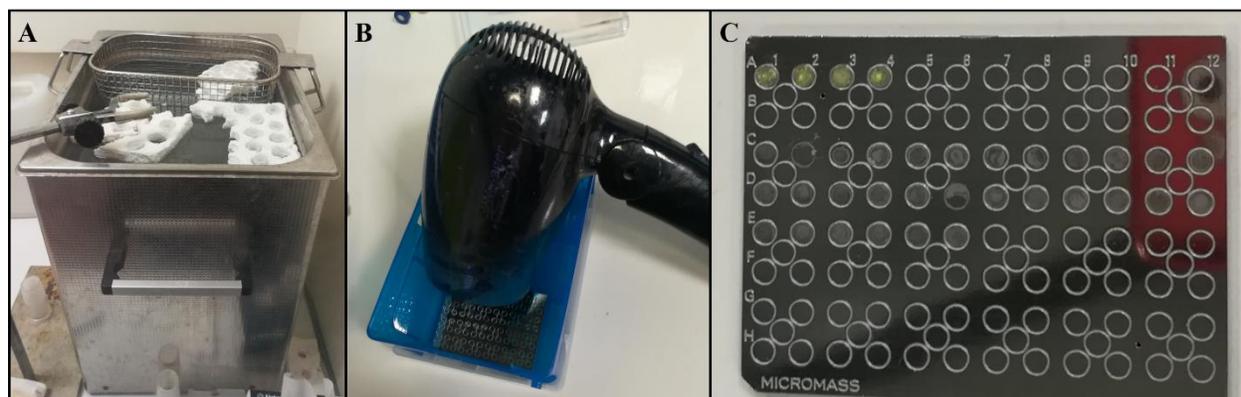


Figure 35: **A.** Bac à ultrasons. **B.** Séchage de la plaque MALDI au sèche-cheveux. **C.** Plaque MALDI après dépôt des échantillons (le calibrant est déposé dans les quatre puits de la rangée A tandis que les échantillons sont déposés dans les rangés B, C, D et E).

Plusieurs méthodes de dépôt des échantillons sur la plaque MALDI existent (**Demeyer, 2015**) dont la méthode du droplet qui a été adoptée lors de ce travail (**Tableau 6**), elle consiste à déposer une goutte d'échantillon sur une goutte de matrice sèche.

Tableau 6: Quelques méthodes de dépôt utilisées. Noir : Plaque MALDI, Bleu : matrice, Jaune : échantillon, Vert : mélange de l'échantillon et de la matrice (**Demeyer, 2015**).

Méthode de dépôt	Schémas
Droplet	
Mélange v/v	
Sandwich	

Dans les quatre premiers spots de la plaque MALDI a été déposée une goutte de la matrice du calibrant ensuite une goutte du calibrant PEG. La matrice des saponines et les échantillons à analyser ont été ensuite déposés dans les spots suivants. Les gouttes déposées doivent être séchées avec un sèche-cheveux (**Figure 35B**) pour accélérer le processus avant et après l'ajout du calibrant ou de l'échantillon (**Figure 35C**). Après avoir déposé la solution à analyser, la matrice se redissout et se mélange avec l'échantillon étant donné qu'elle est soluble dans l'eau et l'ACN ajoutés aux

extraits secs des saponines. La plaque a été ensuite introduite dans le spectromètre MALDI Q-ToF après la formation du co-cristal.

Les échantillons ont été analysés en mode ion positif. Les ions détectés correspondent à des adduits de Na^+ sur les saponines et sont donc détectés à une $m/z = [M+23]$. La source MALDI a été composée d'un laser Nd-YAG, fonctionnant à 300 nm avec une énergie d'impulsion maximale de 104,1 μJ délivrée à l'échantillon en une impulsion de 2,2 ns à une fréquence de 200 Hz. Pour l'enregistrement des spectres MALDI-MS en une seule étape, le quadripôle a été réglé pour faire passer les ions entre m/z 250 et 2500 et tous les ions ont été transmis dans la région pousseur de l'analyseur de temps de vol où ils ont été analysés en masse avec un temps d'intégration de 1 s. Les analyses de masse ont été réalisées avec l'analyseur ToF en mode réflectron, offrant une résolution proche de 10 000 (FWHM).

3.2.3. Calcul de la masse exacte des saponines par la spectrométrie de masse à haute résolution

Les spectromètres de masse à haute résolution ont évolué avec l'introduction des analyseurs temps de vol (ToF), Orbitrap, ...etc. et les instrument hybrides tels que le quadripôle ToF (Q-ToF), le piège à ion (IT-ToF), le quadripôle à piège linéaire (LTQ), Orbitrap ou le QeOrbitrap. Ces derniers analyseurs fournissent des spectres de haute résolution, en plus de mesures de masse précises qui sont d'une grande applicabilité à la fois pour la confirmation de composés cibles et l'identification de composés inconnus (**Lin et al., 2015**). Ils peuvent différencier deux pics avec de petites différences de m/z et ont souvent une précision de quatre à six décimales par rapport à la masse exacte (**Ekman et al., 2009 ; Geer Wallace et McCord, 2020**). Cette dernière désigne la somme calculée des masses des isotopes atomiques individuels qui composent la formule moléculaire (**Geer Wallace et McCord, 2020**). Elle est très utile pour l'élucidation de composés inconnus pour des analytes ayant la même masse nominale mais avec de très petites différences dans leurs masses exactes (**Arrebola-Liébanas et al., 2017**). Le **Tableau 7** représente les masses exactes des isotopes stables des éléments trouvés dans les analyses HRMS.

L'étalonnage de masse est un processus pertinent dans chaque spectromètre de masse pour une représentation correcte des ions dans l'axe m/z . Cela se traduit par une résolution et précision

de masse élevée (**Gross, 2017**). Pour cela, généralement, des composés de référence de masse avec une compilation de valeurs m/z bien connues sont nécessaires et le choix du composé d'étalonnage de masse dépend de la méthode d'ionisation et de l'analyseur de masse utilisé cependant, il devrait produire suffisamment d'ions abondants régulièrement espacés sur toute la plage de balayage (**Arrebola-Liébanas et al., 2017**).

La composition élémentaire des ions détectés a été déterminé sur la base des mesures de masse précises (HRMS-MALDI) avec le PEG comme étalon externe (masse de verrouillage).

Tableau 7: Les masses exactes de certains éléments organiques trouvés dans les analyses HRMS (**Geer Wallace et McCord, 2020**).

Elément	Masse exacte (Da)	Masse nominale (Da)
Hydrogène (H)	1,007825032	1
Carbone (C)	12,00000000	12
Azote (N)	14,00307400	14
Oxygène (O)	15,99491462	16
Soufre (S)	31,972071174	32

3.2.4. Analyse par la spectrométrie de masse en tandem

Cette analyse a été effectuée par le spectromètre de masse Synapt G2-Si (**Figure 36**) uniquement sur les extraits dont l'analyse MALDI-MS montre qu'ils présentent des saponines et dont la formule moléculaire est obtenue par la HRMS-MALDI.

Dans un premier temps et afin d'identifier la présence d'isomères et de quantifier leurs proportions relatives, une chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) a été réalisée au moyen du Waters Acquity UPLC H-Class (Waters, Manchester, RU) couplé au spectromètre de masse Waters Synapt G2-Si. Cette technique permet de séparer les composées selon leur affinité avec une colonne apolaire Acquity UPLC BEH C18 ; 2,1 X 50 mm ; 1,7 m à 40 °C. Pour ces analyses, les extraits ont été dissous dans une solution eau Milli-Q/Acétonitrile à 60/40 pour arriver à une concentration de 0,1 mg/ ml. Un volume de 5 µl a été injecté dans la colonne. La phase mobile a été programmé avec un débit constant de 250 µl/ min et consistant en un gradient d'éluion qui commence avec 85 % de l'éluant A (eau Milli-Q avec 0,1 % d'acide formique) et 15 % de l'éluant B (Acétonitrile), atteint 60 % de l'éluant A et 40 % de l'éluant B à 6 min où il est

maintenu pendant 3 min. A 11 min, le ratio atteint 5 % de l'éluant A et 95 % de l'éluant B où il est maintenu pendant 1 min puis ramené à 85 % de l'éluant A et 15 % de l'éluant B à 13 min et maintenu ainsi jusqu'à la fin de la chromatographie (15 min).



Figure 36: Spectromètre de masse Synapt G2-Si du laboratoire de Synthèse et Spectrométrie de Masse Organiques (S²MOs).

L'ionisation des saponines a été produite au moyen d'une ionisation par électronébulisateur (ESI) en mode positif générant ainsi des ions $[M+H]^+$. Les analyses ont été réalisées en appliquant les conditions suivantes : température en source 100 °C, température de désolvatation de 300 °C, tension capillaire de 3,1 kV, tension de cône 40 kV, offset source 80 V pour une plage de masse entre des m/z 50 et 2000, avec un temps d'intégration de 1s. l'azote sec a été utilisé comme gaz ESI avec un débit de 500 L/h.

Par la suite, une analyse de spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) a été réalisée. Les ions d'intérêt ont été sélectionnées en masse par le

quadripôle et soumis à une dissociation induite par collision contre l'argon (Ar) dans la cellule Trap du dispositif Tri-Wave et l'énergie cinétique du cadre du laboratoire (Elab) a été établie à 25 eV. Les ions fragments ont été mesurés en masse avec l'analyseur ToF.

3.2.5. Observation des spectres et traitements des résultats obtenus

Le logiciel MassLynx V4.1 (Waters, Manchester, RU) a été utilisé pour paramétrer l'instrument ainsi que pour l'observation, l'analyse et le traitement des résultats. A partir des chromatogrammes observés, ce logiciel donne la possibilité de déterminer la composition élémentaire des molécules de saponines et de calculer les proportions molaires des isomères.

Les masses sur charge et les formules moléculaires obtenues dans la première étape par la MALDI-MS et la HRMS ont été comparées avec les résultats obtenus dans la bibliographie pour trouver les saponines qui pourraient y correspondre.

La reconstitution des molécules et l'identification de saponines ont été faites à partir des spectres obtenus lors de l'analyse LC-MS/MS en identifiant les différences entre deux pics successifs de m/z et en se basant sur les différents travaux qui ont été fait sur les saponines d'holothuries (**Van Dyck *et al.*, 2009 ; Caulier *et al.*, 2011, 2013 ; Caulier-Mezali *et al.*, 2016 ; Puspitasari *et al.*, 2022 ; Savarino *et al.*, 2022**). La structure chimique des saponines a été ensuite dessinée avec le logiciel Chemdraw Professional 16.0.

Chapitre III : Résultats et Discussion

Chapitre III.1 : Identification

systematique des espèces d'holothuries étudiées

Chapitre III : Résultats et discussion

Chapitre III.1. Identification systématique des espèces d'holothuries étudiées

1. Identification systématique de *Parastichopus regalis*

Parmi l'ensemble des individus de *Parastichopus regalis* échantillonnés, douze ont été sélectionnés dont six tachetés et six non tachetés pour une étude de systématique comparative et ce, sur le plan morphologique, endosquelettique et morphométrique.

1.1. Morphotype non tacheté

1.1.1. Etude morphologique

La longueur contractée du corps des six individus non tachetés est comprise entre 10,50 et 20,50 cm, la largeur du corps est entre 3 et 5,90 cm et le poids humide total est entre 6,34 et 71,24 g. Le corps est mou. La face ventrale (trivium) est aplatie tandis que la face dorsale (bivium) est arquée. Les deux faces sont séparées par un pli latéral distinct de chaque côté portant de grandes papilles. La coloration de la face dorsale est brune rougeâtre, caractérisée par des papilles coniques blanches uniformément réparties (**Figure 37A**). La face ventrale présente plusieurs rangées de podia disposées en trois zones distinctes, deux zones externes de couleur brune blanchâtre et une mi-ventrale de couleur rouge vif formant un sillon distinct (**Figure 37B**). La bouche est située en position ventrale et entourée de 20 tentacules peltées disposés en deux cercles ; interne et externe (**Figure 37C**). L'anus est situé en position terminale. La bouche et l'anus sont bordés chacun de deux papilles (d'environ 1 cm), plus grandes que celles de la paroi du corps (**Figure 37D1**). De petites taches noires, chacune d'environ 1 mm de diamètre, recouvrent les faces dorsale et ventrale. L'épaisseur du tégument dorsal est comprise entre 1,69 et 4,74 mm et celle du tégument ventral est entre 1 et 5,01 mm.

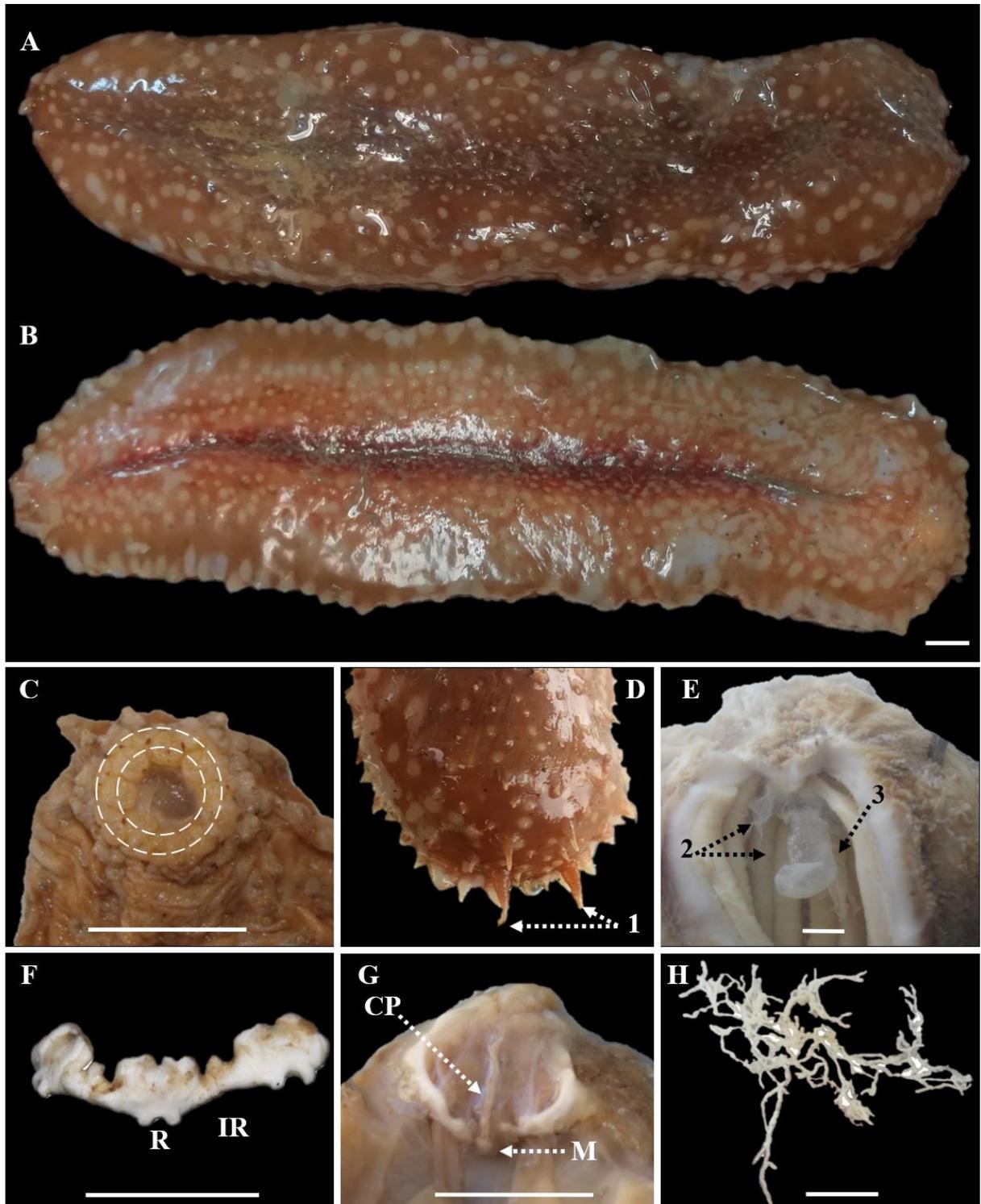


Figure 37: Caractères morphologiques du morphotype non tacheté de *Parastichopus regalis*. **A.** Face dorsale. **B.** Face ventrale. **C.** Disposition des tentacules en deux cercles (indiqués par les cercles en pointillés). **D.** 1. Papilles plus grosses de chaque côté de la bouche. **E.** 2. Ampoules de tentacules. **E.** 3. Vésicule de Poli. **F.** Anneau calcaire (**R.** Plaque radiale et **IR.** Plaque interradiale). **G.** 4. Canal de pierre (CP) et madreporite (M). **H.** tubules gonadiques. Barre d'échelle = 1 cm.

L'anneau calcaire est d'environ 10,65 mm de diamètre moyen. Les muscles longitudinaux sont plats, attachés à la paroi du corps, appariés, chacun d'environ 5,66 mm d'épaisseur et sont fins au point d'insertion dans l'anneau calcaire. Leur couleur est blanchâtre à l'état frais mais se transformant en couleur crème dans l'alcool. Les « tubes de Cuvier » sont absents. Les ampoules tentaculaires sont d'environ 1,10 à 13 mm de longueur (**Figure 37E2 ; Tableau 8**). Une seule vésicule de Poli est présente d'une longueur moyenne d'environ 19,23 mm (**Figure 37E3**) attachée à la partie ventrale de l'anneau aquifère (**Figure 37F**). Un seul canal de pierre d'une longueur moyenne de 9,68 mm est attaché à la partie dorsale de l'anneau calcaire. La madréporite est arrondie et attachée à la partie interne de paroi dorsale du corps (**Figure 37G4**).

La détermination du sexe de chaque individu s'est avérée impossible et ce, en raison de la perte des gonades par éviscération sous stress. Néanmoins des observations microscopiques et macroscopiques d'une gonade mâle et une femelle ont été effectuées. Sur le plan macroscopique les gonades mâles et femelles sont sous forme d'une touffe de tubules très ramifiées avec étranglements de couleur blanchâtre (**Figure 37H**) pour les deux sexes (après conservation dans l'éthanol). Sur le plan microscopique et selon la classification de **Ramón *et al.* (2022)** les gonades observées des deux sexes sont partiellement pondues. Les tubules gonadiques femelles (**Figure 38A et B**) ont une paroi similaire à celle des mâles et des ovocytes dont le diamètre est d'environ $0,468 \pm 0,074 \mu\text{m}$ sont dispersées dans la lumière tubulaire avec le tissu phagocytaire. Les tubules gonadiques mâles (**Figure 38C et D**) présentent une paroi plate, plus ou moins plissée et une lumière contenant des spermatozoïdes dans certains endroits et dans d'autres vides.

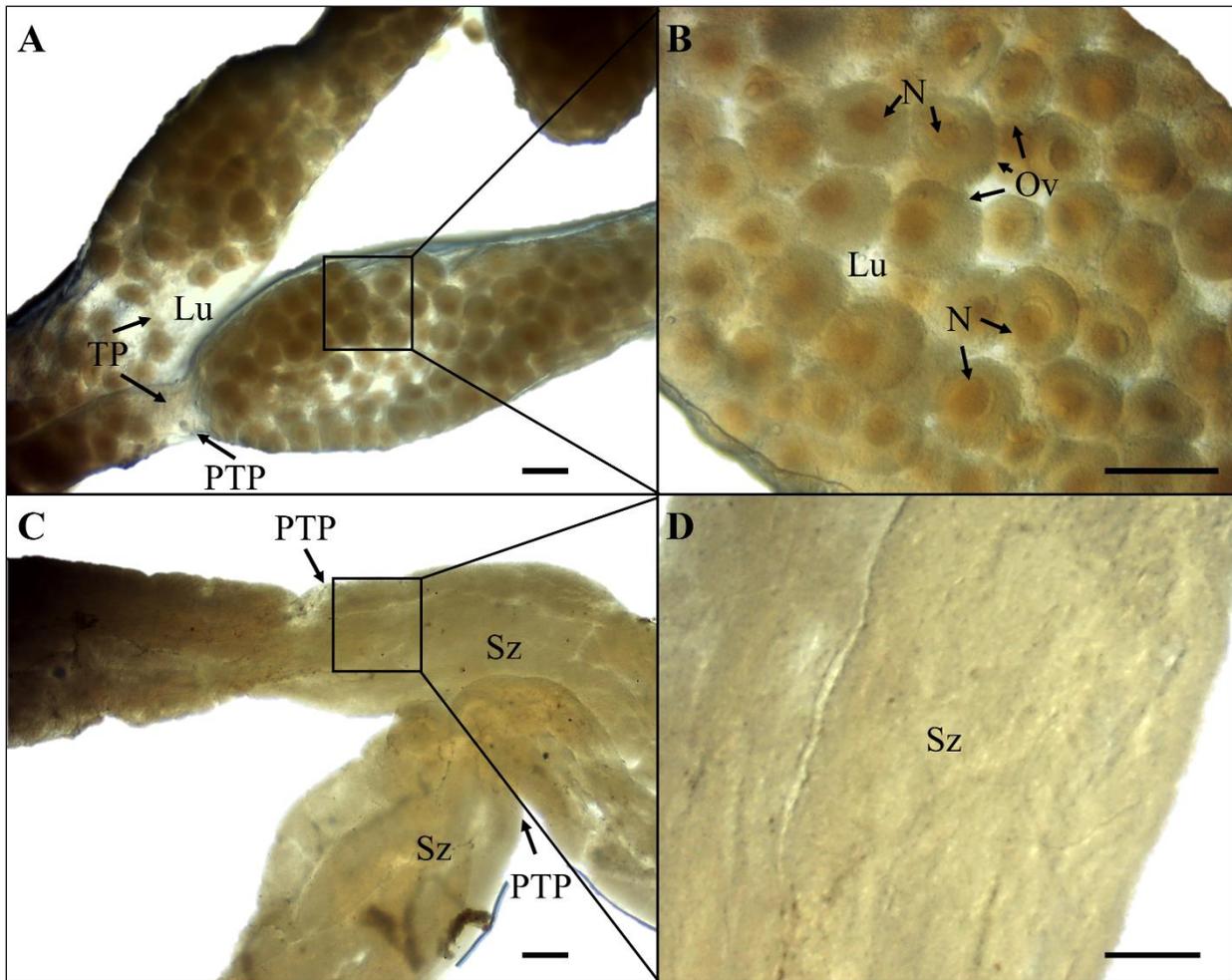


Figure 38: Aspect microscopique des gonades de *Parastichopus regalis* tacheté. **A** et **B**. Gonade femelle. **C** et **D**. Gonade mâle. **Lu**. Lumière ; **TP**. Tissu phagocytaire ; **PTP**. Paroi tubulaire plissée ; **Sz**. Spermatozoïdes ; **N**. Noyau ; **Ov**. Ovocytes. Barre d'échelle = 200 μ m.

1.1.2. Etude endosquelettique

Les sclérites présents dans les différentes parties du corps du morphotype non tacheté de *P. regalis* sont résumés dans la **Figure 39**. La partie anale (**Figure 39A**), la face dorsale (**Figure 39B**) et la face ventrale (**Figure 39C**) semblent présenter des sclérites identiques comprenant que des tables. Ces dernières (**Figure 39Aa, Ba, Ca**) apparaissent plus ou moins symétriques avec un disque plat à bord lisse, perforé de 3 à 6 trous centraux (celle avec 4 perforations étant les plus abondants) et de 20 à 60 trous marginaux. Le disque a un diamètre moyen d'environ 99,667 μ m et une superficie

moyenne de 7571,660 μm^2 . La flèche de la table est d'environ 67,521 μm de hauteur, elle présente 4 piliers effilés à l'extrémité et 3 à 4 barres transversales (**Figure 39Ac**).

Les papilles et les pédicelles présentent un autre type de sclérites qui sont les plaques perforées (**Figure 39Ab, Bb, Cb**). Ces dernières sont d'une longueur moyenne d'environ 222,837 μm et sont droites ou courbées, lisses ou épineuses avec une partie centrale élargie et perforée et des extrémités légèrement élargies et perforées. La région anale présente également des plaques (**Figure 39Ad**). Les plaques terminales de la face ventrale sont de deux types ; plaques terminales ovales et complètes (**Figure 39Cc**), les premières sont ovales ou irrégulières, les secondes sont arrondies, légèrement concaves médialement. Les plaques sont percées de petites perforations, les médianes étant de taille plus importante par rapport aux marginales. Les plaques ovales mesurent en moyenne 146,424 μm de longueur et 86,150 μm de largeur tandis que le diamètre moyen des plaques circulaires est d'environ 209,472 μm . Les tentacules (**Figure 39D**) présentent trois types de bâtonnets à savoir les bâtonnets allongés (**Figure 39Da**), arqués (**Figure 39Db**) et ramifiés avec des extrémités perforées (**Figure 39Dc**). Le cloaque (**Figure 39E**) présente des tiges à ramifications dichotomiques.

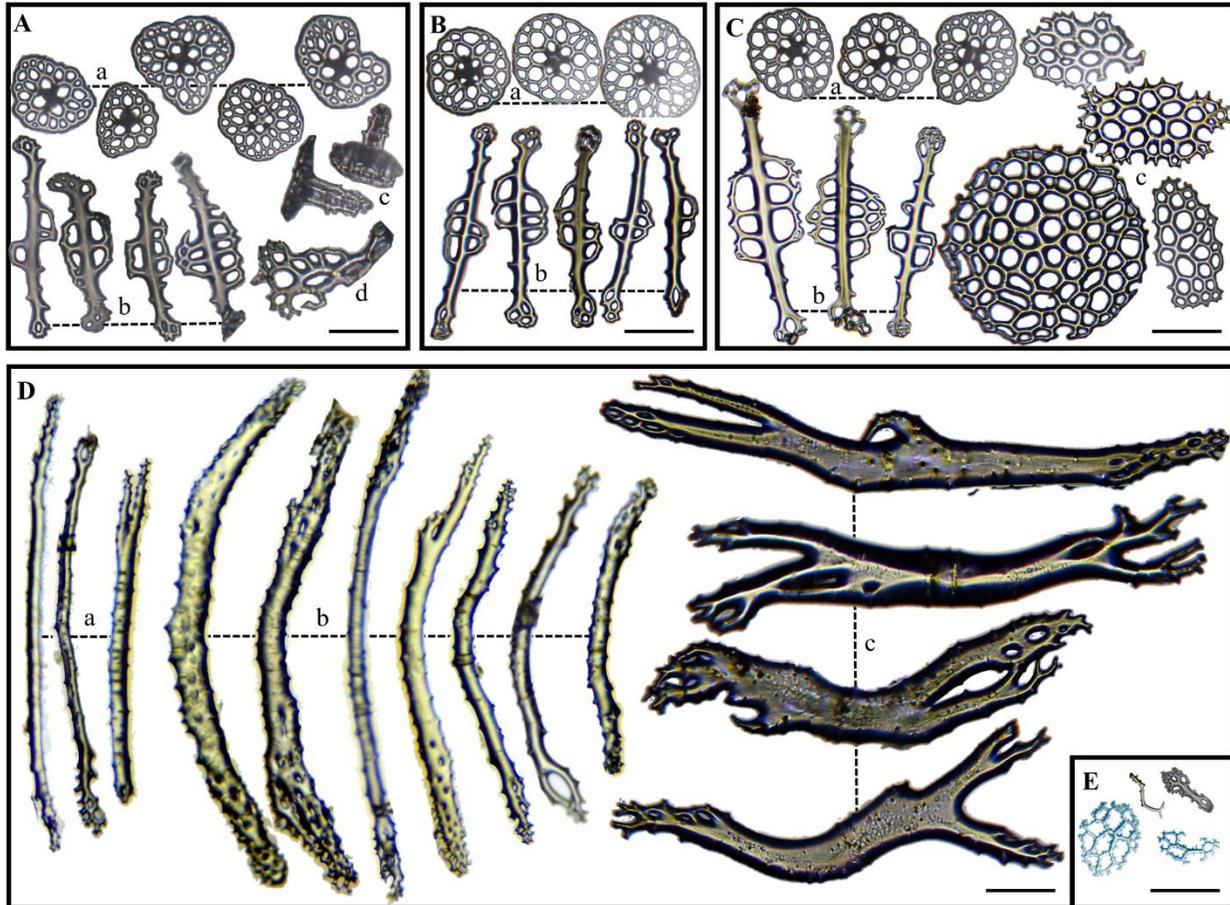


Figure 39: Sclérites des différentes parties du corps du morphotype non tacheté de *Parastichopus regalis*. **A.** Région anale. **a.** Tables. **b.** Plaques perforées. **c.** Flèches des tables. **d.** Plaques terminales. **B.** Face dorsale et papilles. **a.** Tables. **b.** plaques perforées. **C.** Face ventrale et podia. **a.** Tables. **b.** Plaques perforées. **c.** Plaques terminales. **D.** Tentacules. **a.** Bâtonnets allongés. **b.** Bâtonnets arqués. **c.** Bâtonnets ramifiés. **E.** Cloaque. Barre d'échelle = 100 μ m.

L'observation microscopique des couches fines du tégument de *P. regalis* traitées au xylène montre que la disposition des tables dans le tégument est la même dans la face dorsale et ventrale. Les tables sont disposées de telle sorte que les disques se situent sous la couche externe du tégument et sont très agencés, parfois imbriqués les uns sur les autres tandis que leurs flèches sont dirigées vers l'extérieur où elles apparaissent comme des points et donnent l'aspect rugueux du tégument au toucher (**Figure 40**).

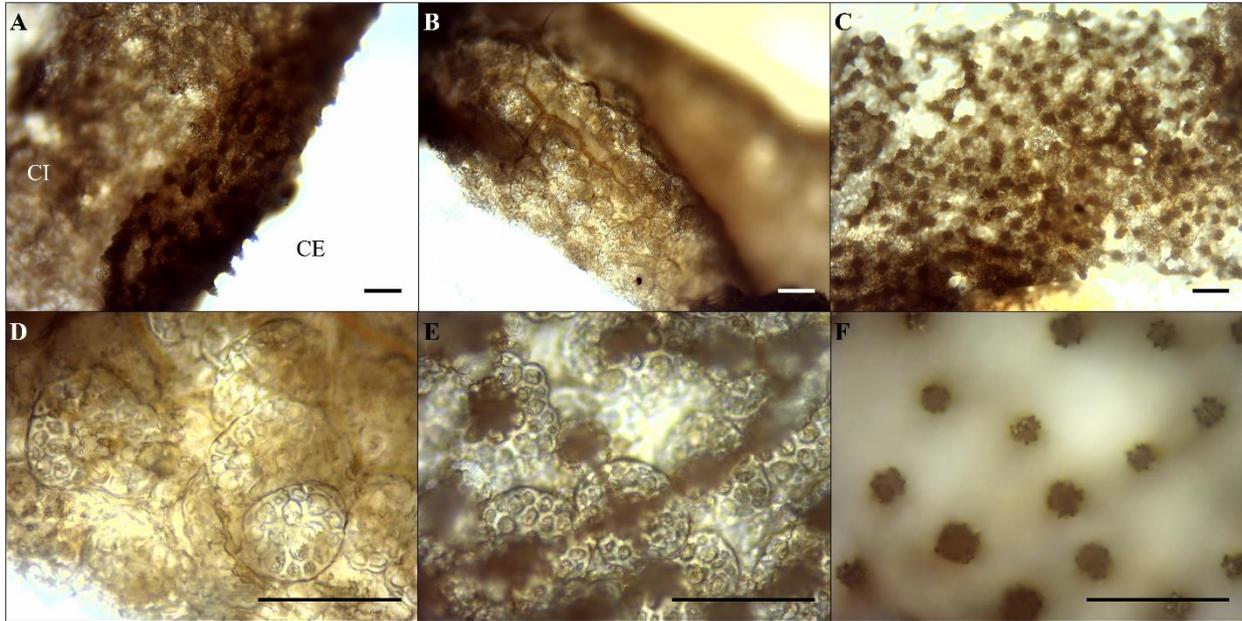


Figure 40: **A.** Vue latérale du tégument de *Parastichopus regalis*. **B.** Tégument de *P. regalis* vu de l'intérieur. **C.** Tégument de *P. regalis* vu de l'extérieur. **D.** Tables vues du côté interne du tégument. **E.** Tables vue du côté externe du tégument. **F.** Une autre mise au point de la photo E montrant les flèches des tables. **CE.** Côté externe ; **CI.** Côté interne. Barre d'échelle = 100 μ m.

1.2. Morphotype tacheté

1.2.1. Etude morphologique

Les six individus de *P. regalis* tacheté ont une longueur entre 14 et 24,90 cm (**Figure 41A et B**), une largeur entre 4 et 7,50 cm et un poids total entre 25,07 et 143,50 g. Chaque individu à l'état vivant présente sur la face dorsale 5 à 7 taches brunâtres à rouge foncé (**Figure 41A1**) qui disparaissent après leur conservation dans l'éthanol.

Les caractères morphologiques sont similaires à ceux décrit pour les individus des morphotypes non tachetés décrits ci-dessus. L'épaisseur du tégument dorsal est entre 1,23 et 6,19 mm et celui de la face ventrale est entre 1,22 et 6,77 mm. La longueur moyenne de la vésicule de Poli est d'environ 17,57 mm et celle du canal de pierre d'environ 10,71 mm. L'anneau calcaire est d'environ 13 mm de diamètre. Les muscles longitudinaux sont plats, attachés à la paroi du corps et d'environ 6,75 mm d'épaisseur (**Tableau 8**).

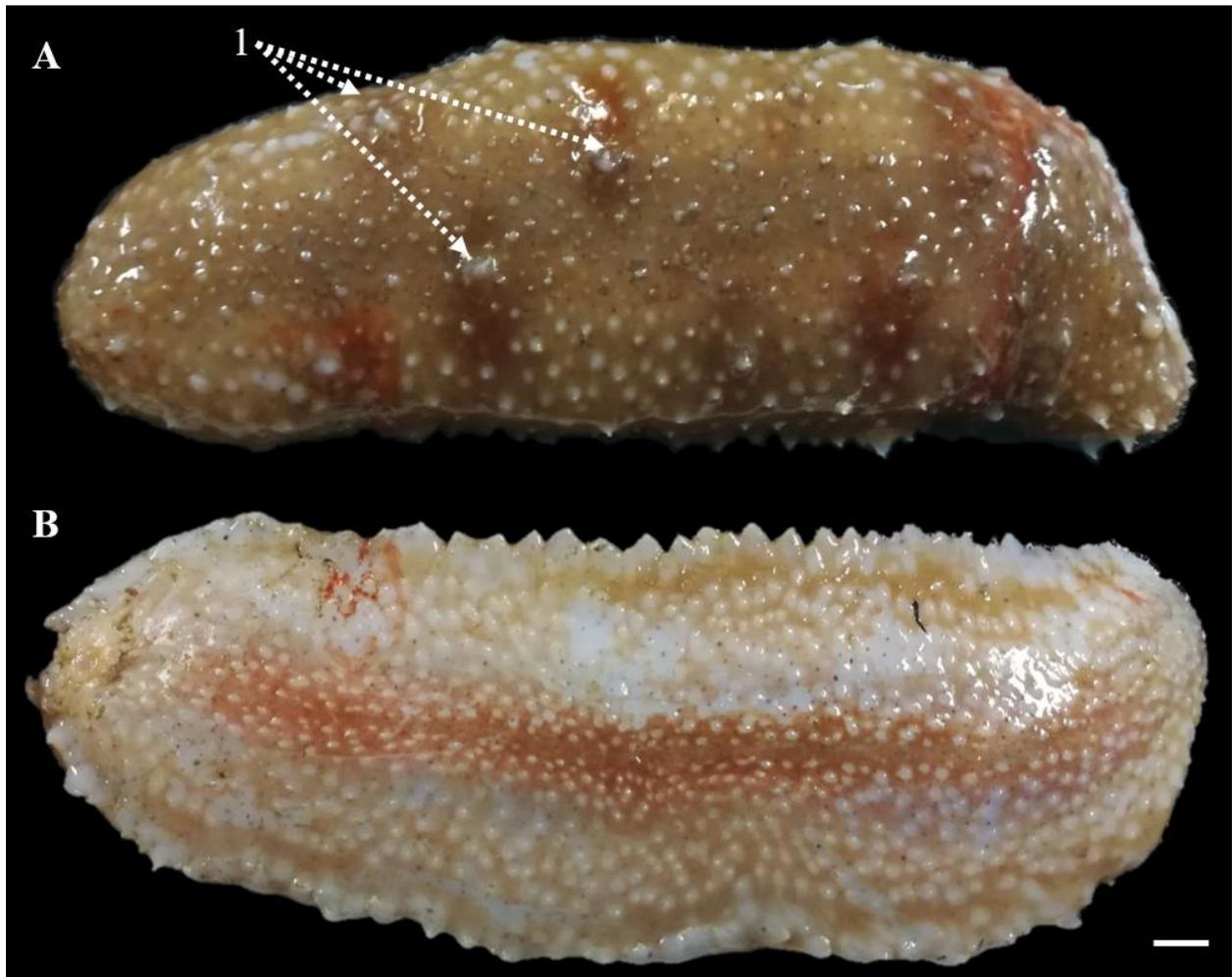


Figure 41: Caractères morphologiques du morphotype tacheté de *Parastichopus regalis*. **A.** Face dorsale, taches indiquées par des flèches (1). **B.** Face ventrale de l'individu tacheté. Barre d'échelle= 1 cm.

1.2.2. Etude endosquelettique

La partie anale (**Figure 42A**), la face dorsale (**Figure 42B**) et la face ventrale (**Figure 42C**) de *P. regalis* tacheté présentent le même type de sclérites que les spécimens non tachetés. Le disque de la table a un diamètre moyen d'environ 97,926 μm et une superficie moyenne de 7099,090 μm^2 . La hauteur des flèches est d'environ 67,521 μm avec 3 à 4 barres transversales. Les papilles et les pédicelles comprennent des plaques perforées d'une longueur moyenne d'environ 265,026 μm (**Figure 42Ab, Bb, Cb**). Le diamètre moyen des plaques terminales entière (**Figure 42Cc**) des papilles et pédicelles est d'environ 439,213 μm et la longueur et la largeur des plaques terminales

ovales sont de 197,766 μm et 84,328 μm respectivement. Le cloaque présente également les tiges à ramifications dichotomiques (**Figure 42D**). Les tentacules présentent des bâtonnets de trois types, allongés (**Figure 42Ea**) arqués (**Figure 42Ec**) et ramifiés (**Figure 42Eb**) ainsi que des tiges à ramifications dichotomiques (**Figure 42Ed**).

L'ensemble des caractères morphologique externe, anatomique et endosquelettique des deux morphotypes observés chez *P. regalis* (tacheté et non tachetés) sont résumés dans un tableau comparatif (**Tableau 8**).

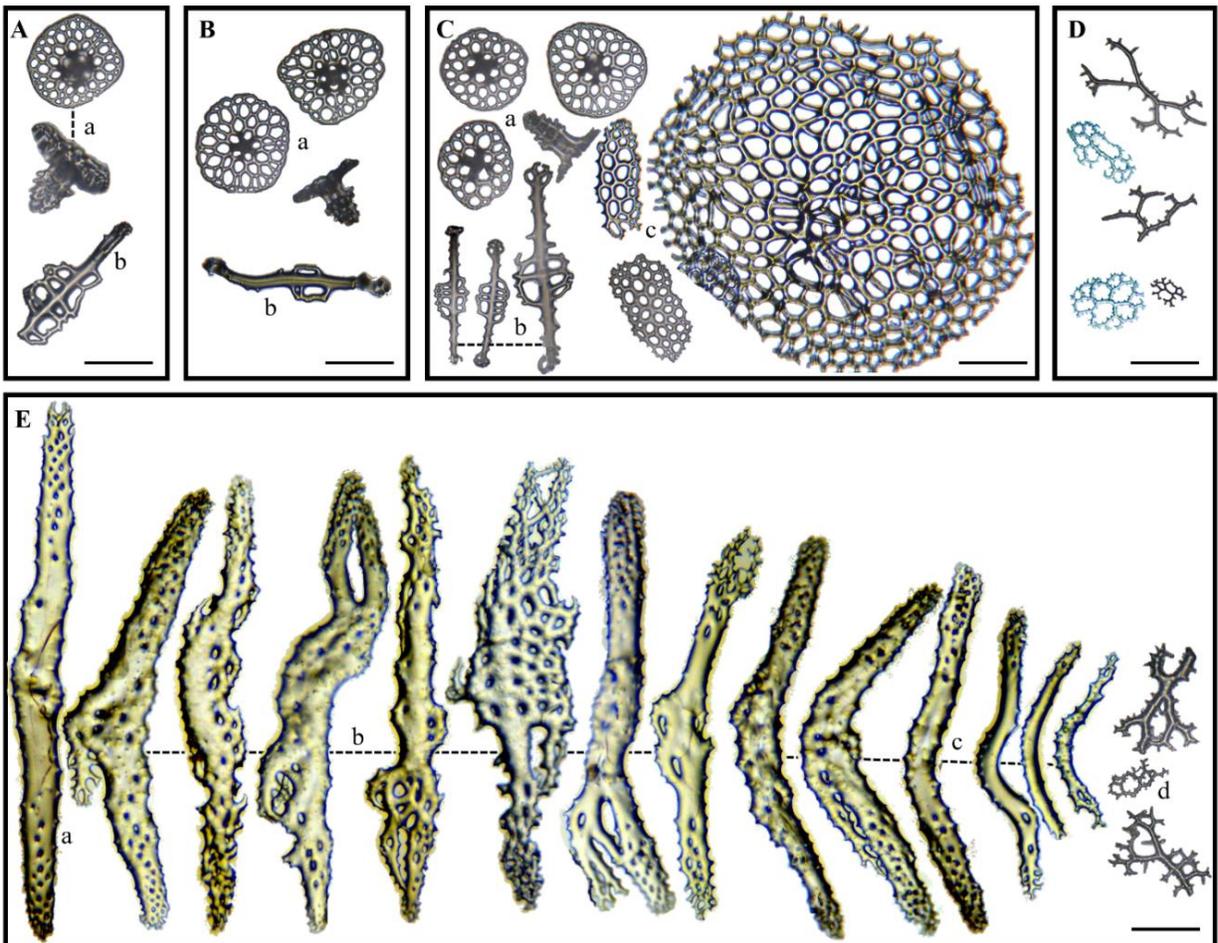


Figure 42: Sclérites des différentes parties du corps du morphotype tacheté de *Parastichopus regalis*. **A.** Région anale. **a.** Tables. **b.** Plaques perforées. **B.** Face dorsale et papilles. **a.** Tables. **b.** Plaques perforées. **C.** Face ventrale et podia. **a.** Tables. **b.** Plaques perforées. **c.** Plaques terminales. **D.** Cloaque. **E.** Tentacules. **a.** Bâtonnets allongés. **b.** Bâtonnets ramifiés. **c.** Bâtonnets arqués. **d.** Tiges à ramifications dichotomiques. Barre d'échelle = 100 μm .

Tableau 8: Caractères morphologiques et anatomiques des deux morphotypes de *Parastichopus regalis* (non tacheté et tacheté).

Morphotype	Non tacheté	Tacheté
Caractères morphologiques		
Forme ventrale du corps		Aplatie
Longueur contractée (cm)	10,50–20,50	14–24,90
Largeur contractée (cm)	3–5,90	4–7,50
Consistance de la paroi du corps		Gélatineuse
Poids total (g)	9,34–71,24	25,07–143,50
Épaisseur de la paroi dorsale du corps (mm)	1,69–4,74	1,23–6,19
Épaisseur de la paroi ventrale du corps (mm)	1–5,01	1,22–6,77
Couleur du trivium	Marron et rouge vif au centre	
Couleur des papilles	Blanche	
Forme du bivium	Arqué	
Couleur du bivium	Brun rougeâtre	Brun rougeâtre avec 5–7 taches foncées
Disposition des pédicelles (bivium)	En rangées plus ou moins régulières	
Position de la bouche	Ventrale	
Position de l'anus	Terminale	
Nombre des tentacules	20	20
Caractères internes (mm)		
Longueur des ampoules tentaculaires	1,10–13	5,94–13
Longueur de la vésicule de Poli	12,54–25,19	12,53–21,69
Longueur du canal de pierre	6,97–13	8,12–12,37
Forme de la madréporite	Sphérique	
Extrémité des muscles longitudinaux	Plat, attaché	
Épaisseur moyenne des muscles longitudinaux	3,39–7,30	4,49–13,79
Diamètre de l'anneau calcaire	8,75–12,28	9,28–17,2
Moyenne des mensurations endosquelettique (µm)		
Diamètre du disque des tables	99,668	97,926
Longueur des plaques perforées des papilles et des pédicelles	222,837	265,026
Longueur des plaques terminales ovales	146,424	197,766
Largeur des plaques terminales ovales	86,15	84,328
Diamètre des plaques terminales entières	209,472	439,218
Longueur des bâtonnets allongées des tentacules	600,41	809,232
Longueur des bâtonnets arqués des tentacules	663,903	459,545
Longueur des bâtonnets branchés des tentacules	788,369	688,71

1.3. Etude morphométrique de l'endosquelette des deux morphotypes

L'analyse statistique comparative du diamètre et de la surface de disque de 120 tables (dix tables de chaque individu) par le test de Kruskal-Wallis a montré des différences significatives entre les individus et ce, pour le diamètre (test de Kruskal-Wallis = 34,724, $p < 0,05$) et pour la surface des disques (test de Kruskal-Wallis = 34,006, $p < 0,05$).

La comparaison multiple des moyennes de diamètre et de surface par le test post hoc de Dunn nous a permis de mettre en évidence ces différences représentées par des lettres dans la **Figure 43**. Concernant le diamètre des disques des tables, le test a montré une différence significative entre les individus 2019.303 NT/ 2019.308NT/ 2019.305T (premier groupe) et les individus 2019.307T/ 2019.3010T/ 2019.311T (deuxième groupe), ces derniers ayant un diamètre de table significativement plus petit que le premier groupe. Quant à la superficie des disques des tables, une différence significative existe entre les mêmes groupes sauf l'individu 2019.311T pour le second. Les autres spécimens n'ont montré aucune différence significative dans le diamètre et la surface des disques des tables.

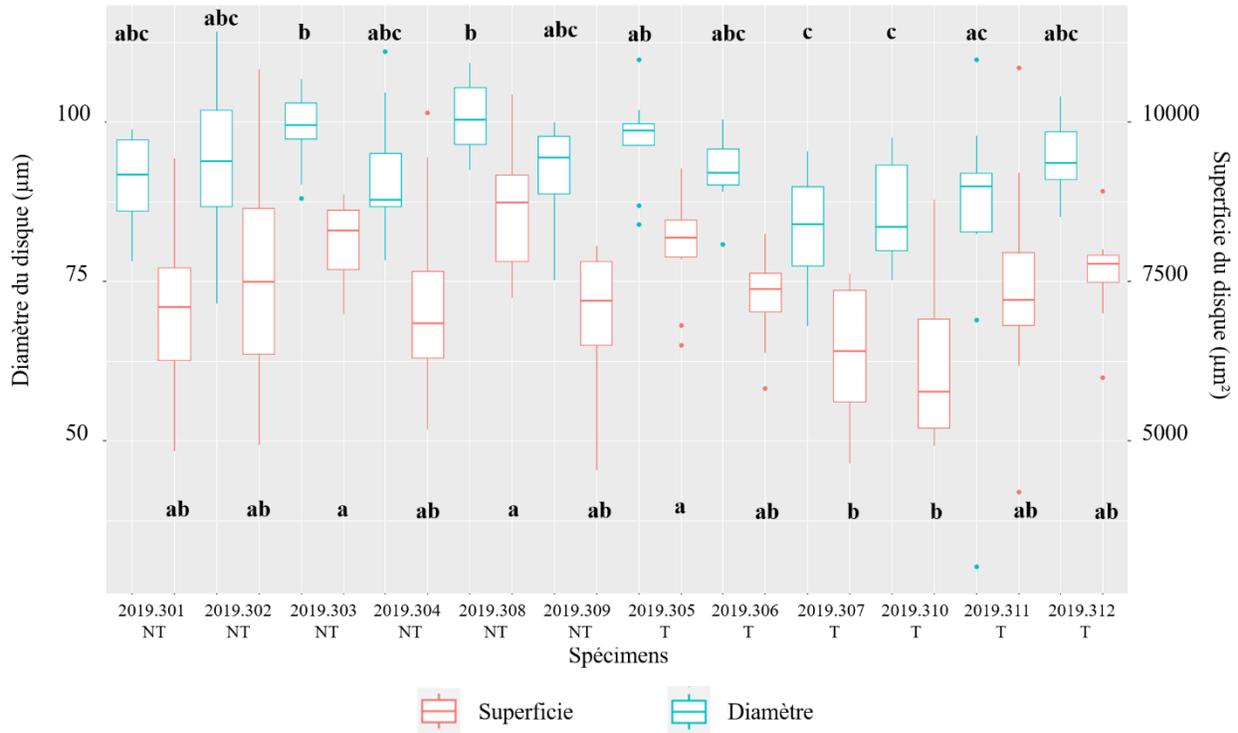


Figure 43: Boîte à moustache montrant la comparaison du diamètre (bleu) et de la surface (rouge) des disques des tables des deux morphotypes de *Parastichopus regalis* (T : Tacheté et NT : Non Tacheté), en utilisant le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn. Des lettres différentes représentent une différence significative ($p < 0,05$) entre les individus, tandis que des lettres égales signifient qu'il n'y a pas de différence significative.

1.4. Discussion

La morphologie externe de *P. regalis* a montré la présence de deux morphotypes à savoir les individus non tachetés et tachetés. Ces derniers ne diffèrent des premiers que par la présence de taches brunes à rouge foncé sur la face dorsale. La comparaison anatomique (y compris l'endosquelette) n'a montré aucune différence entre les deux morphotypes. Tous les deux présentent les mêmes caractères anatomiques à savoir une seule vésicule de Poli, un seul canal de pierre à madréporite sphérique et des muscles longitudinaux fins aux extrémités antérieures où ils s'insèrent sur la partie antérieure des plaques radiales de l'anneau calcaire (**Figure 37F**). L'analyse statistique (**Figure 43**) du diamètre et de la surface des disques des tables n'a montré aucune différence significative entre les individus tachetés et non tachetés, cependant, au sein de chaque groupe, nous

pouvons observer des différences significatives entre certains individus qui ne sont pas liées à la présence ou à l'absence de taches mais peut-être à la taille des spécimens.

L'examen de l'endosquelette a révélé les mêmes types de sclérites dans les deux morphotypes incluant les tables de forme similaire dans la paroi du corps, les plaques perforées de forme similaire dans les papilles et les pédicelles, les plaques terminales de forme et de taille variées dans les podia, les tiges à ramifications dichotomiques dans le cloaque et les bâtonnets de différentes formes dans les tentacules dont certaines avec des branches dichotomiques épineuses. Le **Tableau 8** montre que certaines mensurations des divers caractères morphologiques ou anatomiques (y compris endosquelettiques) (par exemple, la longueur des ampoules des tentacules, la largeur des muscles longitudinaux, le diamètre de l'anneau calcaire, la longueur des plaques de la paroi du corps, le diamètre des plaques terminales entières, la taille des plaques terminales ovales, la longueur de certains bâtonnets des tentacules) sont plus importantes chez les individus tachetés. Nous supposons que ces différences sont dues à leur taille importante ou leur degré de contraction et pas à des différences taxinomiques entre les deux formes.

Les individus de *Parastichopus regalis* tachetés et non tachetés se dégradent très rapidement s'ils ne sont pas immédiatement conservés dans l'éthanol après la collecte. Le derme se désagrège rapidement et la texture du corps devient gélatineuse, s'étalant sur le support sur lequel le spécimen est placé (**Figure 44**). Cette réaction est probablement due au stress lors de l'opération de pêche, à l'exposition à la lumière ou au changement de pression et/ou de température surtout que ces individus ont été pêchés à plus de 36 m de profondeur. Cette dégradation du derme est probablement causée par certaines enzymes autolytiques dans leur corps (**Wang et al., 2020**).



Figure 44: Dégradation du derme de *Parastichopus regalis* après quelques heures de son échantillonnage (individu non immédiatement conservé dans l'éthanol). Barre d'échelle = 1 cm.

Selon **Zhang et al. (2015)**, la couleur du corps peut être liée à des facteurs environnementaux. Il est probable que les taches observées chez certains spécimens de *P. regalis* puissent changer ou disparaître, en fonction de l'intensité lumineuse de leurs habitats ou encore apparaître lorsqu'elles passent à une intensité lumineuse plus faible. De tels changements ont été signalés chez *Holothuria (P.) sanctori* (**Mezali, 2013**). Des études antérieures sur les holothuries ont révélé qu'ils sont actifs la nuit (**Lin et al., 2013**) et présentent une phototaxis négative (**Zhou et al., 1999**). Selon **Liu et al. (2020)**, les organes sensibles à la lumière sont les tentacules, les pieds tubulaires et les papilles qui se contractent par stimulation lumineuse et se rétablissent lorsque la stimulation est supprimée suggérant ainsi que ces organismes possèdent un système photorécepteur. Chez l'holothurie synaptide, *Opheodesoma spectabilis*, il a été démontré que des taches pigmentées à la base des tentacules sont impliquées dans le comportement phototactique (**Berrill, 1966**) et sur le plan histologique, l'ocelle de cette espèce est composé de cellules sensorielles reposant sur de nombreux faisceaux de fibres nerveuses tentaculaires (**Yamamoto et Yoshida, 1978**). Bien que ces structures de type ocelles aient été détectées dans le tissu conjonctif et à la base des tentacules, le mécanisme sous-jacent au système photorécepteur n'a pas été élucidé (**Zhao et al., 2013**). Par conséquent, les réponses phototactiques signalées pour diverses holothuries ne peuvent pas être exclues pour les changements de coloration du corps de *P. regalis* et constitueraient une étude future intéressante.

La couleur du corps est un facteur affectant la sensibilité des holothuries à la lumière, ces animaux habitent progressivement les fonds marins plus profonds avec le développement de la couleur du corps et l'épaississement du derme (**Liu et al., 2020**). En fait, les espèces de couleur claire vivent principalement à des profondeurs peu profondes où l'intensité lumineuse est élevée tandis que les formes de couleur foncée fréquentent les zones d'ombre profonde où il y a peu ou pas de lumière du tout (**Lin, 2011**), ainsi, les individus de couleur claire sont plus résistants à une forte intensité lumineuse (**Lin, 2011**). Une étude menée sur deux morphotypes d'*Apostichopus japonicus* (albinos et normal), a montré que les albinos peuvent tolérer de plus longues périodes d'exposition à une lumière intense (**Lin et al., 2013**). Une des hypothèses qui a été faite pour expliquer ce phénomène suppose que la paroi du corps des individus clairs peut réfléchir plus et absorber moins de lumière qu'une surface du corps de couleur foncée (**Lin et al., 2013**).

Dans le cas de *P. regalis*, nous supposons que les individus tachetés peuvent être retrouvés dans des zones sombres ou ombragées et que les individus non tachetés se trouvent à des profondeurs faibles et donc exposés à plus de lumière et permettent ainsi une meilleure réflexion et une résistance à une forte exposition de cette dernière. Cependant, lors de nos collectes, nous avons observé qu'un seul trait de pêche (même profondeur et même substrat), permettait de collecter des individus des deux morphotypes (tacheté et non tacheté). Cela peut démystifier l'hypothèse ci-dessus mais peut s'expliquer par le fait que cette espèce a tendance à être recouverte de sable, créant ainsi une couverture sur sa face dorsale et provoquant la disparition des taches chez certains individus qui sont enfouis sous le sable, surtout qu'un seul trait de pêche couvre une longue distance qui varie entre 0,926 et 3,704 km augmentant la chance de trouver plusieurs individus qui ne sont pas dans les mêmes conditions.

Pour confirmer nos résultats, il est nécessaire de procéder à des travaux moléculaires et histologiques pour élucider nos conclusions concernant l'absence de différences taxinomiques significatives entre les deux formes rapportées ici et de mener des expériences sur les deux morphotypes en contrôlant l'intensité et le temps d'exposition à la lumière afin de déterminer s'ils se comportent comme nous le supposons concernant les réponses phototactiques.

En général, le schéma de reproduction des holothuries présente un cycle saisonnier (**Smiley et al., 1991**). Les espèces tempérées ont plusieurs pontes par an de courte durée principalement en printemps et en été, tandis que les espèces tropicales ont une seule ponte par an mais durent plus

longtemps (Conand, 1993 ; Hamel *et al.*, 1993 ; Navarro *et al.*, 2012). Au Nord-Ouest de la Méditerranée (Arenys de Mar), *P. regalis* présente un cycle de reproduction annuelle avec une ponte en été (Ramón *et al.*, 2022) qui coïncide avec la période de prélèvement de notre échantillon. L'espèce *P. tremulus* qui est la seule autre espèce du même genre présente une période de ponte différente qui a lieu en hiver dans le Nord européen (Abad *et al.*, 2018).

2. Identification systématique de *Holothuria algeriensis*

Les individus de *H. algeriensis* présentent un corps semi-cylindrique de couleur marron foncé sur la face dorsale (Figure 45A) et marron clair sur la face ventre (Figure 45C). La démarcation de couleur entre les deux faces est très marquée. Les protubérances sur la face dorsale sont très petites voire inexistantes. La bouche et l'anus sont en position ventrale et les tentacules sont au nombre de 20. Les sclérites de la face dorsale et ventrale sont presque les mêmes à savoir les tables avec des extrémités épineuses (Figure 45Ba et Da) et des boutons dont les perforations sont ovales (Figure 45Bb et Db). La face dorsale présente également les plaques perforées larges (Figure 45Bc).

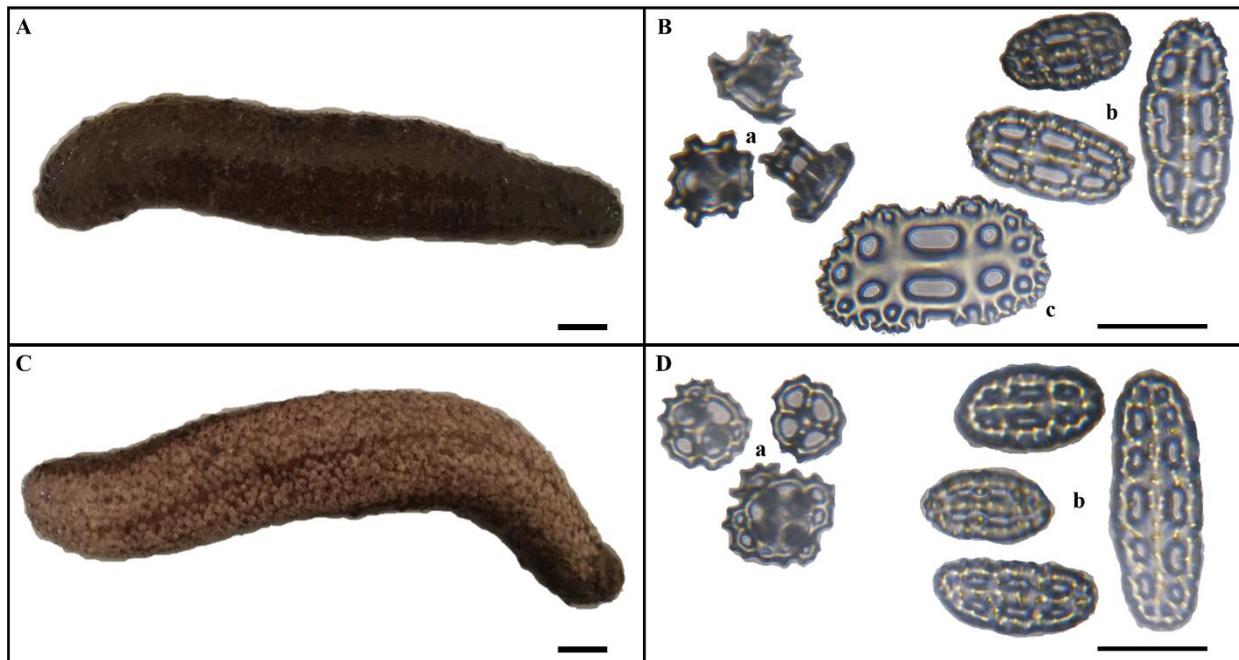


Figure 45: Morphologie externe et endosquelette de *Holothuria algeriensis*. **A.** Face dorsale. **B.** Sclérites de la face dorsale. **C.** Face ventrale. **D.** Sclérites de la face ventrale. **A et C,** Barre d'échelle= 2 cm. **B et D,** Barre d'échelle = 100 µm.

3. Identification systématique de *Holothuria arguinensis*

Les individus de *H. arguinensis* ont un corps marron sur la face dorsale (**Figure 46A**) et marron clair ou beige sur la face ventrale (**Figure 46C**). Les deux faces sont séparées par des protubérances bien apparentes et crochues et vont sur les deux côtés, de l'extrémité antérieure à l'extrémité postérieure. La face dorsale est caractérisée par la présence de deux rangés de papilles. L'anus et la bouche sont en position ventrale et la bouche est entourée de 20 tentacules. Les sclérites des deux faces présentent le même type de sclérites à savoir les tables avec des extrémités épineuses (**Figure 46Ba et Da**), des boutons en forme de « 8 » (**Figure 46Bb et Db**) ainsi que les plaques perforées larges (**Figure 46Bc et Dc**).

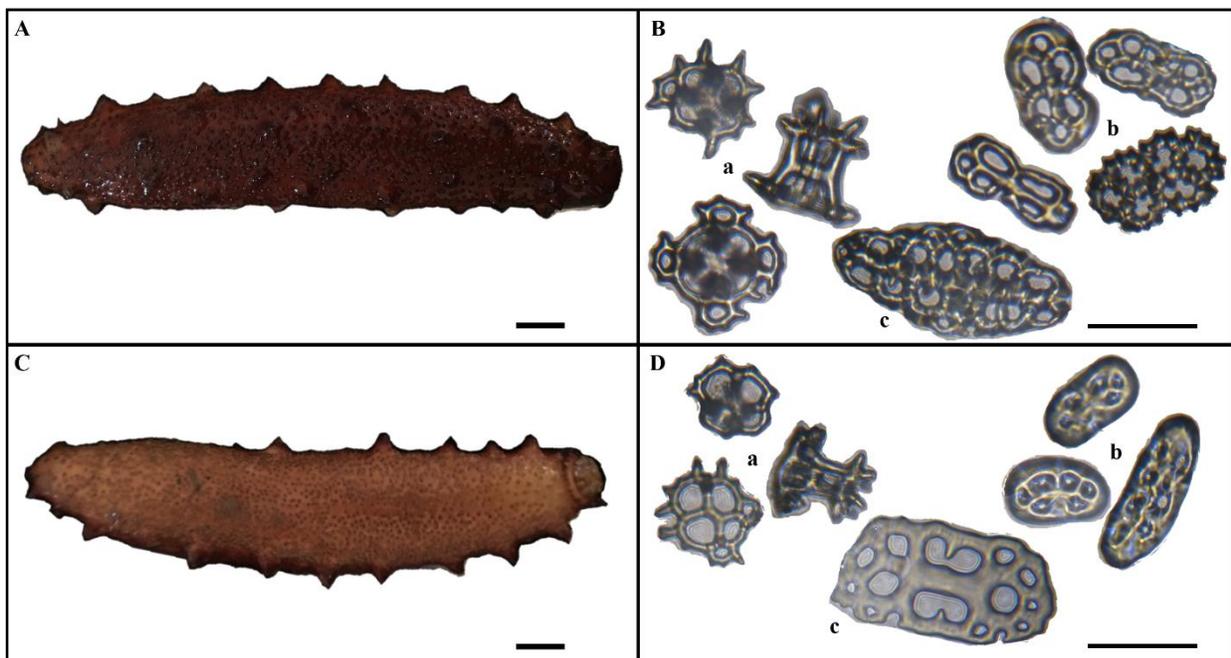


Figure 46: Morphologie externe et endosquelette de *Holothuria arguinensis*. **A.** Face dorsale. **B.** Sclérites de la face dorsale. **C.** Face ventrale. **D.** Sclérites de la face ventrale. **A et C,** Barre d'échelle= 2 cm. **B et D,** Barre d'échelle = 100 µm.

Chapitre III.2 : Biométrie de
Parastichopus regalis

Chapitre III.2 : Biométrie de *Parastichopus regalis*

1. Structure de la population de la côte algérienne

A cause du faible effectif de *H. algeriensis* et *H. arguinensis*, nous n'avons pas pu réaliser une étude de la croissance relative de ces deux espèces et cette partie présente uniquement les résultats de l'espèce *P. regalis* dont l'effectif échantillonné est relativement plus important.

Un total de 104 individus de *Parastichopus regalis* ont été collectés lors de cette étude et ce, à partir de 26 stations le long de la côte algérienne. Deux distributions de fréquences de taille ont été analysées à partir des mesures de la longueur et de la largeur de 95 individus (en raison du manque de mesure de 9 individus) (**Figure 47**). Les individus présentent une longueur moyenne de $14,80 \pm 4,98$ cm avec une classe modale majeure de 11–13 cm et une largeur moyenne de $5,00 \pm 1,25$ cm avec une classe modale de 4,50–5,50 cm. Le poids des individus n'est pas considéré dans cette partie en raison du manque de certaines pesées.

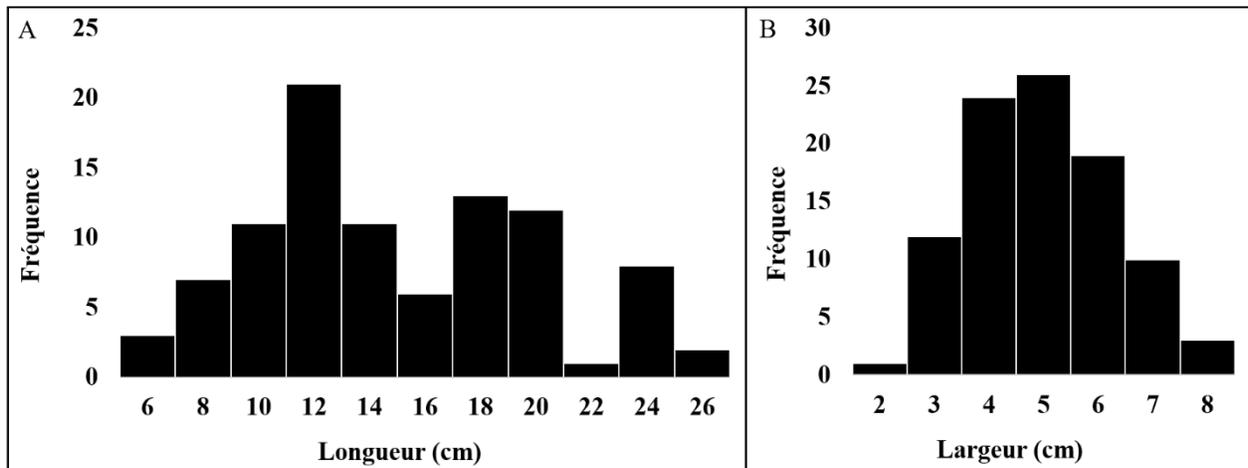


Figure 47: Distribution des fréquences de longueur et de largeur de *Parastichopus regalis* de la côte algérienne (n=95).

Une comparaison de longueur et largeur de *P. regalis* a été réalisée en fonction des secteurs avec le test non paramétrique Kruskal-Wallis étant donné que les données ne suivent pas la loi normale. Les résultats ne montrent pas une différence significative (**Figure 48**) de longueur (test de Kruskal-Wallis = 2,293, $p > 0,05$) ou de largeur (test de Kruskal-Wallis = 3,590, $p > 0,05$) entre le secteur Est, Centre et Ouest.

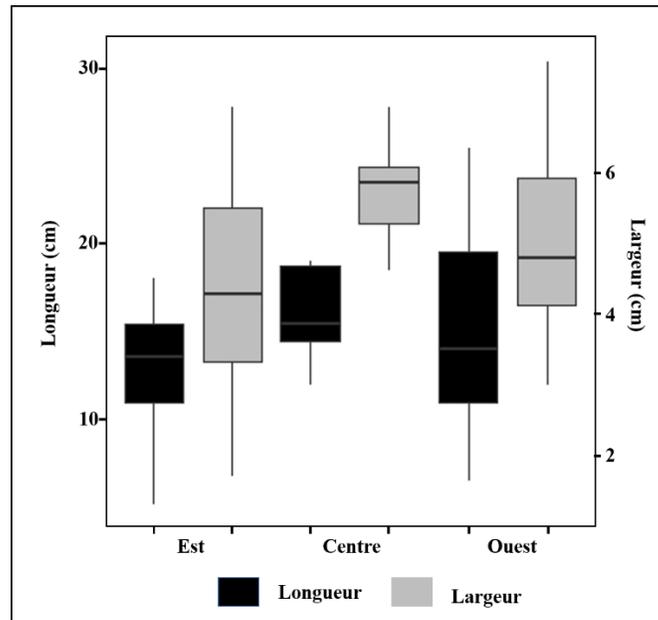


Figure 48: Boîte à moustache des longueurs et largeurs de *Parastichopus regalis* en fonction des secteurs.

2. Structure de la population de la côte Ouest algérienne

Parmi l'ensemble des individus collectés, 72 individus proviennent de la côte Ouest algérienne, néanmoins, en raison du manque de certaines mesures, nous avons éliminé 7 individus. Les individus de cette région ($n= 65$) présentent une longueur moyenne de $15,14 \pm 5,51$ cm et une largeur moyenne de $4,99 \pm 1,22$ cm. Nous avons également pu déterminer le poids et l'épaisseur du tégument des individus de *P. regalis* de cette région qui présentent des valeurs moyennes de $61,55 \pm 38,58$ g et $3,41 \pm 1,55$ mm respectivement. L'échantillon de la côte Ouest algérienne présente des distributions de longueur et de poids multimodales, La classe modale majeure de la longueur est la même que celle de toute la côte algérienne à savoir 11–13 cm et deux classes modales majeures du poids sont observées à 7,50–22,50 g et 37,50–52,50 g (**Figure 49**).

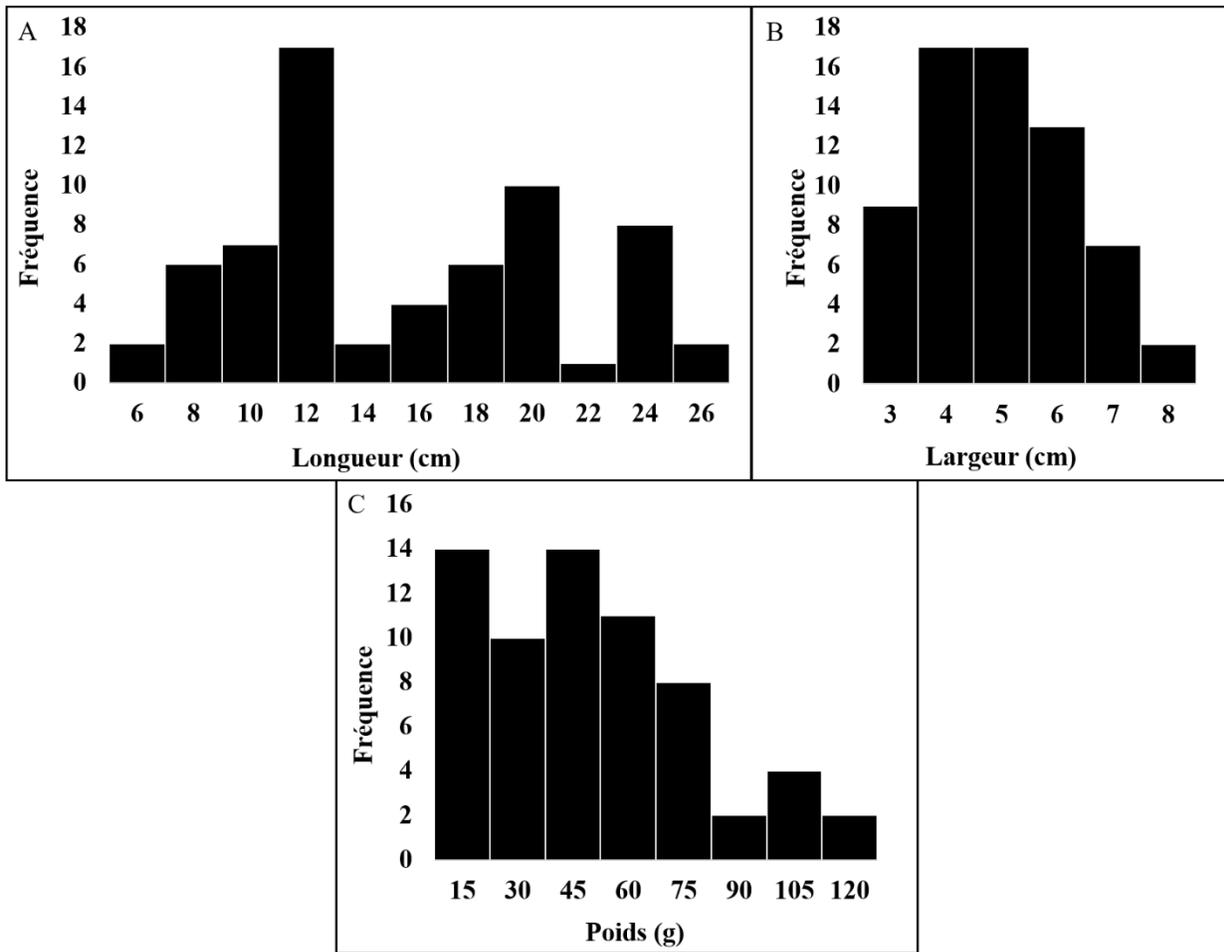


Figure 49: Distribution des fréquences de longueur (A), de largeur (B) et de poids (C) de *Parastichopus regalis* de la côte Ouest algérienne (n=65).

Le **Tableau 9** résume une comparaison des mesures biométriques de *P. regalis* avec d'autres espèces d'holothuries de la même et de différentes familles. Les valeurs moyennes de longueur et de poids obtenues dans cette étude sont inférieures à celles obtenues par **Ramón et al. (2010)** pour la même espèce sur la côte espagnole, cette différence est probablement due à la méthode de mesure de longueur considérée qui est la longueur contractée dans le cas de notre étude et la longueur décontractée dans le cas de l'étude de **Ramón et al. (2010)**. Comparée à quelques espèces de la famille des Stichopodidae provenant d'autres régions reportées dans la bibliographie (Mexique, Équateur, Philippines), *P. regalis* de la région Ouest algérienne présente la plus faible valeur de longueur et de poids (lorsqu'il est mentionné) (**Jesús-Navarrete et al., 2018 ; Poot-Salazar et al., 2014 ; Pañola-Madrigal et al., 2017 ; Ramírez-González et al., 2020 ; Dolorosa, 2015**).

Ces valeurs de longueur et de poids de *P. regalis* sont également inférieurs à celles obtenues par **Mecheta et Mezali (2019)** pour les autres espèces du genre *Holothuria* provenant de la région de Mostaganem à savoir *Holothuria arguinensis* ($26,10 \pm 5,52$ cm, $244,80 \pm 61,26$ g), *H. poli* ($14,40 \pm 2,31$ cm, $90,22 \pm 16,07$ g) et *H. tubulosa* ($18,73 \pm 3,98$ cm, $112,64 \pm 45,57$ g). Par rapport aux espèces de la région Centre algérienne, *P. regalis* a également une longueur inférieure à celle de *H. tubulosa* ainsi que *H. sanctori*, néanmoins, elle est supérieure à celle de *H. poli* ($9,10 \pm 4,31$ cm) (**Mezali, 1998**). Quant à l'épaisseur du tégument, *P. regalis* est plus épaisse que *H. poli* et *H. sanctori* et moins épaisse que *H. arguinensis* et *H. tubulosa* (**Mecheta et Mezali, 2019**).

Tableau 9: Mesures biométriques de *Parastichopus regalis* comparées à celles des autres espèces d'holothuries. L : Longueur, l : Largeur, E : Épaisseur du tégument, P : Poids total.

Espèce	L (cm)	l (cm)	E (mm)	P (g)	Région	Références
<i>Parastichopus regalis</i>	15,14 ± 5,51	4,99 ± 1,22	3,41 ± 1,55	61,55 ± 38,58	Ouest algérienne	Présente étude
	19,30 ± 4,30			177,20 ± 73,20	Espagne	Ramón et al. (2010)
	22,61 ± 0,43	-		-	Mexique	Jesús-Navarrete et al. (2018)
<i>Isostichopus badiionotus</i>	25,30 ± 5,20				Mexique	Poot-Salazar et al. (2014)
	21,40 ± 6,00			375,60 ± 249	Mexique	Pañola-Madrigal et al. (2017)
<i>Isostichopus fusus</i>	20,30 ± 5,00				Équateur	Ramírez-González et al. (2020)
	24,10				Philippines	Dolorosa (2015)
<i>Stichopus chloronotus</i>					Philippines	Dolorosa (2015)
<i>Thelenota ananas</i>	53,20				Philippines	Dolorosa (2015)
<i>Thelenota anax</i>	60,00				Philippines	Dolorosa (2015)
<i>Holothuria arguinensis</i>	26,10 ± 5,52	-	4,53 ± 1,03	244,80 ± 61,26	Mostaganem	Mecheta et Mezali (2019)
	14,40 ± 2,31	-	3,44 ± 0,56	90,22 ± 16,07	Mostaganem	Mecheta et Mezali (2019)
<i>Holothuria poli</i>	9,10 ± 4,31				Centre algérienne	Mezali (1998)
	18,73 ± 3,99		5,96 ± 1,26	112,64 ± 45,57	Mostaganem	Mecheta et Mezali (2019)
<i>Holothuria tubulosa</i>	12,02 ± 3,85				Centre algérienne	Mezali (1998)
	11,56 ± 2,79				Centre algérienne	Mezali (1998)
<i>Holothuria sanctori</i>	22,50 ± 3,89		2,69 ± 1,96	76,90 ± 18,37	Centre algérienne	Mezali et al. (2014)
	10,80 ± 2,89				Centre algérienne	Mezali (1998)
<i>Holothuria forskali</i>					Centre algérienne	Mezali (1998)

3. Croissance relative

3.1. Relation biométrique

La relation biométrique (**Tableau 10 ; Figure 50A**) entre la longueur et la largeur présente une pente largement supérieure à 1 ($p < 0,05$) ce qui indique une allométrie majorante. Ainsi, la longueur croît quatre fois plus rapidement que la largeur.

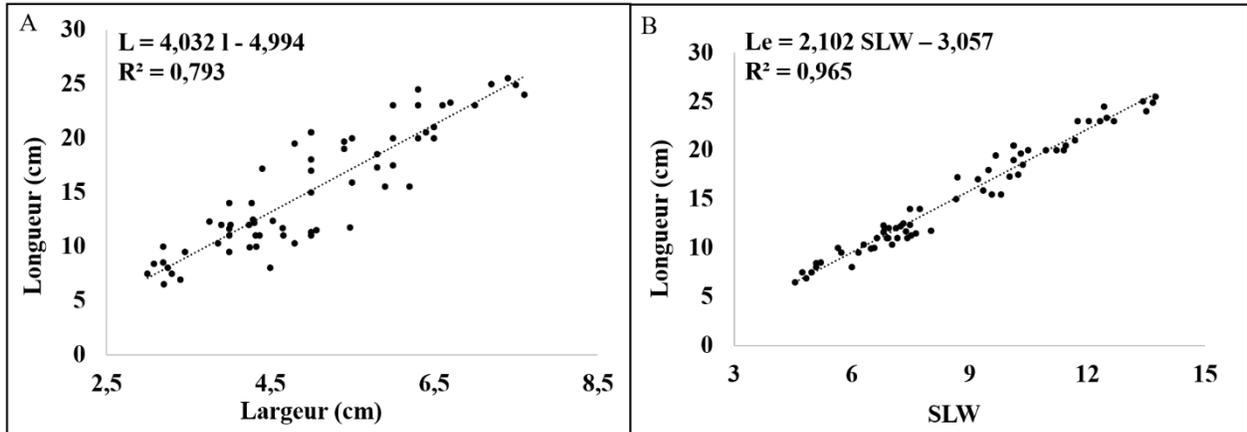


Figure 50: A. Relation biométrique longueur-largeur de *Parastichopus regalis*. B. Relation biométrique longueur- SLW de *P. regalis*.

Tableau 10: Paramètres des relations biométriques et des relations taille-poids de *Parastichopus regalis*.

Relation	Modèle	a	b	R ²	test t	p	Type d'allométrie
L-l	$L=bl+a$	-4,994	4,032	0,79	11,686	2,03E-17	Allométrie majorante
L-SLW	$L=bSLW+a$	-3,057	2,102	0,97	21,950	3,26E-31	Allométrie majorante
L-W	$W=aL^b$	0,429	1,784	0,746	-9,433	1,16E-13	Allométrie minorante
Le-W	$W=aLe^b$	0,371	1,836	0,806	-9,467	1,02E-13	Allométrie minorante

3.2. Relation taille-poids

L'équation de régression entre L et SLW utilisée pour générer la longueur estimée à partir des longueurs et largeurs mesurées est : $Le = 2,102 SLW - 3,057$ ($R^2 = 0,97$, $p < 0,05$) (**Tableau 10 ; Figure 50B**).

Les valeurs de « b » obtenues sont de 1,784 et 1,836 pour la relation longueur-poids et longueur estimée-poids respectivement. Dans les deux cas, les valeurs sont significativement différentes de 3 ($p < 0,05$) indiquant une allométrie minorante, c'est-à-dire que la longueur du corps croît plus rapidement que leur poids. L'utilisation de la longueur estimée étant dérivée de deux mesures (longueur et largeur) plutôt que d'une mesure (longueur) a amélioré le coefficient de corrélation et a augmenté le « b », néanmoins, ce dernier reste toujours inférieur à 3 indiquant ainsi une allométrie minorante (**Tableau 10 ; Figure 51**). Ces résultats sont proches des résultats obtenus pour la même espèce dans les côtes espagnoles (**Ramón *et al.*, 2010**).

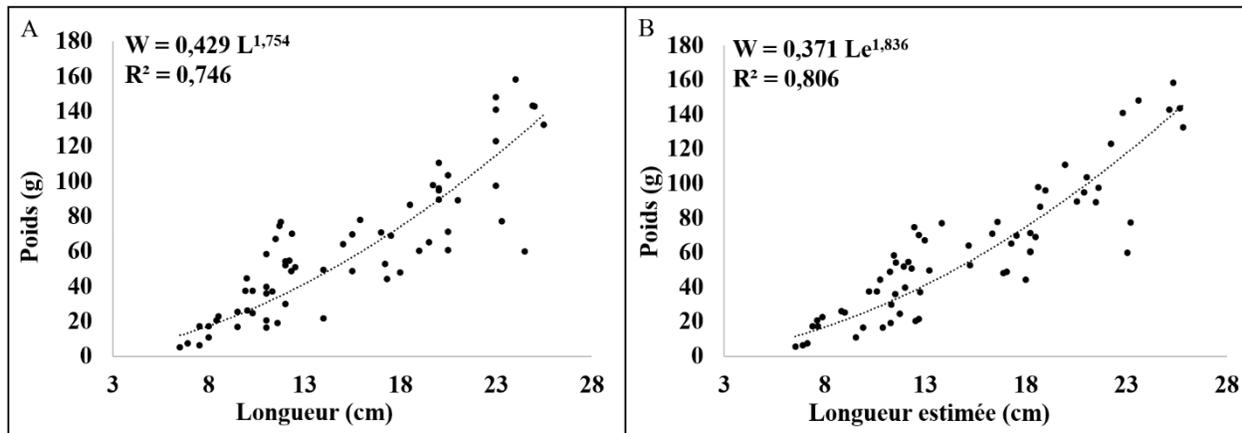


Figure 51: **A.** Relation longueur-poids de *Parastichopus regalis*. **B.** Relation longueur estimée-poids de *Parastichopus regalis*.

L'allométrie minorante est couramment observée chez les espèces des holothuries de la même famille que *P. regalis* (**Aumeeruddy et Conand, 2008 ; Herrero-Pérezrul et Reyes-Bonilla, 2008 ; Ramón *et al.*, 2010 ; Jesús-Navarrete *et al.*, 2018 ; Veronika *et al.*, 2018**) ou appartenant à d'autres familles (**Mezali, 2008 ; Aydın, 2020 ; Mezali *et al.*, 2022**) et ce, dans différentes régions du monde (**Tableau 11**).

Tableau 11: Paramètres de la relation taille-poids de *Parastichopus regalis* comparés à ceux des autres espèces d'holothuries.

Espèce	Modèle	a	b	R ²	Région	Référence
<i>Parastichopus regalis</i>	W=aL ^b	0,429	1,784	0,746	Ouest algérienne	Présente étude
	W=aLe ^b	0,371	1,836	0,806	Ouest algérienne	Présente étude
	We=aL ^b	0,002440	2,112	0,83	Espagne	Ramón et al. (2010)
<i>Stichopus naso</i>	W=aL ^b	0,012	1,021	0,575	Sri Lanka	Veronika et al. (2018)
<i>Thelenota ananas</i>	W=aL ^b	0,2247	2,1784	0,888	Sychelles	Aumeeruddy et Conand (2008)
<i>Isostichopus fucus</i>	W=aL ^b	1,1421	1,8321	0,7141	Mexique	Herrero-Pérezrul et Reyes-Bonilla (2008)
<i>Isostichopus badionotus</i>	W=aL ^b	2,8112	1,7411	0,7228	Mexique	Jesús-Navarrete et al. (2018)
<i>Holothuria tubulosa</i>	W=aL ^b	0,0013	2,1665		Sidi-Fredj	Mezali (2008)
	W=aL ^b	0,0020	2,0353		Tamentefoust	Mezali (2008)
	We=aLe ^b	0,779	1,702	0,833	Turquie	Aydın (2020)
<i>Holothuria poli</i>	W=aL ^b	0,0005	2,4035		Sidi-Fredj	Mezali (2008)
	W=aL ^b	0,0013	2,1674		Tamentefoust	Mezali (2008)
	We=aLe ^b	0,682	1,804	0,712	Turquie	Aydın (2020)
	We=aL ^b	0,0075	1,5856	0,8601	Oran	Mezali et al. (2022)
<i>Holothuria mammata</i>	We=aLe ^b	0,717	1,752	0,890	Turquie	Aydın (2020)
<i>Holothuria sanctori</i>	We=aLe ^b	4,029	1,104	0,752	Turquie	Aydın (2020)

Chapitre III.3 : Endosymbiote de
Parastichopus regalis

Chapitre III.3. Endosymbiote de *Parastichopus regalis*

1. Description morphologique de l'endosymbiote

Le poisson *Carapus acus* endosymbiote de *P. regalis* présente un corps allongé, mince, sans écaille et en forme d'anguille (**Figure 53**). Il possède de longues nageoires dorsale et anale qui se rejoignent au bout de la queue. A l'état vivant, le corps est translucide et rougeâtre avec environ 14 à 15 points irisés argentés situés sur les flancs (**Figure 53C**). Le museau est rond avec une large ouverture de la bouche.

Suite à des observations sous la loupe binoculaire, les dents de la mâchoire des *Carapus acus* (maxillaires et mandibules) (**Figure 52A et B**) apparaissent petites et organisées en plusieurs rangées, ceux qui sont situées à la partie antérieure sont légèrement courbées tandis que ceux de la région postérieure sont droits. Les dents vomériennes sont un peu plus longues que les dents de la mâchoire (**Figure 52C**).



Figure 52: Dentitions de *Carapus acus*. **A.** Dents des maxillaires. **B.** Dents des mandibules. **C.** Dents vomériennes.

2. Observations de l'endosymbiote à l'intérieur de son hôte

Lors de l'injection de l'éthanol dans la cavité cœlomique des individus de *P. regalis* pour leur conservation, deux ont été conservés avec le poisson à l'intérieur. La dissection a révélé que le premier individu de *P. regalis* ne contenait qu'un seul poisson (**Figure 53A**) tandis que le second en contenait deux (**Figure 53B**). L'individu observé seul est orienté tête vers la cavité buccale de

l'holothurie, tandis que les deux autres observés ensemble sont en sens inverse. La présence de plusieurs individus de poissons dans un même hôte a déjà été observée chez cette espèce par **González-Wangüemert *et al.* (2014a)** et d'autres espèces du genre *Encheliophis*. Dans la plupart des cas, il n'y a qu'un seul poisson par hôte. Cependant, des spécimens d'*Encheliophis* (*E. gracilis*, *E. vermicularis* et *E. sagamianus*) et de *Carapus* (*C. homei*, *C. mourlani* et *C. bermudensis*) auraient été appariés sexuellement chez divers holothuries (**Aronson et Mosher, 1951 ; Trott et Trott, 1972 ; Meyer-Rochow, 1977 ; Murdy et Cowan, 1980 ; Smith *et al.*, 1981 ; Trott, 1981**). Ainsi, il se pourrait que ces individus soient de sexe opposé et se sont hébergés dans le même hôte pour se reproduire surtout que ce sont des adultes et la période d'échantillonnage coïncide avec la période de reproduction de cette espèce qui est entre Juillet et Septembre (**Arnold, 1956**). Cette hypothèse peut être confirmée par une détermination des sexes par une observation microscopique ou une étude histologique des gonades, cependant, cela n'a pas pu être réalisé dans notre cas étant donné que la cavité abdominale des deux individus était détériorée (**Figure 53D**).

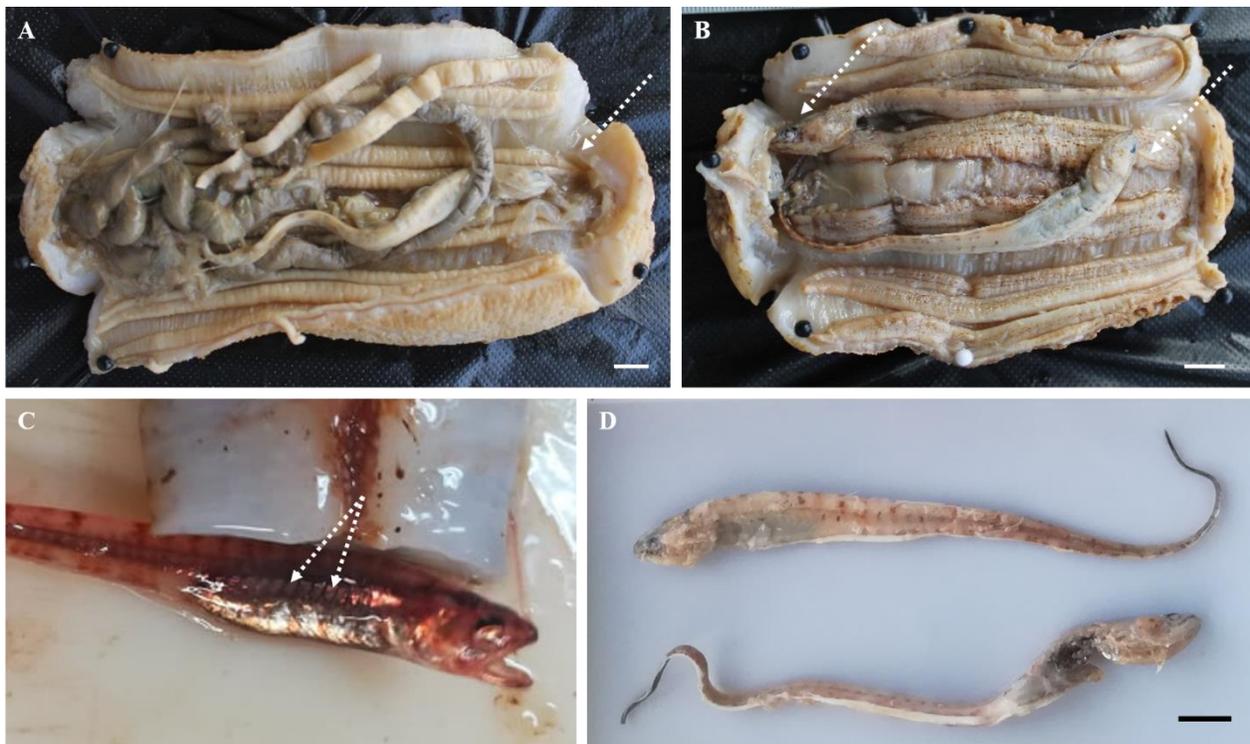


Figure 53: **A.** *Parastichopus regalis* hébergeant un *Carapus acus* (flèche). **B.** *Parastichopus regalis* hébergeant deux *C. acus* (flèches). **C.** Point irisées argentés de *C. acus* à l'état vivant. **D.** Les deux individus de *C. acus* retrouvée ensemble dans le même *P. regalis*. Barre d'échelle = 1 cm.

Dans cette étude, le poisson retrouvé seul mesure 12,3 cm dans un hôte de 20 cm de longueur et 118 g de poids, tandis que les deux trouvés ensemble mesurent 14,20 et 14,40 cm dans un hôte de 25 cm et 143 g. Selon **González-Wangüemert et al. (2014a)**, la corrélation entre la taille du poisson et le poids de l'hôte n'est pas significative et le poisson ne choisit pas son hôte en fonction de sa taille.

Selon **Trott (1981)**, les poissons-perles peuvent trouver des hôtes à la fois par des signaux visuels et chimiques et peuvent différencier les holothuries hôtes et non-hôtes uniquement par des signaux chimiques. Une étude réalisée par **Miyazaki et al. (2014)** au Japon a révélé que l'espèce de poisson *Encheliophis vermicularis* est attiré par les principales saponines produites par l'holothurie *Holothuria leucospilota* (seule espèce avec laquelle le poisson a été observé) à savoir l'Holothurin A et B. Bien que les saponines soient cytotoxiques (**Kalinin et al., 2008**), les poissons possèdent une résistance à ces toxines qui est due à leur capacité à produire six à dix fois plus de mucus que les autres poissons agissant comme une barrière mécanique (**Parmentier et Vandewalle, 2005 ; Brasseur et al., 2016**).

Le comportement de pénétration chez les hôtes holothuries a été étroitement observé et décrit chez les espèces des genres *Carapus* et *Encheliophis*. Un poisson essayant d'entrer dans une holothurie nage la tête vers le bas et explore les objets. Une fois qu'un hôte est trouvé, le poisson nage le long du tégument de l'holothurie et repère l'extrémité postérieure par le courant d'eau exhalé des arbres respiratoires (**Arnold, 1957 ; Trott, 1970 ; Kloss et Pfeiffer, 2000**). Deux stratégies ont été observées ; soit le poisson pénètre l'hôte la tête la première en se propulsant par de violents coups de queue ; soit place sa tête à l'entrée de l'anus de l'hôte et ramène sa fine extrémité caudale vers l'avant, le long du corps du poisson. Cette position permet au poisson d'utiliser son corps comme guide pour amener rapidement l'extrémité de sa nageoire vers le cloaque et le pénétrer lorsque l'hôte sort d'un courant respiratoire exhalant. Une fois l'extrémité caudale du poisson à l'intérieur de l'holothurie, le Carapidae se redresse et pénètre dans l'hôte avec des mouvements de recul. Cette deuxième stratégie est plus fréquemment observée (**Arnold, 1953 ; Trott, 1970**). Une fois à l'intérieur de l'hôte, les poissons Carapidae se logent dans l'arbre respiratoire (**Parmentier et Vandewalle, 2005**). Les espèces de poissons du genre *Carapus* quittent leur hôte pour des proies telles que les petits crustacés et les annélides pendant la nuit,

tandis que les individus de l'espèce *E. gracilis* se nourrissent des tissus internes de leur hôte (Smith, 1964).

3. Mensurations morphométriques de l'endosymbiote

Le **Tableau 12** résume les mensurations des sept spécimens de *C. acus*. Le poids humide varie de 0,47 à 4,11 g et la longueur totale de 9 à 16,60 cm. Ces résultats sont proches de ceux observés par **Enajjar et Bradai (2016)** sur la côte tunisienne et **El Aamri et Tamsouri (2018)** sur la côte marocaine.

Tableau 12: Gamme des mensurations morphométriques des individus de *Carapus acus* comparées à celles des côtes tunisiennes et marocaines

	Tunisie Enajjar et Bradai (2016)	Maroc El Aamri et Tamsouri (2018)	Algérie Présente étude
Nombre d'individu	01	10	07
Poids Humide (PH) (g)	-	-	0,47–4,11
Longueur totale (LT) (cm)	13,61	14,50–21,00	9,00–16,60
Hauteur du corps (HC) (cm)	0,54	1,20–1,90	0,59–1,50
Longueur de la tête (LT) (cm)	1,61	1,30–1,60	1,10–2,20
Diamètre de l'œil (DO) (cm)	0,34	0,30–0,50	0,20–0,40
Longueur pré-orbitale (LPo) (cm)	0,33	0,30–0,50	0,20–0,40
Longueur pré-pectorale (LPp) (cm)	1,77	1,70–2,40	1,00–2,25
Longueur pré-pectorale (LPp) (cm)	2,16	2,90–4,20	1,50–3,80
Longueur pré-anale (LPa) (cm)	1,91	1,50–2,60	1,00–3,20

D'après la représentation schématique des schémas de croissance des différents stades de vie de *Carapus acus* proposé par **Arnold (1956)** (**Figure 54**) qui prend en considération les longueurs du corps et de la tête en millimètres, les sept individus étudiés sont tous au stade adulte.

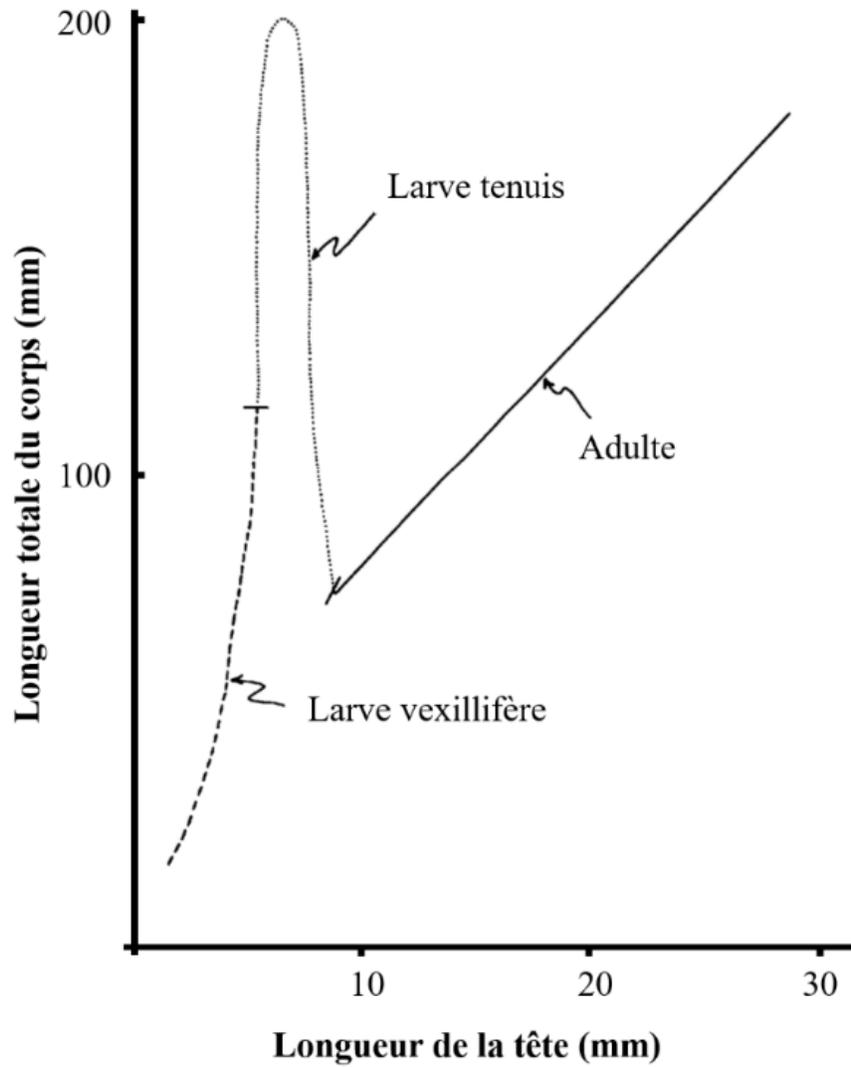


Figure 54: Représentation schématique des schémas de croissance de *Carapus acus* proposé par Arnold (1956).

Chapitre III.4 : Etude biochimique des espèces étudiées

Chapitre III.4 : Etude biochimique des espèces d'holothuries étudiées

1. Composition approximative du tégument de *Parastichopus regalis*

Le taux d'humidité (**Tableau 13**) dans le tégument de *P. regalis* est de $90,98 \pm 0,71$ %, cette valeur est légèrement inférieure à celle observée chez la même espèce en Espagne (**Roggatz et al., 2018**). En fait, au sein de la même espèce, des fluctuations du taux d'humidité peuvent être observées en fonction de la période d'échantillonnage et cela a été déjà observée chez l'espèce *Isostichopus sp.* où le taux d'humidité varie mais pas significativement de 3 % entre les mois de Janvier et Juillet (**Vergara et Rodríguez, 2016**). Cette variation mensuelle a également été observée chez l'espèce *Holothuria scabra* (**Özer et al., 2004**).

Selon **Chang-Lee et al. (1989)**, la teneur en eau des holothuries est comprise entre 82,0 et 92,6 % et elle est élevée par rapport à celle des poissons et des mollusques, cependant, des valeurs supérieures ou inférieures ont été observées chez certaines espèces. C'est le cas de *Holothuria tubulosa*, *H. poli* et *Stichopus variegatus*, avec des taux d'humidité de $81,09 \pm 1,97$ %, $93,53 \pm 1,95$ % et $93,36 \pm 0,02$ %, respectivement (**Mecheta et Mezali, 2019 ; Ridhowati et al., 2018**). La valeur observée chez l'espèce étudiée reste dans la fourchette des taux rapportés dans la littérature.

Le taux de lipides (**Tableau 13**) obtenu à partir de *P. regalis* est de $1,40 \pm 0,57$ %. Deux études ont abordé le taux de lipides dans le tégument de *P. regalis*. Le taux obtenu chez les individus du Portugal est plus élevé ($3,63 \pm 0,11$ %) (**Santos et al., 2015**) que celui obtenu en Espagne par **Roggatz et al. (2018)** qui est de 1,27 % et celui obtenu dans la présente étude. La composition chimique des organismes marins en général peut être influencée par plusieurs facteurs tels que les caractéristiques physiologiques, l'habitat, le cycle de vie et les conditions environnementales, ainsi que des facteurs biologiques tels que l'alimentation et le cycle de reproduction (**Taboada et al., 2003 ; Diniz et al., 2012**). Chez les holothuries, les compositions organiques et non organiques varient généralement selon les espèces, la saison, l'habitat et probablement le stade de l'ontogenèse (**Khotimchenko, 2015**). Ainsi, la différence entre les taux

de lipides observés au sein d'une même espèce peut s'expliquer par plusieurs facteurs mais surtout par la température et la disponibilité des ressources alimentaires (Tabaoda *et al.*, 2003 ; Neto *et al.*, 2006). En effet, les trois valeurs obtenues correspondent à des échantillons de différentes régions échantillonnés à différentes saisons, avec le taux de lipides le plus élevé observé en Septembre 2012 (Santos *et al.*, 2015) et le plus bas entre l'automne et l'hiver 2011 (Roggatz *et al.*, 2018). La valeur intermédiaire a été obtenue dans notre étude à l'été 2020.

La valeur des taux de lipides de *P. regalis* est plus ou moins proche de celle de *Stichopus hermanni*, *Isostichopus badionotus* et *Thelenota ananas* ($0,80 \pm 0,02$ %, $0,78 \pm 0,56$ % et $1,9 \pm 0,01$ %, respectivement) (Wen *et al.*, 2010 ; Sánchez-Solís *et al.*, 2021) et inférieures à celles des espèces du genre *Holothuria* (Mecheta *et al.*, 2020).

Tableau 13: Composition approximative du tégument de *Parastichopus regalis* comparée à celle des autres espèces d'holothuries.

Espèce	Taux d'humidité (%)	Taux de lipide (%)	Taux de cendre (%)	Taux de sucre totaux (%)	Références
<i>Parastichopus regalis</i>	$90,98 \pm 0,71$	$1,40 \pm 0,57$	$40,45 \pm 0,54$	$0,15 \pm 0,01$	Présente étude
	-	$3,63 \pm 0,11$	-	-	Santos <i>et al.</i> (2015)
	91,40	1,27	36,80	-	Roggatz <i>et al.</i> (2018)
<i>Stichopus hermanni</i>	-	$0,80 \pm 0,02$	$37,90 \pm 0,33$	-	Wen <i>et al.</i> (2010)
<i>Stichopus variegatus</i>	$93,36 \pm 0,02$	$3,39 \pm 0,33$	$1,50 \pm 0,63$	-	Ridhowati <i>et al.</i> (2018)
<i>Apostichopus japonicus</i>	$91,70 \pm 1,34$	$0,22 \pm 0,08$	$2,49 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,04$	Jiang <i>et al.</i> (2011)
<i>Apostichopus californicus</i>	88,80	0,3	2,60	0,2	Chang-Lee <i>et al.</i> (1989)
<i>Apostichopus parvimensis</i>	90,80	0,3	3,40	0,3	Chang-Lee <i>et al.</i> (1989)
<i>Isostichopus badionotus</i>	-	$0,78 \pm 0,56$	$38,9 \pm 0,32$	-	Sánchez-Solís <i>et al.</i> (2021)
<i>Thelenota ananas</i>	-	$1,90 \pm 0,01$	$25,10 \pm 0,30$	-	Wen <i>et al.</i> (2010)
<i>Holothuria scabra</i>	87,12	-	6,82	-	Özer <i>et al.</i> (2004)
<i>Holothuria arguinensis</i>	$88,13 \pm 4,16$	$2,57 \pm 0,28$	$47,31 \pm 0,08$	-	Mecheta et Mezali (2019) ; Mecheta <i>et al.</i> (2020)
<i>Holothuria poli</i>	$93,53 \pm 1,95$	$5,53 \pm 0,59$	$41,78 \pm 1,82$	-	Mecheta et Mezali (2019) ; Mecheta <i>et al.</i> (2020)
<i>Holothuria tubulosa</i>	$81,09 \pm 1,97$	$3,81 \pm 0,25$	$40,77 \pm 0,60$	-	Mecheta et Mezali (2019) ; Mecheta <i>et al.</i> (2020)
<i>Holothuria sanctori</i>	-	$3,07 \pm 0,50$	$31,58 \pm 0,10$	-	Mecheta <i>et al.</i> (2020)

Le taux de cendres (**Tableau 13**) dans le tégument de *P. regalis* est de $40,45 \pm 0,54$ %. Ce taux est légèrement supérieur à celui obtenu par **Roggatz et al. (2018)** pour la même espèce en Espagne (36,80 %) ainsi que ceux de *Stichopus herrmanni* et *Thelenota ananas* avec des teneurs de $37,9 \pm 0,33$ % et $25,10 \pm 0,30$ %, respectivement (**Wen et al., 2010**). D'autres espèces de la même famille présentent des valeurs largement plus faibles que celles observées chez ces dernières telles que *Stichopus variegatus*, *Apostichopus californicus*, *A. japonicus* et *A. parvimensis* (**Chang-Lee et al., 1989 ; Jiang et al., 2011 ; Ridhowati et al., 2018**). Comparée aux espèces du genre *Holothuria* de la côte Ouest algérienne, seule *H. arguinensis* présente un taux de cendres plus élevé que celui de l'espèce étudiée ($47,31 \pm 0,08$ %), *H. tubulosa* et *H. poli* ont toutes deux des taux presque similaires ($40,77 \pm 0,60$ % et $41,78 \pm 1,82$ %, respectivement) et *H. sanctori* a des valeurs plus faibles (**Mecheta et al., 2020**).

Les résultats taux de cendres sont à prendre avec précaution car le taux de sclérites peut influencer cette valeur, en fait, selon **Sales et al. (2021)**, la forte teneur en cendres des holothuries est probablement due à la présence de ces sclérites composés principalement de carbonate de calcium dans la paroi du corps. La valeur obtenue pourrait considérablement diminuer si la peau externe n'est pas prise en considération et que l'analyse s'effectuera uniquement sur la chair. Selon **Oedjoe (2017)**, la teneur en cendres du tégument de quelques holothuries qui était de 31,43 % et 48,30 % en incluant la chair, diminuait jusqu'à 2,42 % quand cette dernière n'est pas considérée.

La teneur des sucres totaux du tégument de *P. regalis* est de $0,15 \pm 0,01$ %, des valeurs proches de cette dernière ont été observées chez *Apostichopus japonicus*, *Apostichopus californicus* et *A. parvimensis* (**Chang-Lee et al., 1989 ; Jiang et al., 2011**).

La teneur en protéines n'a pas été abordé dans ce travail, cependant, selon **Roggatz et al. (2018)**, le tégument de *Parastichopus regalis* présente 14,7 % de protéine avec 19 acides aminées, les plus importants étant l'acide glutamique, l'arginine et la tyrosine.

En général, les holothuries sont riches en protéines, pauvres en lipides et contiennent plusieurs minéraux et vitamines (**Çakli et al., 2004 ; Mecheta et al., 2020**). Cette composition est influencée par l'emplacement géographique de ces organismes, leur nutrition, la saison de capture, la procédure de manipulation de ces organismes après leur récolte et la méthode par laquelle ils sont transformés en « bêche-de-mer » (**Chang-Lee et al., 1989 ; Özer et al., 2004 ; Aydın et al., 2011 ; Bordbar et al., 2011**). En effet, selon **González-Wangüemert et al. (2018b)**, la variation

de la composition chimique des holothuries en raison de la diversité de source d'alimentation pourrait s'expliquer par le fait que ces organismes sont au bas de la chaîne alimentaire et contribuent au recyclage des détritiques consommant ainsi des bactéries et des diatomées mélangées aux sédiments des fonds marins (Purcell *et al.*, 2010 ; Purcell *et al.*, 2016) et ces derniers peuvent différer considérablement d'un site à un autre étant généralement associées au type de composés organiques trouvés dans ces sédiments.

2. Digestibilité du tégument de *Parastichopus regalis* par la pepsine

Une évaluation de la qualité d'une source de protéines est généralement basée sur sa composition en acides aminés et sa digestibilité dans le tube digestif (Santé-Lhoutellier *et al.*, 2017). La digestibilité *in vitro* par la pepsine du tégument de *P. regalis* est de $46,96 \pm 3,08$ %. Elle est la même que celle observée chez le poisson (Wen *et al.*, 2010) et proche de celle du poulet et du bœuf (44,67 % et 42,75 % respectivement) (Tableau 14). Par rapport aux autres espèces d'holothuries de la côte Ouest algérienne, le tégument de *P. regalis* est plus digéré par la pepsine que celui de *H. poli* ou de *H. tubulosa* ($34,68 \pm 8,66$ % et $25,96 \pm 2,04$ % respectivement) (Mecheta et Mezali, 2019). Malgré le fait que *P. regalis* a une faible teneur en protéines [14,7 % selon Roggatz *et al.* (2018)] par rapport à *H. arguinensis* [66,41 % selon (Mecheta *et al.*, 2020)], leurs téguments sont presque également digérés par la pepsine. Cette digestion peut ne pas être liée au taux de protéines mais plutôt à leur composition. En effet, le clivage de la pepsine est plus influencé par le résidu d'acide aminé à une certaine position, et lorsque les acides aminés Histidine, Lysine, Arginine ou Proline sont dans cette position, ils interdisent ce clivage (Hamuro *et al.*, 2008). Ces acides aminés étant faibles chez ces espèces (représentent environ 19,6 % à 26,4 % des protéines de *H. arguinensis*, *H. tubulosa*, *H. poli* et *P. regalis*) pourraient faciliter la digestion des protéines par la pepsine d'où ces valeurs observées (Roggatz *et al.*, 2015 ; González-Wangüemert *et al.*, 2018b ; Roggatz *et al.*, 2018).

Tableau 14: Digestibilité du tégument de *Parastichopus regalis* par la pepsine comparée aux autres espèces d'holothuries et aux viandes couramment consommées.

Espèce	Digestibilité (%)	Références
<i>Parastichopus regalis</i>	46,96 ± 3,08	Présente étude
<i>Holothuria arguinensis</i>	53,56 ± 3,41	Mecheta et Mezali (2019)
<i>Holothuria poli</i>	34,68 ± 8,66	Mecheta et Mezali (2019)
<i>Holothuria tubulosa</i>	25,96 ± 2,04	Mecheta et Mezali (2019)
Porc	47,22	Wen et al. (2015)
Poisson	46,98	Wen et al. (2015)
Poulet	44,67	Wen et al. (2015)
Viande	42,75	Wen et al. (2015)

3. Caractérisation des saponines des trois espèces d'holothuries étudiées

Les extraits de saponines des trois espèces d'holothuries étudiées à savoir *Holothuria algeriensis*, *H. arguinensis* et *Parastichopus regalis* ont été analysés selon le protocole basé sur la spectrométrie de masse décrit et qui combine l'analyse MALDI-MS, MALDI-HRMS, LC-MS et LC-MS/MS (Decroo *et al.*, 2017 ; Colson *et al.*, 2020 ; Savarino *et al.*, 2022). Ces techniques ont été utilisées de manière complémentaire et sont considérées comme des outils pertinents pour détecter ces molécules dans des mélanges complexes. La première étape MALDI-QToF-MS permet une description globale du mélange de saponines en termes de composition élémentaire suite à des mesures de masse exactes (MALDI-HRMS) sans pour autant déterminer l'éventuelle présence des isomères et leur caractérisation structurale. La deuxième étape qui implique une analyse LC-MS a pour objectif de séparer les saponines en fonction de leur temps de rétention (tr) permettant ainsi la discrimination des isomères pour une même m/z . la dernière étape à savoir la caractérisation structurale des ions saponine se fait par une LC-MS/MS dans laquelle les ions sont fragmentés pour produire des ions fragments nécessaires à la reconstitution de la structure des ions parents.

L'identification des saponines a été ensuite réalisée en comparant nos résultats aux saponines des autres espèces de la même famille décrites par Van Dyck *et al.* (2009), Van Dyck *et al.* (2010b), Caulier *et al.* (2013), Caulier-Mezali *et al.* (2016), Bahrami (2015) et Puspitasari *et al.* (2022). Les travaux de ces derniers représentent une revue regroupant l'ensemble des analyses de saponines réalisées sur les espèces du genre *Holothuria*.

3.1. Caractérisation des saponines de *Holothuria algeriensis* et *Holothuria arguinensis*

3.1.1. Profil générale des saponines dans les extraits analysés

Le poids sec moyen des individus analysés de *H. algeriensis* est de $11,81 \pm 5,40$ g. Le poids sec moyen de l'extrait de saponine qui a été mesuré après l'extraction est de $21,47 \pm 8,90$ mg. La concentration de saponine a été ensuite calculée comme étant le rapport du poids sec de l'extrait de saponine aux poids secs des individus et elle a une valeur moyenne de $2,29 \pm 1,80$ g/ kg. Cette valeur n'a pas été calculé pour l'espèce *H. arguinensis* en raison du manque de pesées.

La technique de la spectrométrie de masse MALDI a été utilisée pour une détection directe et un établissement du profil des saponines de trois (03) individus de *H. algeriensis* et cinq (05) individus de *H. arguinensis*. Cette technique est « douce » car le spectre montre des ions intacts et à charge unique pour les molécules d'analyte (Bahrami *et al.*, 2014), cependant dans certains cas, elle provoque une fragmentation minimale des analytes (Cai et Liu, 2013) induisant de faux pics. Les analyses par cette technique ont été réalisées en mode ion positif et en raison de la forte affinité des glycosides triterpéniques pour les ions de métaux alcalins (Fang *et al.*, 1998), tous les ions saponines détectés sont coordonnés au sodium et correspondent à des ions $[M+Na]^+$.

Les spectres MALDI-MS des trois individus étudiés de *H. algeriensis* sont illustrés à la **Figure 53**. Les graphiques représentent les différents ions reçus par le détecteur selon leur rapport masse sur charge en abscisse et l'intensité relative de chacun de ces ions en ordonnée, ainsi, la hauteur de chaque pic correspond à son intensité relative. Sur la base des rapports m/z , nous détectons 11 signaux dans la gamme m/z 850–1550 qui correspondent potentiellement à des saponines ionisées. Les autres pics visibles dans les spectres correspondent aux ions produits des saponines générés par la perte d'eau, de dioxyde de carbone ou de la fonction sulfate (dans le cas des saponines sulfatés) lors de l'ionisation MALDI. Les intensités relatives des pics observés sont différentes suggérant que les saponines sont présentes à des proportions différentes dans les tissus. Les trois répliques montrent des profils similaires de spectres MALDI-MS et des ions saponines détectés aux mêmes m/z . Cependant, les intensités relatives entre les trois spectres sont légèrement différentes. Dans les trois cas, les pics correspondant à la m/z 1243 sont les plus intenses. Il est à noter que certains pics sont associés à deux ou à trois pour former deux groupes (notés dans le spectre en rouge) dont les signaux sont séparés par des différences de masse de 16 Da. Le premier groupe est constitué des ions m/z 1479, 1463 et 1447 et le second des ions m/z 1243 et 1227.

Les compositions élémentaires des ions saponines ont été d'abord confirmées sur la base d'une mesure de masse exacte (MALDI-HRMS (+)). Cette technique révèle que les ions détectés possèdent des compositions élémentaires de saponines sulfatées à 2 sucres (m/z 905), non-sulfatées à 4 sucres (m/z 1111), sulfatées à 4 sucres (m/z 1225–1243), non-sulfatées à 5 sucres (m/z 1287) et non sulfaté à 6 sucres (m/z 1447–1479). Au total, sur les 11 saponines détectées, quatre sont sulfatées (**Tableau 15**).

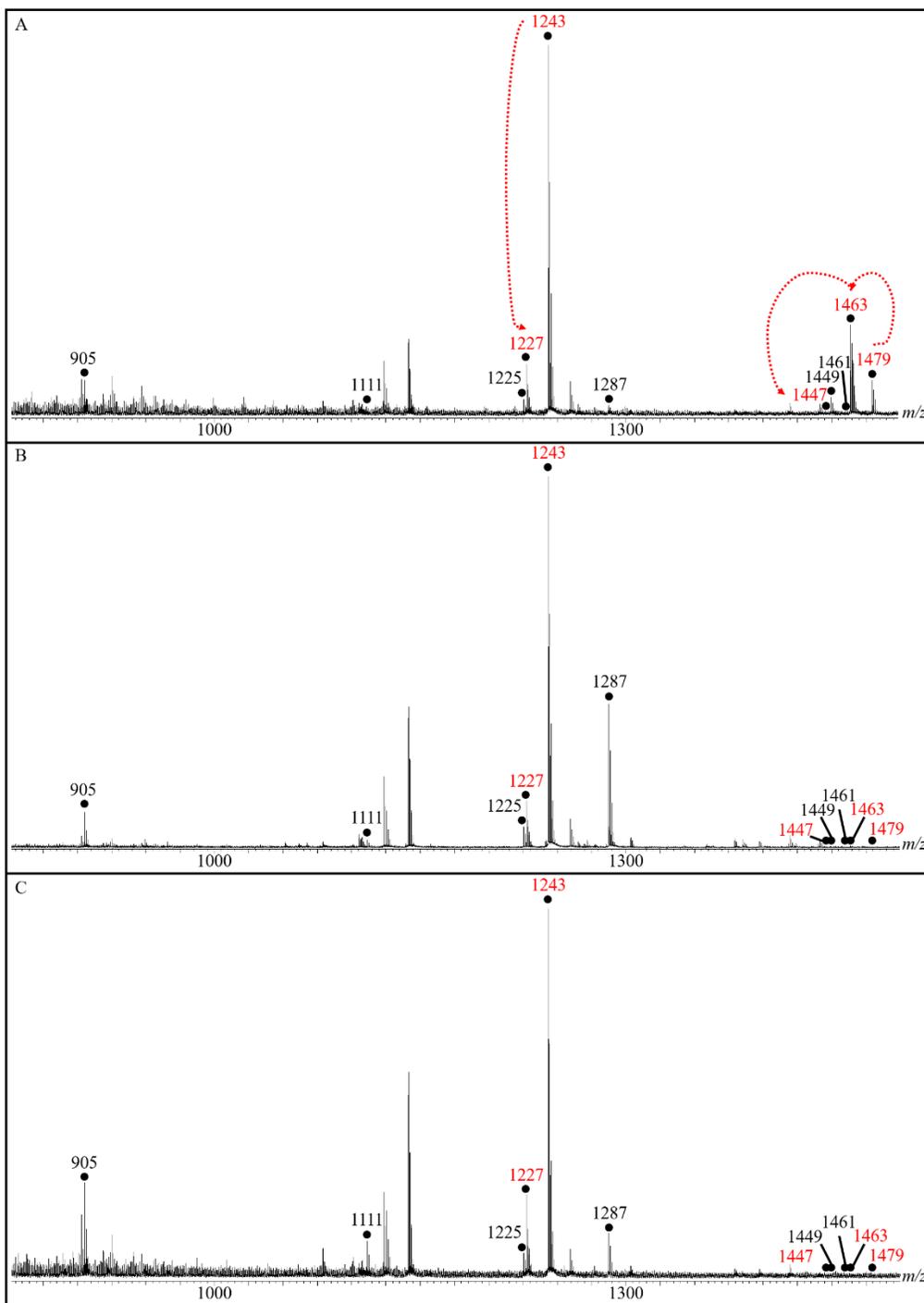


Figure 55: Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de trois individus de *Holothuria algeriensis*. **A.** Individu 1. **B.** Individu 2. **C.** Individu 3. Les signaux des saponines sont mis en évidence par des points noirs sur lesquelles sont notées les m/z $[M+Na]^+$. Les m/z écrites en rouge correspondent aux groupes 1 et 2 dont la différence entre leurs représentants est de 16 Da. La hauteur des pics correspond à leur intensité relative.

Sur les cinq extraits de saponines de *H. arguinensis* analysés, uniquement deux ont montré un spectre MALDI-MS avec des pics correspondant aux saponines. La **Figure 56** représente les spectres MALDI-MS des deux individus. Au total, 18 signaux dans la gamme m/z 850–1550 qui correspondent potentiellement à des saponines ont été observés. Les deux répliques présentent des profils similaires de spectres MALDI-MS avec des intensités relatives des pics différentes au sein ou entre les individus. Les pics les plus intenses sont différents chez les deux individus, ils correspondent aux m/z 905 et m/z 1125 chez le premier et le second respectivement. Certains pics sont associés à deux ou à trois pour former trois groupes (notés dans le spectre en rouge) dont les signaux sont séparés par des différences de masse de 16 Da. Le premier groupe est constitué des ions m/z 1243 et 1227, le deuxième des m/z 1157, 1141 et 1125 et le troisième des m/z 905 et 889.

La MALDI-HRMS (+) indique que les ions détectés possèdent des compositions élémentaires de saponines sulfatées à 2 sucres (m/z 889–905), non sulfatées à 3 sucres (m/z 951–995), non-sulfatées à 4 sucres (m/z 1125–1171), sulfatés à 4 sucres (m/z 1209–1261), non-sulfatés à 5 sucres (m/z 1317), sulfatés à 5 sucres (m/z 1355), et non sulfaté à 6 sucres (m/z 1463–1509). Au total, sur les 18 saponines identifiées, huit sont sulfatées (**Tableau 16**).

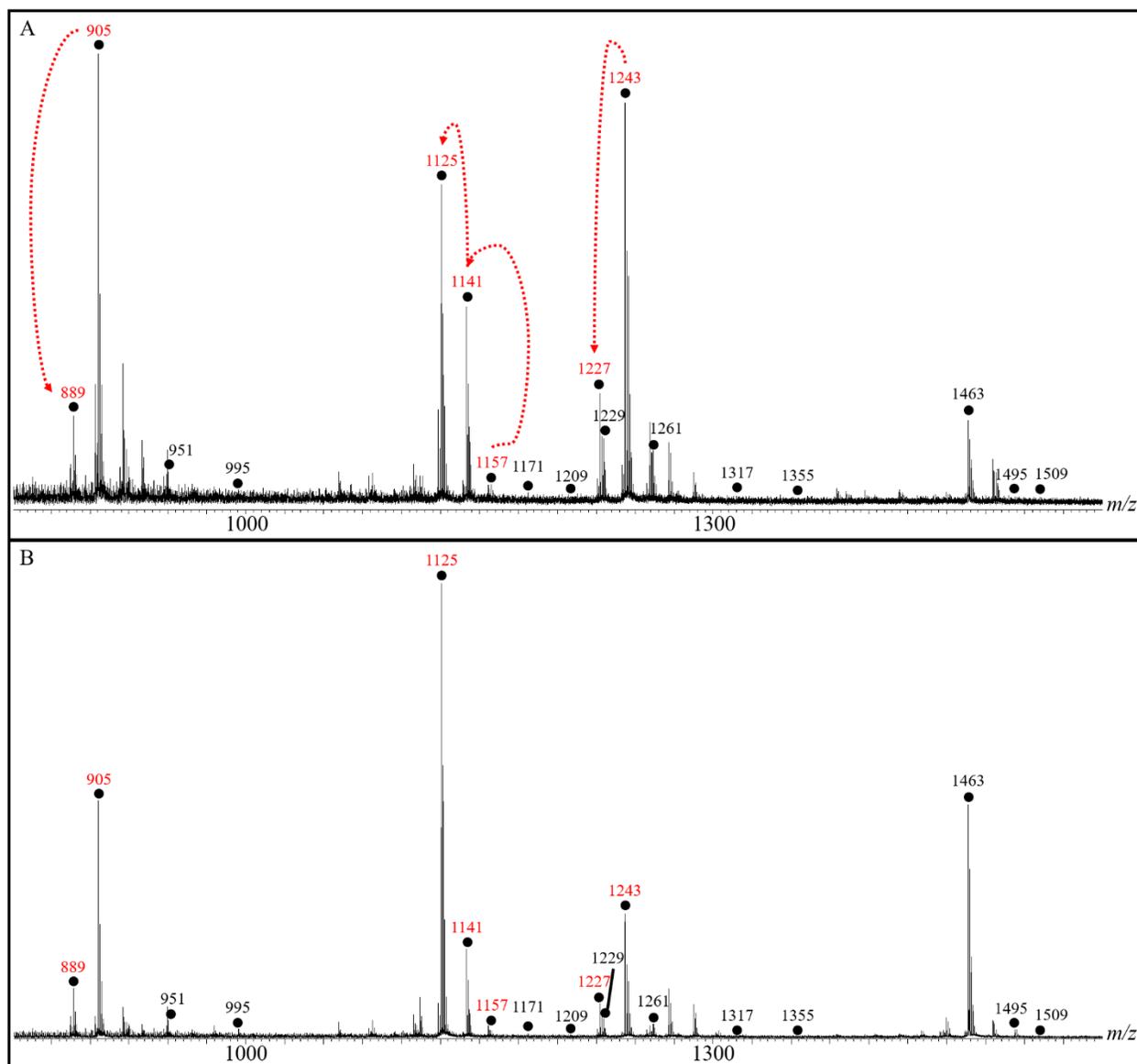


Figure 56: Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de deux individus de *Holothuria arguinensis*. **A.** Individu 1. **B.** Individu 2. Les signaux des saponines sont mis en évidence par des points noirs sur lesquelles sont notées les m/z $[M+Na]^+$. Les m/z écrites en rouge correspondent aux groupes 1, 2 et 3.

3.1.2. Détection des isomères des saponines identifiées par LC-MS

Les données MALDI ont dû être complétées par une analyse LC-MS, et ce dans le but d'évaluer la présence de saponines isomères et de procéder par la suite à une LC-MS/MS. Il convient de noter

que les ions dans les spectres LC-MS et LC-MS/MS apparaissent sous forme $[M+H]^+$, ainsi, pour passer de la forme $[M+Na]^+$, il faut soustraire une molécule de sodium (23) et ajouter un proton (1) pour les molécules non-sulfatées (ex. m/z 1447 $[M+Na]^+$ apparaît au pic m/z 1425 $[M+H]^+$), quant aux molécules sulfatées, il faudrait soustraire deux molécules de sodium (46), une molécule d'eau (18) pour ensuite ajouter deux protons (2) (ex m/z 1243 $[M+Na]^+$ apparaît au pic m/z 1181 $[M+H]^+$).

En ce qui concerne l'espèce *Holothuria algeriensis*, l'analyse LC-MS a révélé la présence d'entre deux et cinq isomères pour chaque composition élémentaire. Le chromatogramme courant total d'ions (TIC) présenté dans la **Figure 57** correspond à celui de l'ion m/z 1425 $[M+H]^+$ (m/z 1447 $[M+Na]^+$) de l'individu 1. Etant donné qu'il existe deux signaux à 7,1 et 7,6 min, nous pouvons conclure qu'il s'agit de deux isomères dont la structure sera confirmée par LC-MS/MS. Au total, 37 isomères de saponines ont été détectés dans les trois extraits des trois individus étudiés. Les proportions molaires de chaque isomère ont été calculées et ce pour les trois individus. Dans chaque composition on retrouve un isomère plus abondant que les autres, ce dernier peut être le même pour les trois extraits ou peut différer, c'est le cas des compositions élémentaires $C_{54}H_{84}O_{26}S$ et $C_{66}H_{106}O_{33}$. Les proportions majoritaires sont indiquées dans le **Tableau 15** en gras. Dans l'ensemble des extraits, l'isomère de la composition élémentaire $C_{54}H_{86}O_{27}S$ à 7,6 min est le plus abondant, suivi de celui de $C_{41}H_{64}O_{17}S$ à 7,6 min et $C_{54}H_{86}O_{26}S$ à 7,9 min correspondant aux m/z 1243, 905 et 1227 $[M+Na]^+$ respectivement.

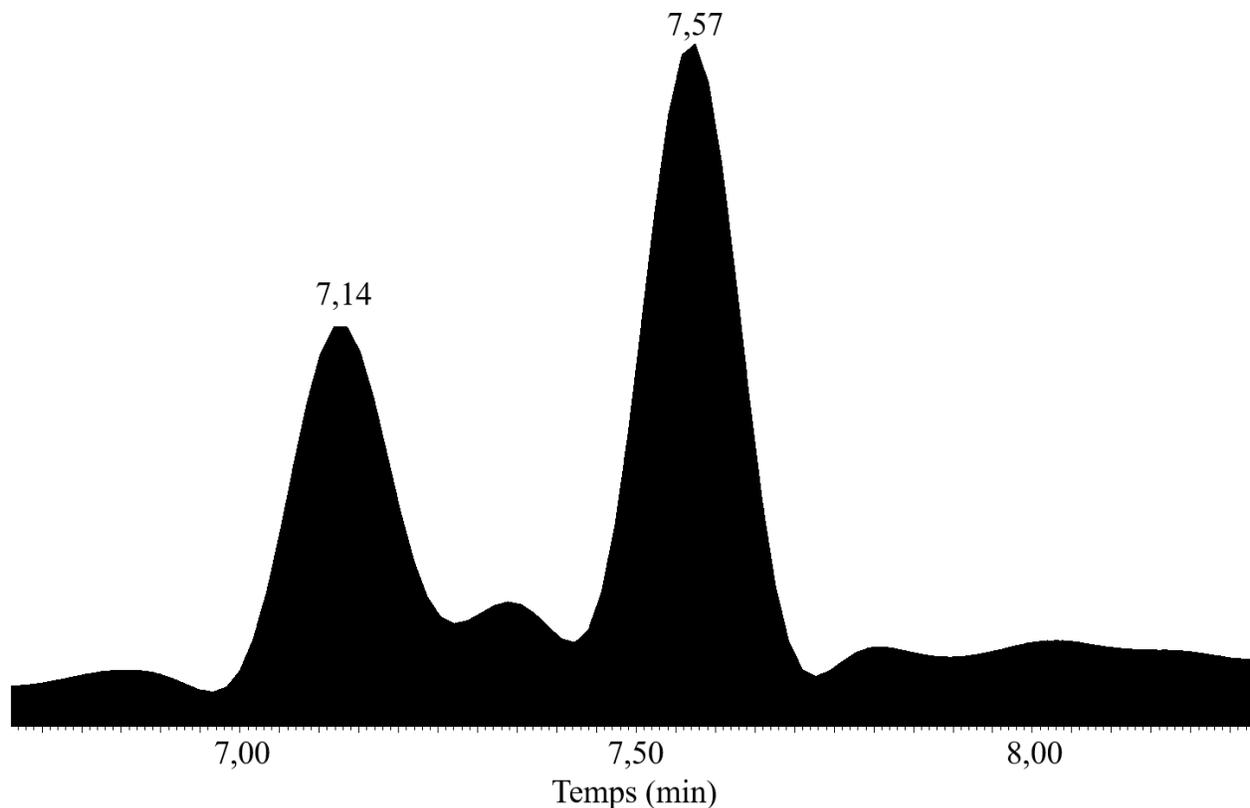


Figure 57: Analyse LC-MS (+). Chromatogramme courant total d'ions (TIC) de la m/z 1425 $[M+H]^+$ extrait du tégument de l'individu 1 de *Holothuria algeriensis*. Les temps de rétention (min) sont notés en haut de chaque pic.

Concernant l'analyse LC-MS des deux extraits de *Holothuria arguinensis*, elle a révélé la présence pour chaque composition élémentaire d'entre un et huit isomères. Au total, 82 isomères de saponines ont été détectés dans les deux extraits des deux individus. Dans l'ensemble des extraits, l'isomère de la composition élémentaire $C_{41}H_{64}O_{17}S$ à 10,0 min est le plus abondant, suivi de celui de $C_{54}H_{86}O_{27}S$ à 7,6 min et $C_{41}H_{64}O_{16}S$ à 10,9 correspondants aux m/z 905, 1243 et 889 $[M+Na]^+$ respectivement.

Tableau 15: Extrait d'*Holothuria algeriensis* : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse. Les compositions élémentaires et les mesures d'erreur de masse (Δ) ont été déterminées par MALDI-HRMS. PMI (%) = Proportion molaire des isomères. Les noms des saponines ont été attribués selon les résultats de la LC-MS/MS. Le gras dans la colonne saponine indique les nouvelles saponines identifiées dans la présente étude et celui des colonnes PMI (%) indique l'isomère à la haute proportion pour la même composition élémentaire. Les saponines soulignées représentent la proposition la plus probable.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2	PMI (%) Individu 3
1479 (1,1)	Holothurinoside I	1457,6628	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄	7,4	0,30	0,02	0,04
	Holothurinoside I/I1			7,7	0,05	0,02	0,06
1463 (1,4)	Saponine A	1441,6885	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₃	7,2	0,17	0,02	0,03
	<u>Holothurinoside H/ Marmoratoside B/ 17a-hydroxyimpatienside A/ Saponine A</u>			7,3	0,47	0,03	0,04
	<u>Holothurinoside H/ Marmoratoside B/ 17a-hydroxyimpatienside A</u>			7,6	0,57	0,05	0,09
	<u>Holothurinoside H/ Marmoratoside B/ 17a-hydroxyimpatienside A</u>			8,0	0,31	0,02	0,03
	Saponine A			8,4	0,08	0,02	0,03
1461 (4,9)	Saponine C	1439,6833	C ₆₄ H ₁₁₀ O ₃₅	7,3	1,71	0,02	0,03
	Saponine B			7,6	0,08	0,02	0,43
	Saponine D			8,0	0,05	0,01	0,03
	Saponine C			8,3	0,02	0,01	0,03
1449 (0)	Holothurinoside G	1427,6820	C ₆₆ H ₁₀₆ O ₃₃	7,1	0,35	0,02	0,05
	Holothurinoside G1			7,4	0,11	0,01	0,04
	Holothurinoside G1			7,6	0,17	0,05	0,10
1447 (1)	Saponine E	1425,6866	C ₆₃ H ₁₀₈ O ₃₅	7,1	1,33	0,01	0,03
	Saponine F			7,6	1,55	0,09	0,06
1287 (3,7)	Holothurinoside E	1265,6208	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	7,1	0,06	0,11	0,08
	Holothurinoside P			7,3	0,09	0,06	0,07
	Holothurinoside O			7,6	0,19	0,35	0,25
	Holothurinoside P			8,5	0,04	0,02	0,18
	Holothurinoside E1			10,1	0,05	0,04	0,05
1243 (2,1)	Scabraside B/ 25-hydroxyfuscocineroside B/ <u>Holothurin A</u>	1181,5178	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	7,6	43,00	48,97	36,44
	Saponine G			8,7	0,34	0,05	0,23

Tableau 15 : (Suite). PMI (%) = Proportion molaire des isomères.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2	PMI (%) Individu 3
1227 (3,4)	Scabraside A/ 24-dehydroechinoside A/ <u>Fuscocineroside C</u> / Fuscocineroside B	1165,53	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	7,6	0,36	0,29	0,27
	Saponine H			7,9	2,21	3,42	4,66
	Saponine H			8,7	0,05	0,02	0,04
	Saponine I			11,3	0,30	0,15	0,38
1225 (2,2)	Saponine J/ Saponine J1	1163,5038	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₆ S	7,6	1,40	1,03	1,20
	Saponine K/ Saponine K1			7,9	0,41	0,53	1,74
	Saponine L			11,3	0,23	0,16	0,36
1111 (2,6)	Saponine M	1089,5724	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₂	9,3	0,06	0,08	0,95
	Saponine N			7,6	0,08	0,03	0,07
905 (2,8)	<u>Holothurin B</u> / Holothurin B4	843,3928	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₇ S	7,6	32,08	31,73	27,46
	Nobiliside B (I)			8,5	0,06	0,16	1,82
	Nobiliside B (I)			8,7	0,10	0,01	0,12
	<u>Holothurin B</u> / Holothurin B4			10,1	11,09	12,09	22,09
	Nobiliside B (I)			10,9	0,40	0,27	0,37

Tableau 16: Extrait d'*Holothuria arguinensis* : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse. Les compositions élémentaires et les mesures d'erreur de masse (Δ) ont été déterminées par MALDI-HRMS. PMI (%) = Proportion molaire des isomères. Les noms des saponines ont été attribués selon les résultats de la LC-MS/MS. Le gras dans la colonne saponine indique les nouvelles saponines identifiées dans la présente étude et celui des colonnes PMI (%) indique l'isomère à la haute proportion pour la même composition élémentaire. Les saponines soulignées représentent la proposition la plus probable.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2
1509 (0,1)	Saponine 1	1487,7195	C ₆₈ H ₁₁₀ O ₃₅	7,6	0,12	0,11
	Saponine 2			8,2	0,02	0,03
	Saponine 2			8,7	0,02	0,01
	Saponine 3			10,1	0,01	0,02
1495 (3,1)	Saponine 4	1473,7253	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₅	7,1	0,02	0,03
	Saponine 5			7,6	0,03	0,04
	Saponine 6			8,2	0,04	0,17
	Holothurinoside K1/ Saponine 7			10,1	0,02	0,02
1463 (2,2)	<u>Holothurinoside H/ Marmoratoside B/ 17a-hydroxyimpatienside A</u>	1441,705	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₃	7,1	0,45	0,11
	Saponine 8			7,3	0,12	0,10
	<u>Holothurinoside H/ Marmoratoside B/ 17a-hydroxyimpatienside A</u>			7,6	0,16	1,40
	Saponine 9			8,4	0,10	0,46
	Saponine 8			8,4	0,03	0,07
	Holothurinoside H1			8,5	0,02	0,08
1355 (0,1)	Saponine 10	1293,6538	C ₆₅ H ₉₈ O ₂₅ S	7,4	0,02	0,02
	Saponine 11			7,6	0,02	0,03
1317 (1,1)	Saponine 12/ Saponine 13	1295,5544	C ₆₁ H ₉₈ O ₂₉	7,4	0,02	0,04
	<u>Holothurinoside N/ Saponine 12/ Saponine 13</u>			7,6	0,03	0,02
	Holothurinoside N			10,1	0,01	0,03
	Saponine 12/ Saponine 13			10,2	0,01	0,02

Tableau 16 : (Suite). PMI (%) = Proportion molaire des isomères.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2
1261 (4,1)	Non identifiée	1199,5342	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₈ S	7,1	0,02	0,02
	Non identifiée			7,4	0,14	0,21
	Non identifiée			7,6	0,53	0,42
	Non identifiée			7,9	0,06	0,08
	Non identifiée			8,1	0,15	0,03
	Non identifiée			10,2	0,02	0,04
1243 (0,2)	Saponine 14	1181,5178	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	7,4	0,81	0,58
	Scabraside B/ 25-hydroxyfuscocineroside B/ <u>Holothurin A</u>			7,6	11,64	8,37
1229 (3,9)	Saponine 15	1167,543	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₇ S	7,2	0,03	0,02
	Saponine 17			7,4	0,15	0,03
	Saponine 17			7,6	0,01	0,04
	Saponine 17			7,7	0,05	0,03
	Saponine 16			8,0	0,02	0,03
	Saponine 16			10,2	0,02	0,06
	Saponine 18			11,3	0,82	0,97
1227 (1,1)	Scabraside A/ 24-dehydroechinoside A/ <u>Fuscocineroside C</u> / Fuscocineroside B	1165,53	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	7,4	0,27	0,09
	Saponine 19			7,6	0,08	0,07
	Scabraside A/ 24-dehydroechinoside A/ <u>Fuscocineroside C</u> / Fuscocineroside B			7,9	0,87	1,16
	Scabraside A/ 24-dehydroechinoside A/ <u>Fuscocineroside C</u> / Fuscocineroside B			10,1	0,15	0,01
	Saponine 20			11,3	0,52	0,46
1209 (4,2)	Saponine 21	1147,7275	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₅ S	7,4	0,15	0,03
	Saponine 21/ Saponine 22			7,6	0,09	0,08
	Saponine 21			7,9	0,05	0,05
	Saponine 21			8,2	0,02	0,03
	Saponine 21			10,2	0,02	0,02
1171 (4,2)	Non identifiée	1149,607	C ₅₅ H ₈₈ O ₂₅	7,6	0,14	0,09

Tableau 16 : (Suite). PMI (%) = Proportion molaire des isomères.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2
1157 (0,4)	Non identifiée	1135,617	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₅	7,6	0,13	0,19
1141 (2,8)	Desholothurin A	1119,7097	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄	7,6	0,13	0,09
	Desholothurin A1			8,0	0,03	0,03
	Saponine 23			8,4	0,05	0,07
	Desholothurin A			9,0	0,02	0,03
	Saponine 23			10,2	0,44	0,37
	Saponine 24/ Saponine 25			13,6	0,04	0,04
1125 (5,0)	Holothurinoside C	1103,7582	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	7,4	0,35	0,16
	Holothurinoside C			7,6	0,38	0,53
	Holothurinoside C			8,0	0,04	0,15
	Holothurinoside C			8,4	0,02	0,03
	Saponine 26			9,3	0,04	0,06
	Holothurinoside C			9,7	0,02	0,02
	Holothurinoside C			10,1	0,91	3,46
	Holothurinoside C1/ Saponine 26			11,2	0,04	0,04
995 (1,2)	Saponine 27	973,5799	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₀	7,4	0,04	0,04
	Saponine 28			9,3	0,02	0,03
	Saponine 29			10,1	0,01	0,05
	Saponine 27			10,9	0,08	0,07
951 (4,8)	Saponine 30	929,5351	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	7,6	0,05	0,05
	Saponine 31			10,0	0,01	0,02
	Saponine 32			11,6	0,21	0,07

Tableau 16 : (Suite). PMI (%) = Proportion molaire des isomères.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) Individu 1	PMI (%) Individu 2
905 (0,3)	Nobiliside B (I)	843,3928	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₇ S	7,4	1,58	0,09
	<u>Holothurin B</u> / Holothurin B4			7,6	9,21	6,77
	Nobiliside B (I)			8,4	0,25	0,30
	Nobiliside B (I)			9,2	1,17	0,49
	<u>Holothurin B</u> / Holothurin B4			10,0	60,56	62,92
	Nobiliside B (I)			10,9	0,84	1,99
	Nobiliside B (I)			11,7	0,05	0,11
889 (0,1)	<u>Holothurin B3</u> / 24-dehydroechinoside B	827,4051	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆ S	7,3	0,17	0,05
	<u>Holothurin B3</u> / 24-dehydroechinoside B			7,9	0,72	1,01
	Saponine 33			8,9	0,03	0,02
	<u>Holothurin B3</u> / 24-dehydroechinoside B			10,9	2,67	3,51
	Saponine 34			11,2	0,04	0,30
	<u>Holothurin B3</u> / 24-dehydroechinoside B			11,7	1,28	0,85
	Saponine 34			12,0	0,30	0,15

3.1.3. Caractérisation de la structure moléculaire des saponines par LC-MS/MS

Des expériences LC-MS/MS ont été réalisées pour confirmer la structure des saponines connues dans un premier temps et ensuite d'essayer d'identifier de nouveaux congénères en se basant sur les règles de fragmentation.

L'analyse LC-MS/MS de l'extrait de *H. algeriensis* a été réalisée sur l'ensemble des ions m/z observées dans l'analyse MALDI-MS. Nous allons prendre comme exemple l'ion parent m/z 1425 $[M+H]^+$ qui a été abordé ci-dessus. La **Figure 58** présente le chromatogramme courant total d'ions (TIC) de l'ion m/z 1425 lors de l'analyse LC-MS/MS, ce dernier est similaire au chromatogramme LC-MS de l'ion m/z 1425 présenté à la **Figure 57**.

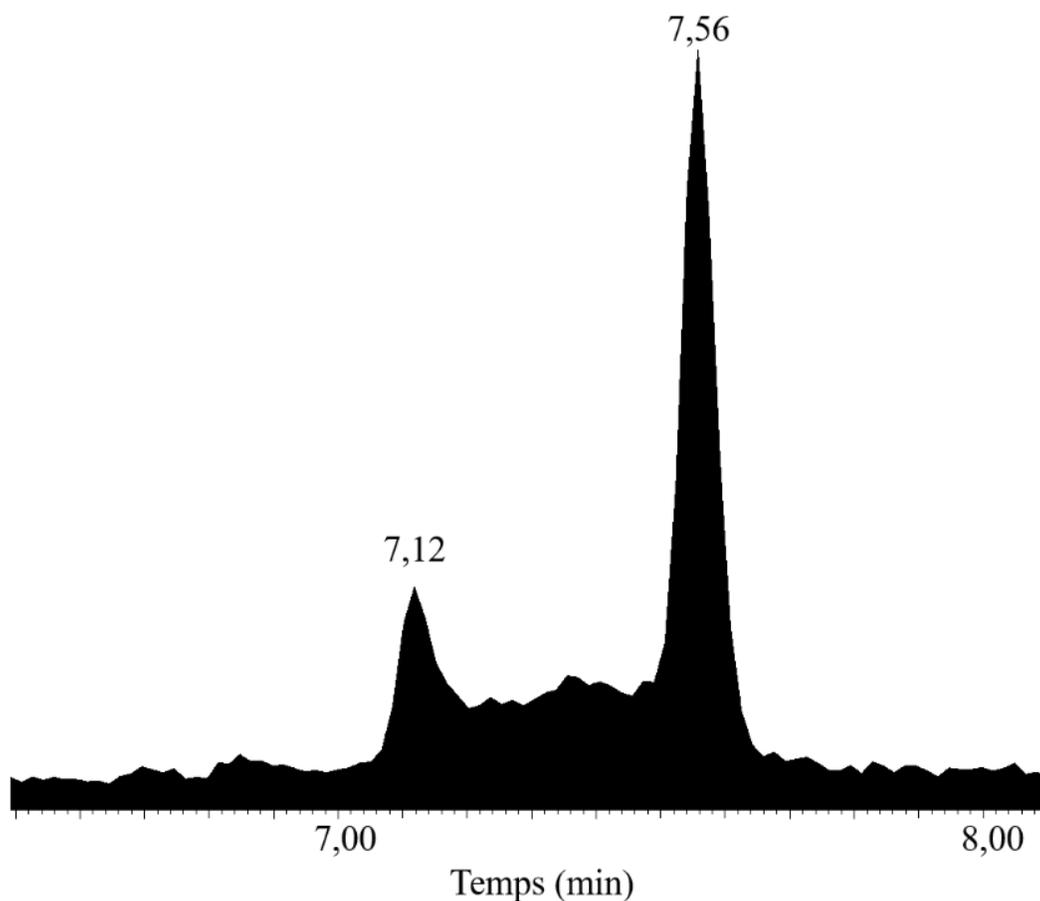


Figure 58 : Analyse LC-MS/MS. Chromatogramme courant total d'ions (TIC) de la m/z 1425 $[M+H]^+$ lors d'une analyse LC-MS/MS de l'extrait de saponine de *H. algeriensis*. Les temps de rétention (min) sont notés en haut de chaque pic.

Par conséquent, deux spectres LC-MS/MS sont générés aux deux temps de rétention 7,1 min et 7,6 min et sont présentés dans la **Figure 59A** et **Figure 59B** respectivement. Chaque pic du spectre correspond à un ion fragment de l'ion parent qui est situé à droite et qui dans ce cas n'apparaît pas car il est complètement fragmenté. Afin d'établir le schéma de fragmentation de cette saponine pour ensuite la reconstituer, les différences de masse entre chaque pic sont calculées pour déterminer les groupements chimiques correspondant à ces écarts. A ce stade, on peut soit perdre les sucres un à un pour n'avoir que l'aglycone, soit perdre l'aglycone en premier puis les sucres. Lors de la réaction de condensation de deux sucres, une molécule d'eau est perdue, cependant, le détachement des sucres peut se faire sans ou avec la molécule d'eau.

En suivant le schéma de fragmentation au tr 7,1 min en trait plein à la **Figure 59A**, les sucres sont retirés un à un de l'ion parent. Ainsi, l'ion 1249 correspond au retrait du sucre 3-O-Méthyl-Glucose ($[M+H]^+ - M_{3\text{-O-Méthyl-Glucose}} + M_{H_2O} = 1425 - 194 + 18 = 1249$). La différence de masse suivante entre la m/z 1249 et 1087 correspond à la perte du deuxième sucre qui est le Glucose (162 Da). Ce raisonnement est appliqué pour la suite du spectre avec des pertes consécutives de résidus de Glu, Glu, Qui (146 Da) et Xyl (132 Da) produisant des ions détectés aux m/z 925, 763, 617 et 485 respectivement. Ainsi, les six sucres de la molécule sont perdus et il ne reste que la partie non glycosidique à savoir l'aglycone qui apparaît au pic m/z 485.

Un deuxième schéma de fragmentation (donnant la même structure que la précédente) représenté en pointillés peut être obtenu pour ce même tr en retirant d'abord la masse de l'aglycone de l'ion parent ($[M+H]^+ - M_{\text{Aglycone}} = 1425 - 484 = 941$) puis les sucres un à un. Il faut noter que l'ion m/z 485 peut correspondre à l'aglycone et/ou à la chaîne de 3 sucres [MeGlu-Glu-Qui].

Le spectre LC-MS/MS au temps de rétention 7,6 min présente un autre schéma de fragmentation. La différence entre les deux réside dans les deux composantes de la saponine à savoir la chaîne glycosidique et l'aglycone. La fragmentation de l'ion parent donne des pertes consécutives de résidus de MeGlu, Qui, MeGlu, Glu, Qui et Xyl produisant des signaux détectés à 1249, 1085, 909, 747, 601 et 469 respectivement. Le pic 469 correspond à l'aglycone qui diffère du premier par un groupement hydroxyle (16 Da) en moins.

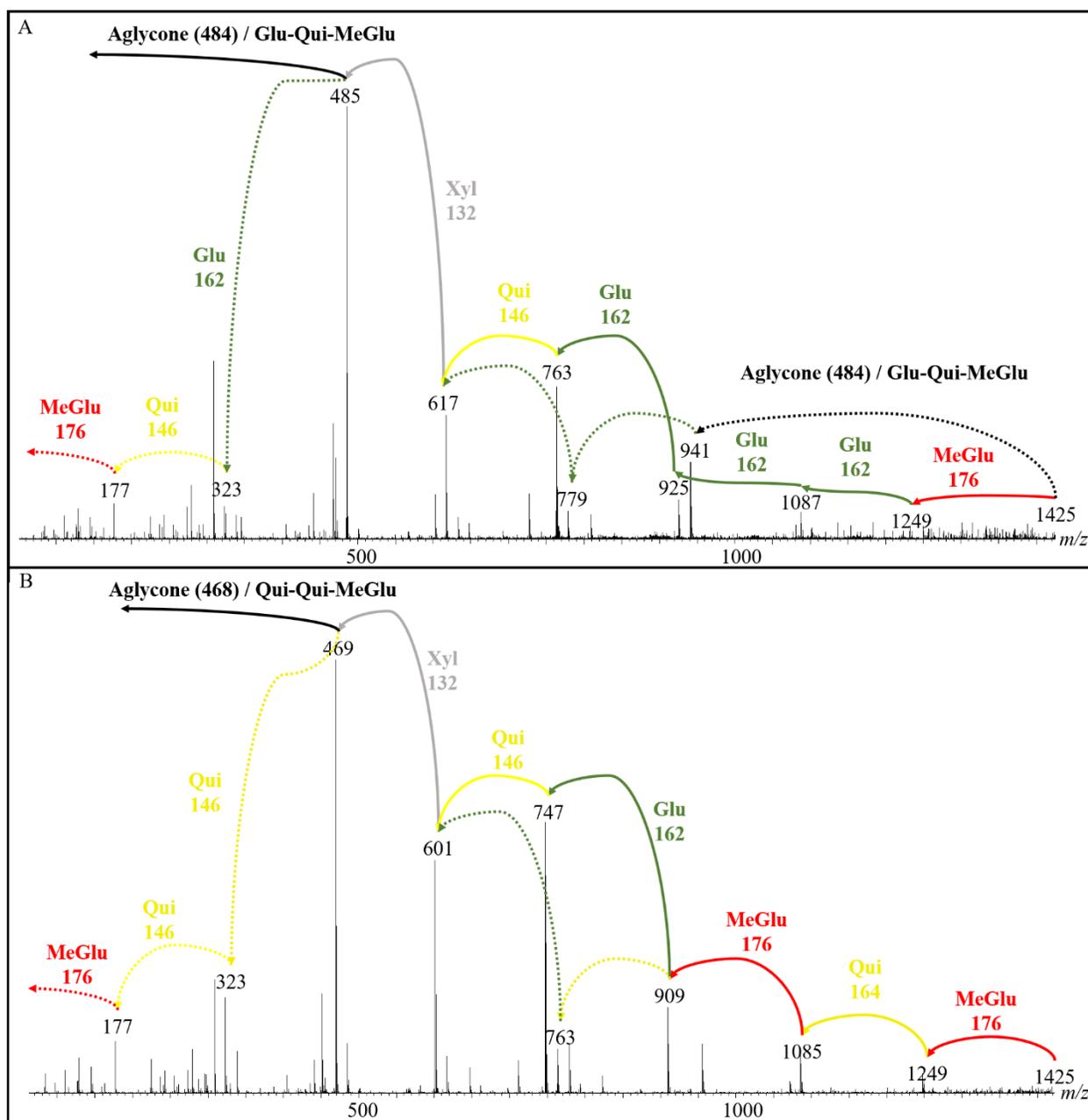


Figure 59 : Analyse LC-MS/MS des ions m/z 1425 provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de *H. algeriensis*. **A.** Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine E au temps de rétention 7,14 min. **B.** Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine F au temps de rétention 7,6 min.

A ce stade de l'analyse LC-MS/MS, la structure de l'aglycone ne peut pas être déterminée avec exactitude étant donné que ce dernier ne se fragmente pas, il faudrait alors procéder à une MS/MS/MS qui consiste à resélectionner un ion fragment d'une analyse MS/MS et le fragmenter

à nouveau avant de l'analyser. De ce fait, quand le schéma de fragmentation ne correspond pas à une saponine reportée dans la bibliographie et qu'il s'agit d'une nouvelle proposition de molécule, les différentes possibilités de structures de l'aglycone qui correspondent à la masse trouvée sont cités.

Le **Tableau 17** résume toutes les saponines signalées chez *Holothuria algeriensis* et *H. arguinensis* lors de la présente étude avec leurs caractéristiques structurales. Les caractéristiques structurales sont indiquées dans le tableau en quatre colonnes, la première « Aglycone-R1 » indique la structure de l'aglycone (**Figure 62**) ainsi que la structure des substituants de la chaîne latérale (R1), la deuxième « R2 » indique les substituants de la fraction glycosidique correspondant aux deux et quatre monosaccharides (**Figure 63**), la troisième « R3 » indique les substituants R2 constitués de trois, cinq ou six unités monosaccharide (**Figure 64**). Les nouvelles propositions de saponines ont été nommées de « Saponine A » à « Saponine N » pour celles identifiées chez *H. algeriensis* (parfois le chiffre 1 est ajouté après la lettre quand il s'agit d'une saponine retrouvée au même tr) et de « Saponine 1 » à « Saponine 34 » pour celles identifiées chez *H. arguinensis* et sont notées en gras dans le **Tableau 15** et le **Tableau 16**.

A partir des deux schémas de fragmentation de l'ion m/z 1425 au tr 7,1 et 7,6 (**Figure 59**), nous pouvons proposer deux structures qui n'ont été répertoriées pour aucune espèce d'holothurie qu'on nomme « Saponine E » et « Saponine F » respectivement (**Tableau 17**). Dans le cas de la saponine E, l'aglycone dont la masse est de 484 Da peut correspondre aux structures d'aglycone A10, B1, B9 ou B11 (**Figure 62**). Celui de la saponine F peut correspondre à A1, A9, A11, B4, B5 ou D1 (**Figure 62**).

Du point de vue composition chimique et structure moléculaire, la « Saponine A » qui correspond à la m/z 1463 $[M+Na]^+$ ou m/z 1441 $[M+H]^+$ est très proche de la « Saponine F » et elle font toutes les deux parties du groupe 1 cité ci-dessus (**Figure 55**). En effet, les deux structures présentent la même chaîne glycosidique et la différence entre les deux saponines réside dans la structure de l'aglycone qui présente un groupement hydroxyle en plus (16 Da) chez la Saponine A.

Le schéma de fragmentation de l'ion m/z 1441 au tr 7,3 min en trait plein (Saponine A) (**Figure 60A**) donne les mêmes pertes consécutives de sucres que la saponine F à savoir MeGlu, Qui, MeGlu, Glu, Qui et Xyl produisant des signaux détectés à 1247, 1101, 925, 763, 617 et 485

respectivement. Ce dernier correspond à l'aglycone. La structure de la saponine A est indiquée dans le **Tableau 17**.

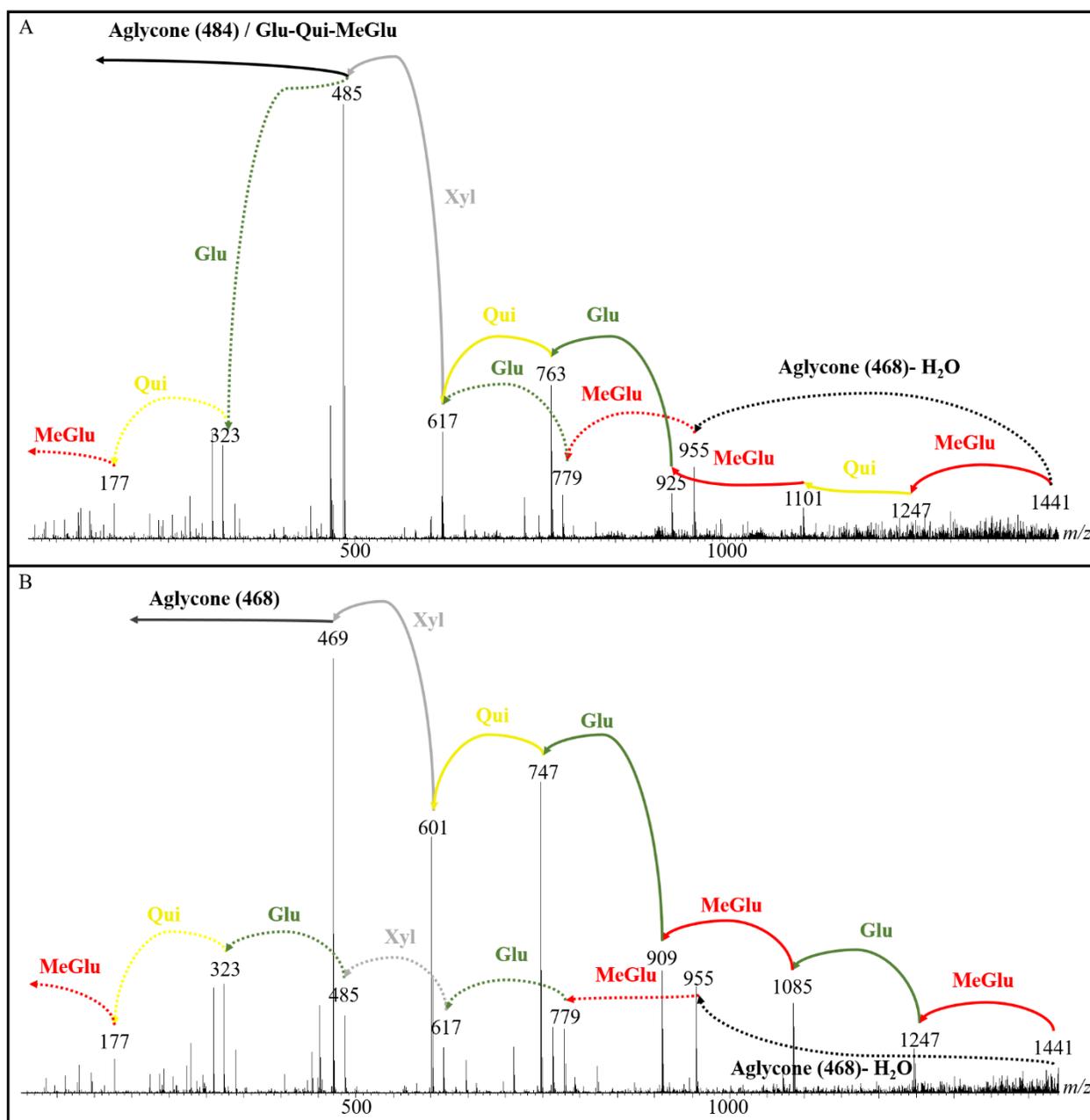


Figure 60 : Analyse LC-MS/MS des ions m/z 1441 provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de *H. algeriensis*. **A.** Spectre de masse LC-MS/MS de la saponine A (trait plein) et des saponines Holothurinoside H, Marmoratoside B ou 17a-hydroxyimpatienside A (trait pointillé) au temps de rétention 7,3 min. **B.** Spectre de masse LC-MS/MS des saponines Holothurinoside H, Marmoratoside B ou 17a-hydroxyimpatienside A au temps de rétention 7,6 min.

Un autre schéma de fragmentation de l'ion m/z 1441 au même tr que le précédent ainsi que le schéma de fragmentation au tr 7,6 min sont représentés en trait pointillé à la **Figure 60A et B**. L'aglycone qui a une masse de 468 Da est perdu pour donner l'ion m/z 955 qui correspond à la chaîne de sucre MeGlu, Glu, Xyl, Glu, Qui et MeGlu. Au tr 7,6 min, cette même molécule peut être reconstituée selon un deuxième schéma de fragmentation qui consiste à perdre les sucres dans un premier temps pour ne laisser que la masse de l'aglycone au pic m/z 469. En fait ces schémas de fragmentation permettent de reconstituer une saponine qui pourrait correspondre à trois possibilités déjà répertoriées chez d'autres espèces d'holothuries et dont l'aglycone possède la même masse, il s'agit de l'Holothurinoside H, La Marmoratoside B et la 17a-hydroxyimpatienside A. De cette façon, il s'avère possible de trouver dans le spectre d'un même tr, deux schémas de fragmentation correspondant à deux structures différentes tel qu'il est le cas au tr 7,3 min.

Etant donné que nous n'avons pas pu trancher sur la structure de l'aglycone, l'ensemble des possibilités de saponines qui existent dans chaque temps de rétention sont noté dans le **Tableau 15**. Des spectres de fragmentation similaires peuvent apparaître dans plusieurs temps de rétention pour la même m/z . Dans le cas de l'ion m/z 1441, la Saponine A a été identifiés au tr 7,2, 7,3 et 8,4 min, l'Holothurinoside H, la Marmoratoside B ou la 17a-hydroxyimpatienside A au tr 7,6, 7,3 et 8,0 min.

De façon similaire, des analyses LC-MS/MS ont été effectuées pour tous les ions saponines détectés en MALDI-MS et les caractéristiques des différentes structures établies sont regroupées dans le **Tableau 17**. Au total, 37 structures ont été identifiées pour l'espèce *H. algeriensis* dont 16 sont nouvelles. Le nombre total regroupe également les différentes possibilités aux aglycones et/ou de chaîne de sucres différents. Parmi les structures déjà identifiées chez d'autres espèces d'holothuries, huit sont des possibilités uniques dont la structure peut être confirmée, il s'agit de l'holothurinoside I à la m/z 1479, G et G1 à la m/z 1449, E, P, O, E1 à la m/z 1287 et la Nobilside B (I) à la m/z 905 $[M+Na]^+$. Ces structures possèdent l'aglycone B1 pour la masse 484 Da, A1 ou D1 (dans le cas de la Nobilside B (I)) pour la masse 468 Da et C1 pour la masse 452 Da.

Certaines saponines présentent la fonction acétyle au niveau de l'aglycone, cette dernière apparaît dans les spectres LC-MS/MS par des différences de 60 Da. Il s'agit des saponines B, D, J1 et K. D'autres aglycones tel que ceux des saponines C et J n'ont pas pu être identifiés car aucune correspondance n'a été trouvée dans la bibliographie.

En considérant les résultats de MALDI-MS, deux groupes de m/z ont été établis et dont la différence entre leurs représentants est de 16 Da (**Figure 55**). En analysant les spectres LC-MS/MS, nous pouvons conclure que les couples m/z suivants et qui appartiennent aux groupes établis présentent la même chaîne glycosidique et la différence de 16 Da réside dans la structure de l'aglycone qui présente une fonction hydroxyle en plus ou en moins, il s'agit de l'Holothurinoside I et [Holothurinoside H, Marmoratoside B ou 17a-hydroxyimpatienside A] ; la Saponine A et la Saponine E ; [la Scabraside B, 25-hydroxyfuscocineroside B ou Holothurin A] et [la Scabraside A, 24-dehydroechinoside A, Fuscocineroside C ou Fuscocineroside B] et enfin la Saponine G et la Saponine I.

De la même manière, l'analyse LC-MS/MS a été réalisée sur 16 ions m/z identifiés par MALDI-MS chez *Holothuria arguinensis* (excepté les ions aux m/z 1171 et 1157). Au total, 57 structures de saponines ont été identifiées dont 34 sont nouvelles. Comme c'était le cas pour *H. algeriensis*, plusieurs saponines ont été identifiées dans un même tr, ils peuvent différer par la structure de l'aglycone telle que la [Scabraside B, la 25-hydroxyfuscocineroside B] et l'Holothurin A ; par la structure de la chaîne glycosidique telle que les saponine 12 et 13 ou par l'ensemble de la structure telle que l'Holothurinoside K1 et la Saponine 7. Parmi les structures identifiées déjà répertoriées dans la bibliographie, six sont des possibilités uniques qu'on pourrait confirmer, il s'agit de l'Holothurinoside H1, l'Holothurinoside N, la Désholothurin A et A1, l'Holothurinoside C et la Nobiliside B(I) qui correspondent aux m/z 1463, 1317, 1141, 1125 et 905 $[M+Na]^+$. Ces structures possèdent également les mêmes structures d'aglycones pour les mêmes masses citées ci-dessus pour *H. Algeriensis*.

Parmi les ions m/z analysés, quatre sont communes entre *H. algeriensis* et *H. arguinensis* et correspondent aux m/z 1441, 1181, 1165 et 843 $[M+H]^+$. Ainsi, parmi les nouvelles molécules, quatre sont communes entre les deux et ont été identifiées aux trois premières m/z . il s'agit de la Saponine A = Saponine 8, Saponine G = Saponine 14, Saponine H = Saponine 19 et Saponine I = Saponine 20.

L'analyse MALDI-MS des extraits de *H. arguinensis* a révélé la présence de trois groupes dont les m/z de ses représentants diffèrent de 16 Da (**Figure 56**). Etant donné que l'analyse LC-MS/MS n'a pas été faite sur l'ion m/z 1157, nous ne pouvons pas confirmer sa structure, cependant, les couples de saponine [Scabraside B/ 25-hydroxyfuscocineroside B ou Holothurin A] et

[Scabraside A/ 24-dehydroechinoside A/ Fuscocineroside C ou Fuscocineroside B] ; Saponine 14 et Saponine 20 ; Desholothurin A et Holothurinoside C ; Desholothurin A1 et Holothurinoside C1 ; [Holothurin B ou B4] et [Holothurin B3 ou 24-dehydroechinoside B] et enfin, Nobiliside B (I) et Saponine 34 ont la même chaîne de sucre en commun et la différence entre eux réside dans l'absence ou la présence de la fonction hydroxyle dans l'aglycone.

Parmi les structures identifiées, 16 présentent un groupe acétyle au niveau de l'aglycone. Le schéma de fragmentation à la **Figure 61A** correspond à la Saponine 9 qui est identifiée à la m/z 1463 $[M+Na]^+$ ou 1441 $[M+H]^+$. A partir de l'ion m/z 1441, des pertes consécutives de quatre sucres (MeGlu, Glu, Glu et Glu) est observée dans un premier temps, ensuite, la différence entre les ions m/z 779 et 719 correspond à 60 Da qui représente la perte de l'acétyle, suivi de la perte de deux xyloses pour arriver à la masse de l'aglycone à m/z 455. Cependant, dans le cas de cet exemple, la structure de l'aglycone n'a pas été identifiée car aucune correspondance n'a été trouvée dans la bibliographie.

Un autre exemple est illustré à la **Figure 61B** qui s'agit de la Saponine 29 observée à la m/z 973 et qui est composée de trois sucres. Dans un premier temps, le fragment cible perd 60 Da de l'acétyle puis la chaîne des trois sucres (Xyl, Qui et Xyl) pour arriver à l'aglycone qui dans ce cas a une masse de 484 Da. En se référant à la bibliographie, une seule structure de l'aglycone correspondant à la masse observée est retrouvée et il s'agit du F8 représenté dans la **Figure 62**.

La structure de certaines saponines n'a pas pu être élucidée en raison de quelques incohérences des résultats obtenue par LC-MS/MS. C'est le cas des saponines 10, 11, 24, 30, 33 et celles du pic m/z 1261 $[M+Na]^+$.

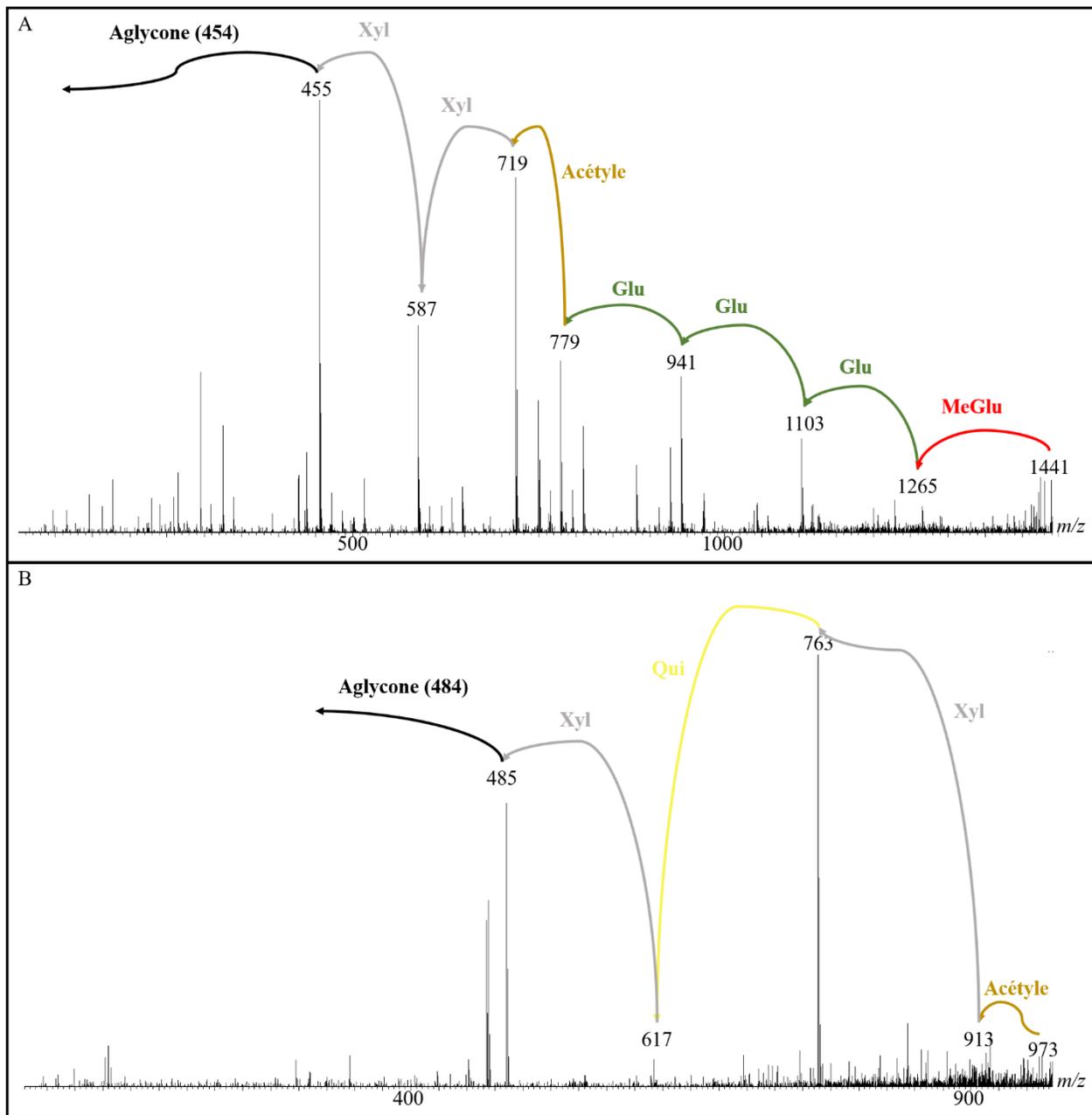


Figure 61 : Analyse LC-MS/MS des ions acétylés provenant du mélange de saponines de l'individu 1 de *H. arguinensis*. **A.** Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine 9 (m/z 1441) au temps de rétention 8,3 min. **B.** Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine 29 au temps de rétention 10,1 min.

Tableau 17 : Aperçu des saponines identifiées chez les espèces *Holothuria algeriensis* et *Holothuria arguinensis* et leurs propriétés structurales. Les lettres et les chiffres dans les colonnes Aglycone-R1, R2 et R3 correspondant aux sous-structures indiquées dans les **Figures 62, 63** et **64** respectivement. Le gras dans la colonne « Saponine » indique les nouvelles structures identifiées lors de cette étude et celui de la colonne « Aglycone-R1 » indique la structure la plus probable.

Saponine	Formule moléculaire	Aglycone-R1	R2	R3	<i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Masse nominale	<i>H.</i> <i>algeriensis</i>	<i>H.</i> <i>arguinensis</i>
Saponine 1	C ₆₈ H ₁₁₀ O ₃₅	B12/F2	g	IX	1509	1486		X
Saponine 2		Non identifié	g	X				X
Saponine 3		F8	i	VII				X
Holothurinoside K1	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₅	B1	g	VII	1495	1472		X
Saponine 4		B12/F2	g	XI				X
Saponine 5		B12/F2	e	IX				X
Saponine 6		Non identifié	g	IX				X
Saponine 7		F8	f	XI				X
Holothurinoside I	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄	B1	f	VII	1479	1456	X	
Holothurinoside I1		A1	g	VII			X	
17a-hydroxyimpatiside A	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₃	B4	f	VII	1463	1440	X	X
Holothurinoside H		A1	f	VII			X	X
Holothurinoside H1		C1	g	VII				X
Marmoroside B		A11	f	VII			X	X
Saponine 9		Non identifié	k	VIII				X
Saponine A (= Saponine 8)		A10/ B1 /B9/B11	f	X			X	X
Holothurinoside G	C ₆₆ H ₁₀₆ O ₃₃	B1	f	IX	1449	1426	X	
Holothurinoside G1		A1	g	IX			X	
Saponine 10	C ₆₅ H ₉₈ O ₂₅ S	-	-	-	1355	1310		X
Saponine 11		-	-	-				X
Saponine B	C ₆₄ H ₁₁₀ O ₃₅	A16	f	XI	1461	1438	X	
Saponine C		Non identifié	f	VII			X	
Saponine D		A13/A14/E2	h	IX			X	

Tableau 17 : (Suite).

Saponine	Formule moléculaire	Aglycone-R1	R2	R3	<i>m/z</i> [M+Na] ⁺	Masse nominale	<i>H.</i> <i>algeriensis</i>	<i>H.</i> <i>arguinensis</i>
Saponine E	C ₆₃ H ₁₀₈ O ₃₅	A10/ B1 /B9/B11	f	VIII	1447	1424	X	
Saponine F		A1 /A9/A11/B4/ B5/D1	f	X			X	
Holothurinoside N (= Holothurinoside L)	C ₆₁ H ₉₈ O ₂₉	B1	f	V	1317	1294		X
Saponine 12		B12/F2	f	VI			X	
Saponine 13		B12/F2	l	IV			X	
Holothurinoside E (= 17-dehydroxyholothurinoside A)	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	A1	f	III	1287	1264	X	
Holothurinoside E1		C1	g	III			X	
Holothurinoside O		Pas clair	f	III			X	
Holothurinoside P		B1	f	IV			X	
Non identifiée	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₈ S	-	-	-	1261	1216		X
Saponine M	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₂	A4/A5/ C1	e	I	1111	1088	X	
Saponine N		A10/ B1 /B9/B11	i	I			X	
25-hydroxyfuscocineroside B	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	A10	f	II	1243	1198	X	X
Holothurin A		B1	f	II			X	X
Saponine G (= Saponine 14)		A1 /A9/A11/B4/ B5/D1	g	II			X	X
Scabraside B (= 17- hydroxyfuscocineroside B)	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	B9	f	II	1227	1182	X	X
17-dehydroxyholothurin A (= Fuscocineroside C)		A1	f	II			X	X
24-Dehydroechinoside A		B4	f	II			X	X
Fuscocineroside B		A9	f	II			X	X
Saponine H (= Saponine 19)		A10/ B1 /B9/B11	h	II			X	X
Saponine I (= Saponine 20)	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₅ S	A4/A5/ C1	g	II	1209	1164	X	X
Scabraside A		B5	f	II			X	X
Saponine 21	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₅ S	Non identifié	h	II	1209	1164		X
Saponine 22		E4	d	II				X

Tableau 17 : (Suite).

Saponine	Formule moléculaire	Aglycone-R1	R2	R3	m/z [M+Na] ⁺	Masse nominale	<i>H. algeriensis</i>	<i>H. arguinensis</i>	
Saponine 15	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₇ S	A10/B1/B9/B11	k	II	1229	1184		X	
Saponine 16		A1/A9/A11/B4/B5/D1	m	II				X	
Saponine 17		A1/A9/A11/B4/B5/D1	e	II				X	
Saponine 18		A7/B2	f	II				X	
Desholothurin A (= Nobilicide 2A)	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄	B1	f	I	1141	1118		X	
Desholothurin A1 (= Arguside E)		A1	g	I				X	
Saponine 23		B12/F2	j	I				X	
Saponine 24		-	-	-				X	
Saponine 25		Non identifié	i	I				X	
Holothurinoside C	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	A1	f	I	1125	1102		X	
Holothurinoside C1		C1	g	I				X	
Saponine 26		A10/B1/B9/B11	h	I				X	
Saponine J	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₆ S	Non identifié	f	II	1225	1180	X		
Saponine J1		A15	d	II				X	
Saponine K		E4	j	II				X	
Saponine K1		A6	g	II				X	
Saponine L		-	-	-				X	
Saponine 27	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₀	B12/F2	c	III	995	972		X	
Saponine 28		Non identifié	c	V				X	
Saponine 29		F8	b	VI				X	
Saponine 30	C ₄₇ H ₇₆ O ₁₈	-	-	-	951	928		X	
Saponine 31		A10/B1/B9/B11	c	III				X	
Saponine 32		A7/B2	c	V				X	
Holothurin B	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₇ S	B1	b	II	905	860	X	X	
Holothurin B4		B11	b	II				X	X
Nobilicide B (I) (= Nobilicide C (II))		D1	a	II				X	X

Tableau 17 : (Suite).

Saponine	Formule moléculaire	Aglycone-R1	R2	R3	m/z [M+Na]⁺	Masse nominale	<i>H.</i> <i>algeriensis</i>	<i>H.</i> <i>arguinensis</i>
24-dehydroechinoside B	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₆ S	B4	b	II	889	844		X
Holothurin B3		A1	b	II				X
Saponine 33		-	-	-				X
Saponine 34		A4/A5/C1	a	II				X

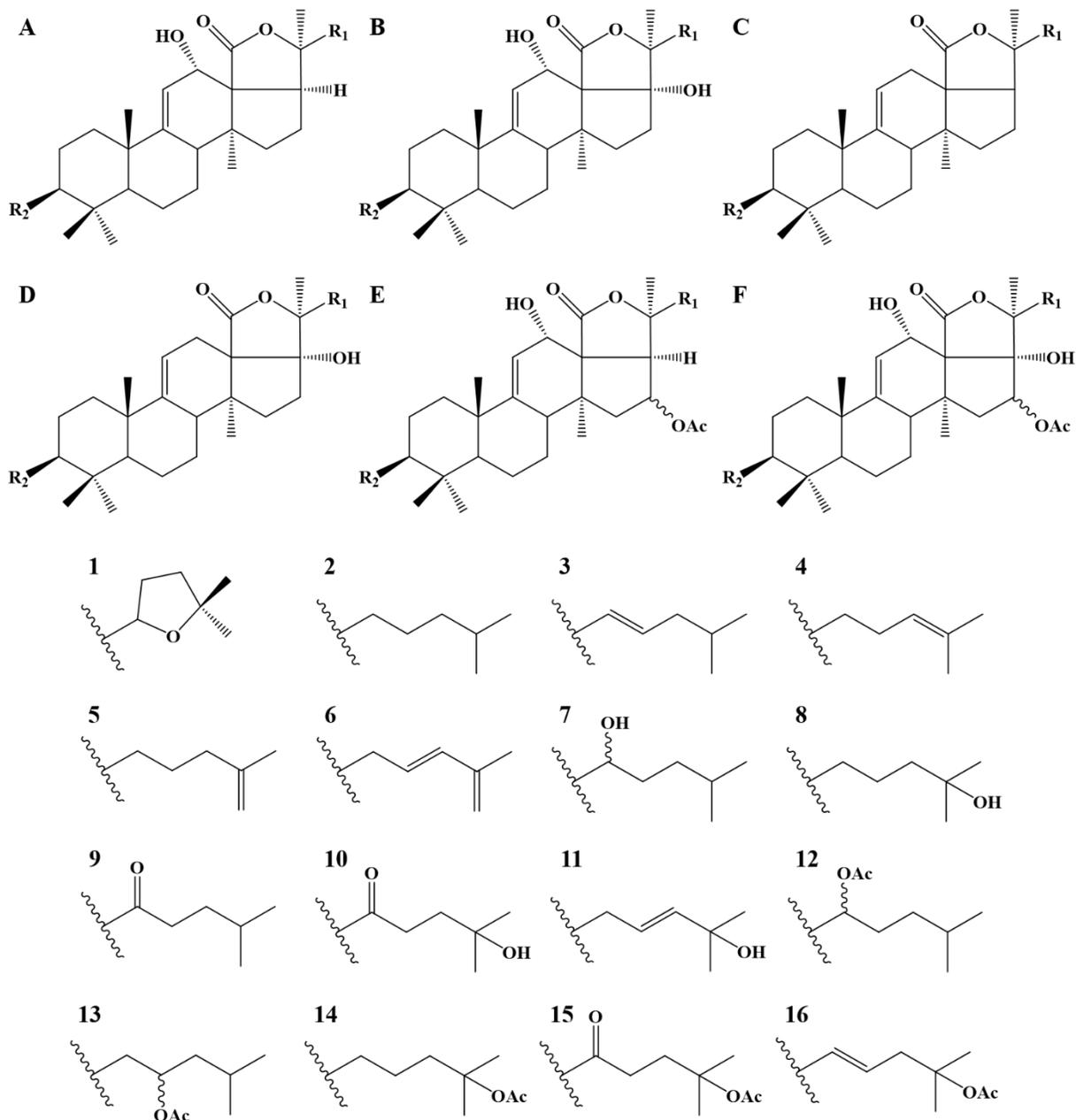
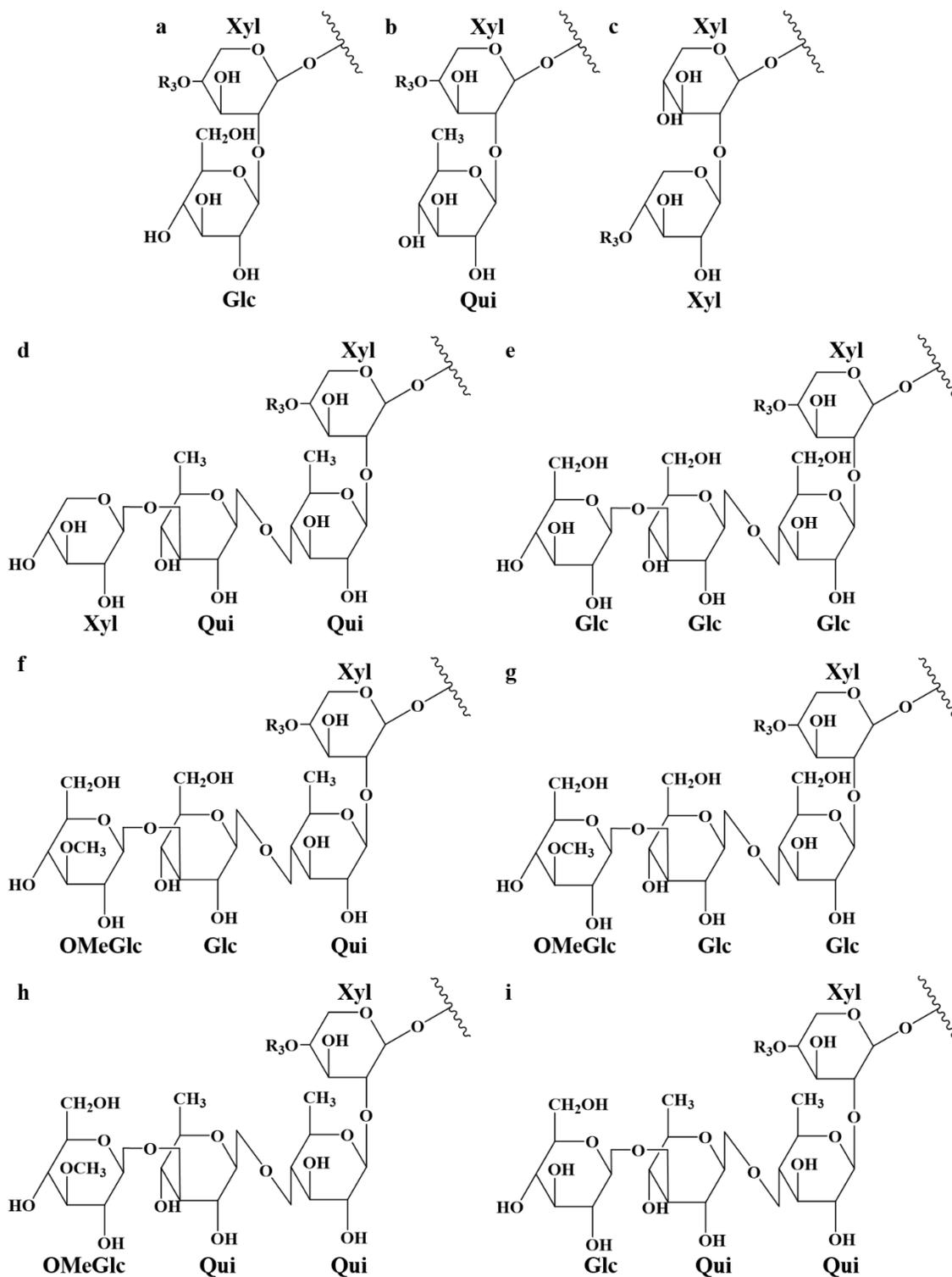


Figure 62 : Squelettes possibles et chaînes latérales des aglycones observés chez *Holothuria algeriensis*, *Holothuria arguinensis* et *Parastichopus regalis*. Les lettres et les chiffres en majuscules correspondent à ceux indiqués dans la colonne « Aglycone-R1 » des **Tableaux 17** et **19**.



A suivre dans la prochaine page

Suite

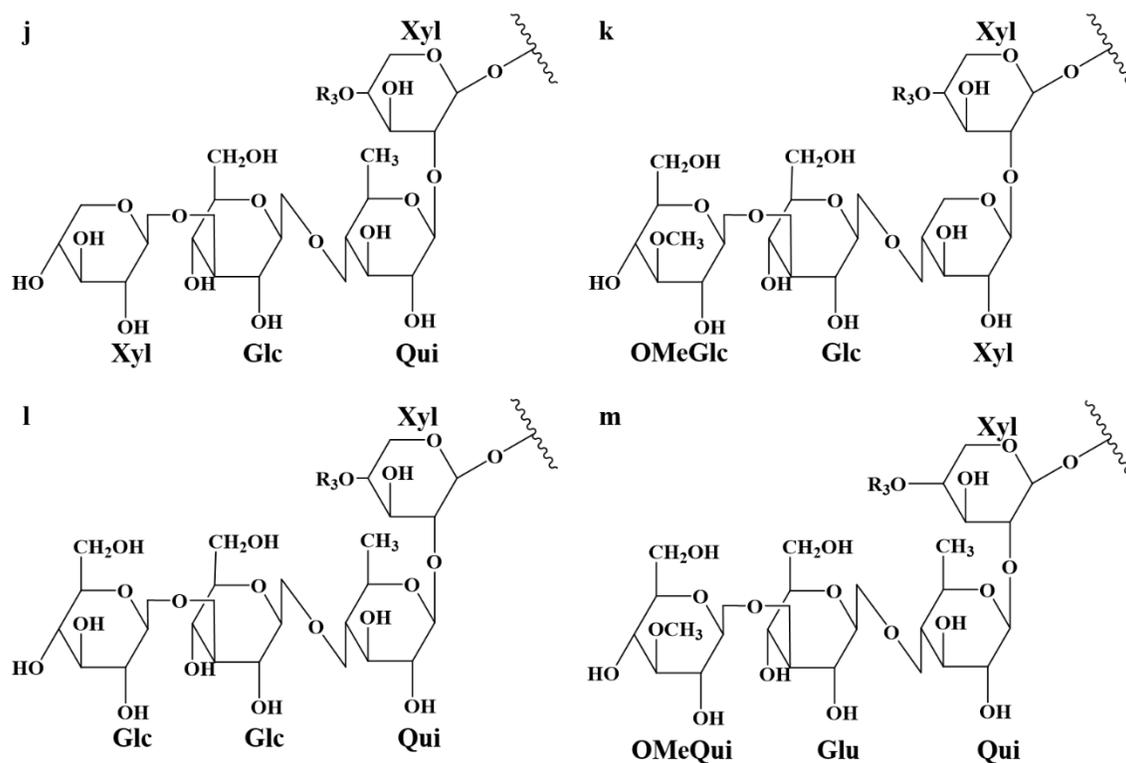


Figure 63 : Fractions glycosidiques des saponines identifiées dans les extraits de *Holothuria algeriensis*, *Holothuria arguinensis* et *Parastichopus regalis*. Les lettres en minuscules correspondent à celles de la colonne « R2 » des **Tableaux 17** et **19**.

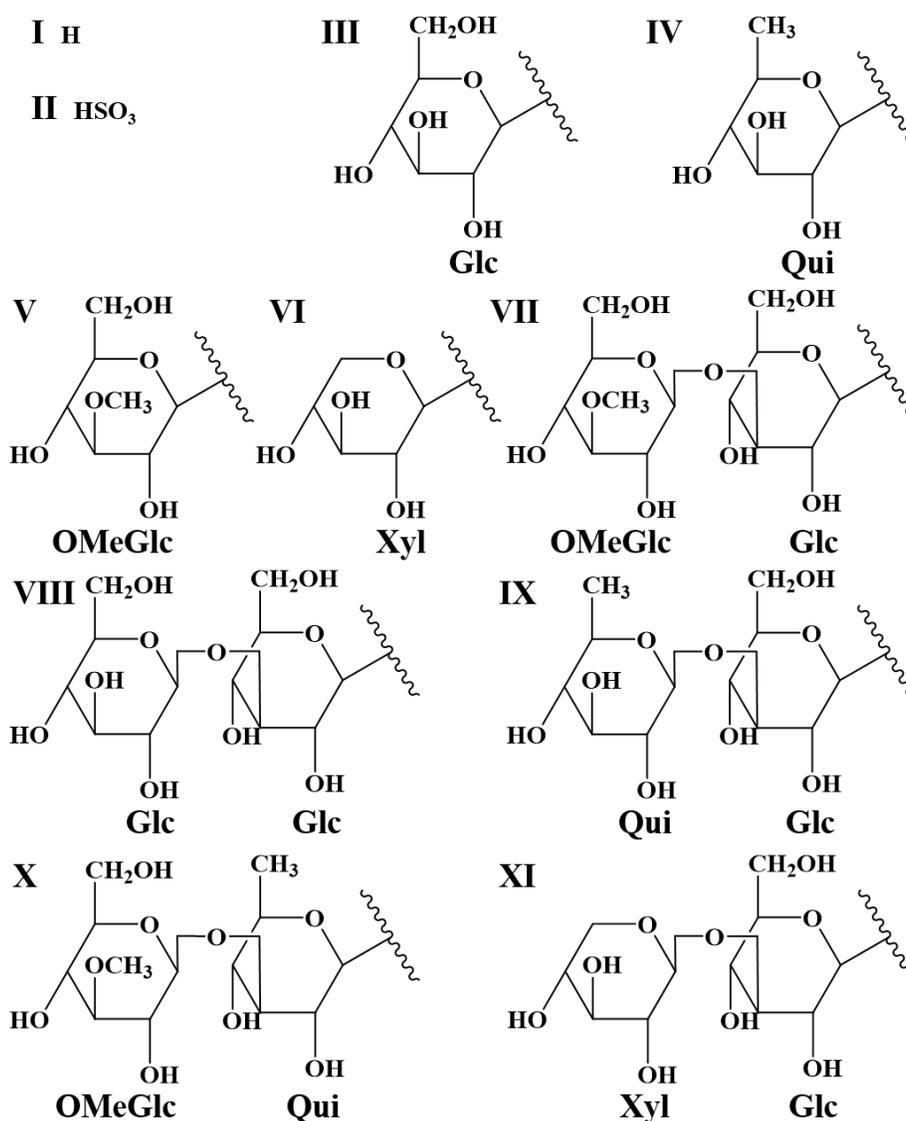


Figure 64 : Fractions glycosidiques complémentaires des saponines identifiées dans les extraits de *Holothuria algeriensis*, *Holothuria arguinensis* et *Parastichopus regalis* à trois, cinq et six unités monosaccharidiques. Les chiffres romains correspondent à ceux de la colonne « R3 » des **Tableaux 17** et **19**.

3.1.4. Discussion

Les différentes techniques de spectrométrie de masse utilisées, notamment la MALDI-MS, la MALDI-HRMS, la LC-MS et la LC-MS/MS, semblent appropriées pour l'étude des saponines dans

les extraits d'holothuries. Même si elles ne peuvent pas être aussi précises que l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour caractériser la structure des molécules, les analyses de spectrométrie de masse permettent d'abord de déterminer les compositions moléculaires, puis de détecter les différents isomères de la même composition avec, dans la plupart des cas, dans la plupart des cas, les structures chimiques hypothétiques correspondantes.

Cette étude est la deuxième qui aborde la caractérisation des triterpènes glycosidiques des espèces d'holothuries de la côte algérienne après d'étude de **Caulier-Mezali et al. (2016)** sur *Holothuria sanctori* et à notre connaissance, la première qui s'intéressent aux espèces *Holothuria algeriensis* et *H. arguinensis*.

L'analyse des extraits de saponines des deux espèces étudiées a révélé la présence de 11 compositions élémentaires chez *H. algeriensis* et 18 chez *H. arguinensis* contenant chacune plusieurs isomères et offrant plusieurs possibilités de saponines. En plus des saponines identifiées confirmées de la bibliographie qui sont au nombre de huit et six pour *H. algeriensis* et *H. arguinensis* respectivement, plusieurs m/z présentent deux ou plusieurs possibilités qui diffèrent par la partie non-glycosidique de la molécule et dont certaines sont communes entre les deux espèces au m/z 1463, 1243, 1227 et 905 $[M+Na]^+$. Cette analyse nous a permis de mettre en évidence 16 et 34 nouvelles saponines pour *H. algeriensis* et *H. arguinensis* respectivement dont quatre sont communes et retrouvés au même m/z communes cité ci-dessus. Le profil des saponines des deux espèces présente un mélange de saponines non-sulfatées et sulfatées qui sont au nombre de 4 chez *H. algeriensis* et 8 chez *H. arguinensis* et des saponines non-acétylées et acétylées.

Malgré le fait que nous n'avons pas procédé à une MS/MS/MS qui permet de déterminer la structure de l'aglycone, nous pouvons tout de même proposer certaines structures pour les nouvelles saponines. En considérant que pour les celles confirmés par la bibliographie chez les deux espèces, les aglycones dont la masse est de 484 Da correspond à la structure B1, 468 Da correspond à A1 et 452 Da à C1 et en supposant que l'holothurie ne dépense pas son coût énergétique pour produire différentes formes d'aglycones, nous pouvons trancher sur la structure des aglycones identifiés chez les deux espèces et proposer des structures finales pour certaines nouvelles saponines identifiées. Ainsi, 14 structures sont proposées dont 4 sont communes entre les deux espèces à savoir la Saponine A (= Saponine 8) (**Figure 65**), la Saponine G (= Saponine 14), la Saponine H (= Saponine 19) et la Saponine I (= Saponine 20) ; 4 sont retrouvées uniquement

chez *H. algeriensis* à savoir les Saponine E, F, M et N et 6 sont présentes uniquement chez *H. arguinensis* à savoir la Saponine 15, 16, 17, 26, 31 et 34 (**Figure 66**).

Sur cette base, nous pouvons également limiter les possibilités quand plusieurs choix de saponines s'offrent pour le même temps de rétention et ne garder que celles dont l'aglycone correspond à B1, A1 et C1 pour les masses 484, 468 et 452 respectivement. Les saponines qui s'appliquent à cette règle sont soulignées dans le **Tableau 15** et le **Tableau 16**.

D'autre part, nous pouvons également proposer des structures pour les saponines dont l'aglycone présente une possibilité unique, il s'agit des Saponines B, J1, K et K1 chez *H. algeriensis* et les Saponines 3, 7, 22 et 29 chez *H. arguinensis* (**Figure 67**).

Pour les molécules restantes qui sont au nombre de 24 et qui n'ont pas pu être identifiées, 8 présentent un aglycone non retrouvé dans la bibliographie, 6 présentent des spectres de fragmentation incohérents et 10 présentent plusieurs choix d'aglycone qui diffèrent entre eux par la position du groupe acétyle dans le cas des aglycones A13/A14/E2 et B12/F2 ou du groupe hydroxyle dans le cas des aglycones A7/B2.

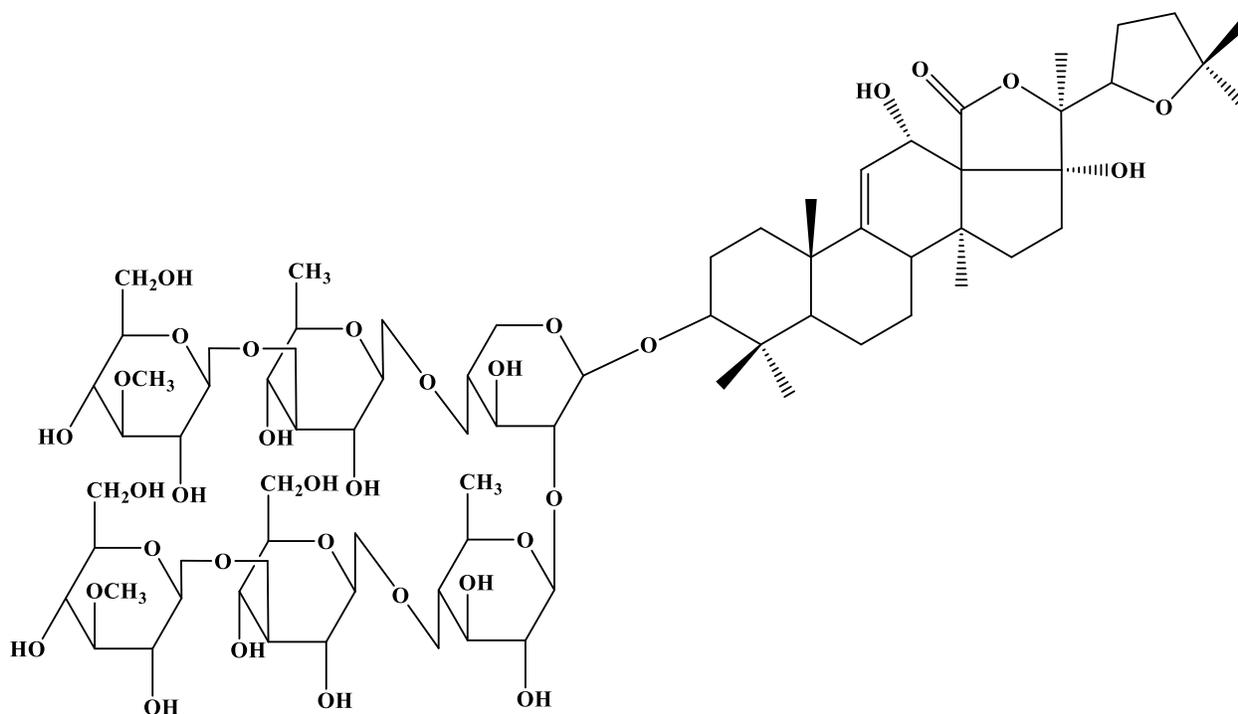


Figure 65 : Structure proposée pour la Saponine A (= Saponine 8) identifié chez *H. algeriensis* et *H. arguinensis* à la m/z 1463 $[M+H]^+$.

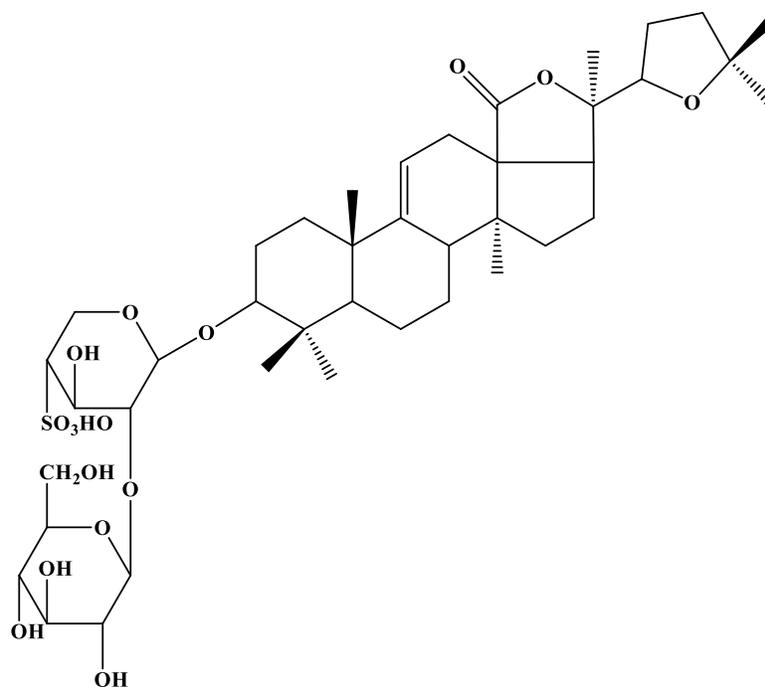


Figure 66 : Structure proposée pour la Saponine sulfatée 34 identifiée chez *H. arguinensis* à la m/z 889 $[M+H]^+$.

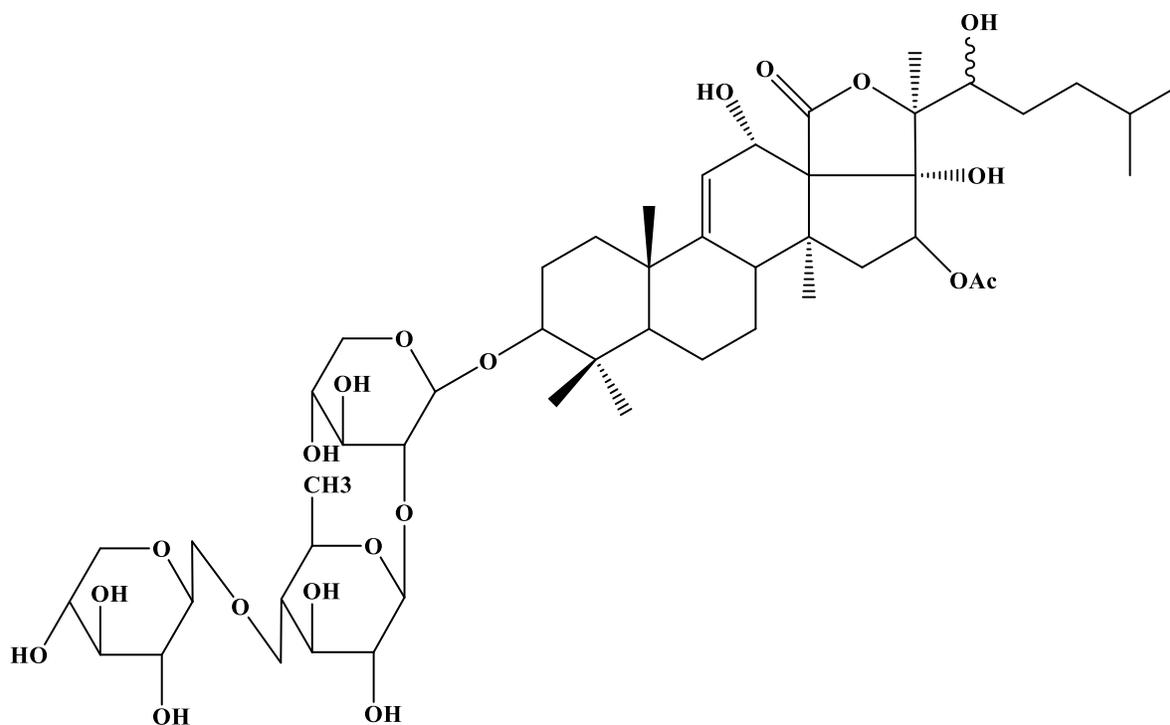


Figure 67 : Structure proposée pour la Saponine acétylée 29 identifiée chez *H. arguinensis* à la m/z 995 $[M+H]^+$.

Les individus de la même espèce ont montré des spectres similaires en termes de composition élémentaire, cependant, les intensités relatives et les proportions de chaque saponine sont différentes entre les individus. Ces proportions sont influencées par les facteurs environnementaux et les conditions dans lesquelles ont été les individus avant leur capture (stressés, en période de reproduction, ...etc.).

En comparant les saponines des espèces étudiées avec les autres représentants du genre *Holothuria* présentes sur la côte algérienne, on constate qu'elles partagent plus de saponines avec *H. sanctori* et *H. forskali* qu'avec les espèces qui leur sont proches sur le plan phylogénétique (**Van Dyck et al., 2009, 2010b, 2011 ; Caulier-Mezali et al., 2016**). En fait, elles partagent d'une part l'Holothurin A, B, B3 (uniquement chez *H. arguinensis*) et B4 avec *H. poli* (**Silchenko et al., 2005**) qui appartient au même sous genre que *H. arguinensis* et d'autre part, l'Holothurin A et B avec *H. tubulosa* (**Silchenko et al., 2005**) qui appartient au même sous genre que *H. algeriensis* et dont cette dernière a été séparée récemment (**Mezali et al., 2021b**). Cependant, cette comparaison reste dubitative car les méthodes d'analyses peuvent influencer les saponines détectées et les études sur *H. sanctori* et *H. forskali* sont plus récentes et ont utilisées les nouvelles techniques de spectrométrie de masse par rapport à celle de *H. tubulosa* et *H. poli* qui datent de 2005.

Bien que les espèces étudiées partagent un certain nombre de molécules avec les autres espèces du genre *Holothuria* présentes dans la même région, le mélange de saponines leur reste propre. En fait, en fonction de l'habitat marin et des réponses défensives des holothuries, chaque groupe contient son propre mélange de saponines qui varient au niveau de l'ordre ou de la famille les rendant souvent des signatures chimiques uniques (**Kalinin et al., 2008 ; Caulier et al., 2013 ; Caulier-Mezali et al., 2016 ; Kamyab et al., 2020**). Ainsi, les saponines représentent des marqueurs chimiotaxonomiques potentiels des holothuries et des modèles fiables pour étudier leur évolution biochimique (**Kalinin et al., 2014**). Cette dernière s'effectue dans les deux fragments des saponines à savoir le glycone et l'aglycone (**Kalinin et al., 2016**). La tendance générale de l'évolution des glycones chez les holothuries dépend de la présence, absence, nombre et position des groupes sulfates, du type des unités de sucre et de leur structure ainsi que la position du groupe méthyle (**Kalinin et al., 2016 ; Kamyab et al., 2020**) tandis que celles des aglycones, elle est plus compliquée et dépend de la présence/ absence de groupes lactone, céto, hydroxyle ainsi que la position des doubles liaisons ce qui conduit des composés peu oxydés à des composés plus oxydés

(**Kalinin et al., 2014 ; Kamyab et al., 2020**). La fiabilité de la chimiotaxonomie est dû au contrôle indépendant des différentes caractéristiques structurelles des glycosides par un complexe de gènes qui sont absolument indépendants les uns des autres (**Kalinin et al., 2014**).

La grande diversité des saponines chez les holothuries est liée aux fonctions écologiques, la plus importante étant la défense chimique (**Kalinin et al., 2000 ; Van Dyck et al., 2011 ; Bondoc et al., 2013 ; Bahrami, 2015 ; Caulier-Mezali et al., 2016**). La diversité et la concentration des glycosides triterpéniques des holothuries sont affectées lorsque ces derniers présentent des « tubes de Cuvier » dans leur organisme (**Van Dyck et al., 2010a ; Honey-Escandón et al., 2015, Caulier-Mezali et al., 2016**). En fait, parmi les Holothuriidae, le genre *Bohadschia* qui contient des « tubes de Cuvier » bien développé avec une expulsabilité et un caractère collant possède des glycosides non sulfatés et moins oxydés à la fois dans les « tubes de Cuvier » et la paroi du corps (**Kalinin et al., 1996, 2008 ; Honey -Escandon et al., 2015 ; Kamyab et al., 2020**). Cependant, plus de glycosides sulfatés et oxydés ont été signalés chez des espèces sans ou avec des « tubes de Cuvier » dysfonctionnels (**Honey-Escandón et al., 2015**).

Outre leurs larges fonctions écologiques, les glycosides triterpéniques présentent différentes activités biologiques qui pourraient contribuer à la probabilité de survie des organismes qui les produisent (**Kamyab et al., 2020**). Selon le groupe taxinomique des holothuries, le nombre, la composition et l'emplacement des unités monosaccharidiques ainsi que la position des groupes fonctionnels dans le squelette de l'holostane (c'est-à-dire hydroxyle, acétyle, doubles liaisons, etc.) peuvent affecter la bioactivité des composés (**Stonik, 1986 ; Kalinin et al., 2000**). Les forces motivationnelles de l'évolution comprennent une optimisation de la biosynthèse, une diminution du coût métabolique, une augmentation de l'action membranolytique (toxicité) ...etc. (**Kalinin et Stonik, 1996**). En effet, L'absence des « tubes de Cuvier » qui est compensée par la présence de saponines sulfatées chez les espèces évoluées est expliqué par la fonction biologique de la fonction sulfates qui rend la saponine toxique. Il a été démontré que le groupe sulfates des saponines joue un rôle crucial dans l'activité membranolytique des saponines de *H. scabra* et que les saponines désulfatées restent inactives même à des concentrations très élevées (**Savarino et al., 2022**). Parmi les saponines identifiées chez *H. algeriensis* et *H. arguinensis*, l'Holothurinoside C, E1 et la Désholothurin A présente une activité hémolytique (**Van Dyck et al., 2010b**).

La cartographie des congénères de saponines connues selon qu'ils soient purement non-sulfatés, sulfatés ou mélangés sur un arbre phylogénétique des espèces du genre *Holothuria* a révélé que les espèces à saponines purement non-sulfatés tels que *H. forskali* et *H. sanctori* étaient basales par rapport à celle contenant des congénères purement sulfatés ou mixtes (**Bondoc et al., 2013**). Sur l'arbre généré, *H. arguinensis* était positionné dans le même groupe que *H. tubulosa* et *H. poli* qui présentent des saponines purement sulfatées. La présente étude apporte des données complémentaires en élucidant les saponines de *H. arguinensis* et *H. algeriensis* [ne figure pas sur l'arbre vu qu'elle a été décrite récemment mais les études ont montré qu'elle est proche sur le plan génétique de *H. tubulosa* (**Mezali et al., 2021b**)] et montre que ces deux espèces ne présentent pas uniquement des saponines sulfatées mais plutôt un mélange des deux. Cependant, étant donné que le profil des saponines de *H. tubulosa* et *H. poli* n'est pas récent, une nouvelle analyse pourrait trancher et apporter des éléments de réponse sur la présence de ces espèces au sein du même groupe.

3.2. Caractérisation des saponines de *Parastichopus regalis*

3.2.1. Profil générale des saponines dans les extraits analysés

La caractérisation des saponines de *Parastichopus regalis* a été réalisée en deux temps. La première partie a été effectuée en Mars 2020 sur 18 individus et la deuxième analyse a été faite sur neuf individus en Septembre 2022.

L'analyse des spectres dans la gamme m/z 850–1550 a révélé la présence de 18 ions correspondant potentiellement à des saponines chez uniquement deux individus analysés en Mars 2020 (Individu 1 et 2), cependant, les spectres obtenus en Septembre 2022 ont révélé uniquement 3 saponines chez un individu (Individu 3) et une seule chez deux autres. La **Figure 68** présente trois spectres obtenus par l'analyse MALDI-MS pour les deux individus analysés en Mars 2020 et un des individus analysés en Septembre 2022.

Les individus 1 et 2 montrent des spectres MALDI-MS similaires avec des pics détectés aux mêmes m/z mais avec des intensités relatives différentes. Les trois ions détectés chez l'individu 3 et qui correspondent aux m/z 1227, 1243 et 1271 sont communes avec les deux précédents. Les

ions majoritaires ne sont pas les mêmes chez les trois individus et correspondent aux ions m/z 905, 1141 et 1227 chez les individus 1, 2 et 3 respectivement.

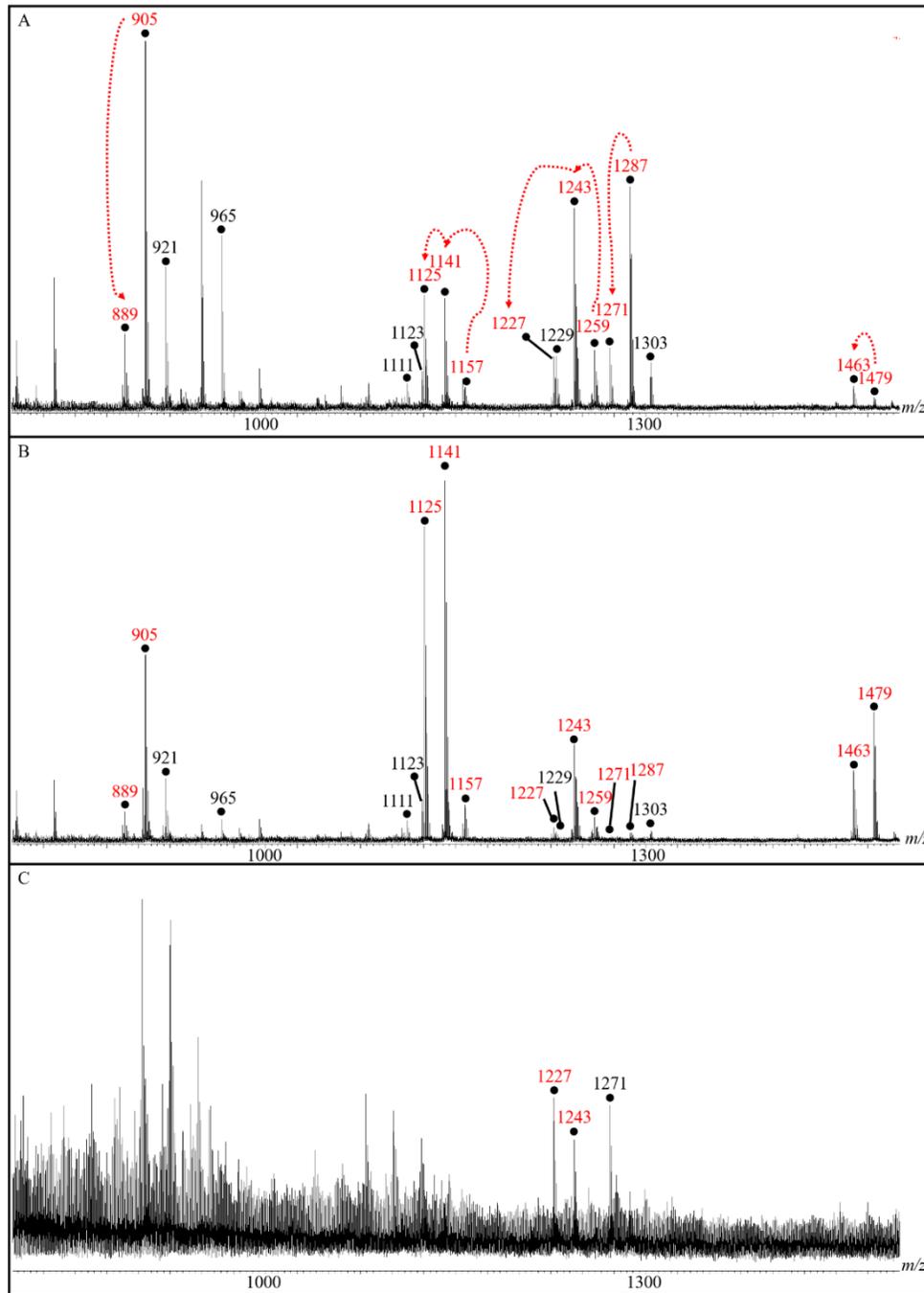


Figure 68 : Spectres MALDI-MS (+) du mélange total des saponines des extraits du tégument de trois individus de *Parastichopus regalis*. **A.** Individu 1. **B.** Individu 2. **C.** Individu 3. Les signaux des saponines sont mis en évidence par des points noirs sur lesquelles sont notées les m/z $[M+Na]^+$. Les m/z écrites en rouge correspondent aux cinq groupes dont la différence de masse entre ses représentants est de 16 Da.

Les ions sont également associés à deux ou à trois pour former cinq groupes (notés dans le spectre en rouge) et dont les signaux diffèrent entre eux par une masse de 16 Da. Les groupes sont constitués des ions m/z 1479 et 1463 ; 1287 et 1271 ; 1257, 1243 et 1227 ; 1157, 1141 et 1125 ; 905 et 889 pour les cinq groupes respectivement. Les compositions élémentaires des ions saponine sur la base d'une mesure de masse précise (MALDI-HRMS (+)) ont été confirmées uniquement pour les trois ions observés chez l'individu 3. Cette analyse révèle que *P. regalis* possède deux saponines sulfatées à 4 sucres (m/z 1227–1243) et une saponine non sulfatée à 6 sucres (m/z 1271) (**Tableau 18**).

3.2.2. Détection des isomères des saponines identifiées par LC-MS

L'analyse LC-MS a été réalisée sur l'individu 3 pour déterminer l'éventuelle présence des isomères pour les m/z détectés. Les résultats (**Tableau 18**) montrent que ces derniers présentent entre deux et cinq isomères. Au total, 11 isomères de saponines ont été détectés avec des proportions molaires différentes, les plus importants sont observés au m/z 1181 $[M+H]^+$ à 7,56 min suivis de deux observés à la m/z 1165 à 10,8 et 11,3 min.

Tableau 18 : Extrait de *Parastichopus regalis* : données recueillies par les méthodes basées sur la spectrométrie de masse. Les compositions élémentaires et les mesures d'erreur de mass (Δ) ont été déterminées par MALDI-HRMS. PMI (%) = Proportion molaire des isomères. Les noms des saponines ont été attribués selon les résultats de la LC-MS/MS. Le gras dans la colonne saponine indique les nouvelles saponines identifiées dans la présente étude.

<i>m/z</i> (Δ ppm) [M+Na] ⁺	Saponine	<i>m/z</i> [M+H] ⁺	Composition élémentaire	Temps de rétention (min)	PMI (%) individu 3
1271 (3,4)	Saponine Ar	1249,7201	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₇	7,4	1,09
	Cousteside H			8,9	1,84
	Saponine Ar			9,7	2,95
	Cousteside H			10,1	2,66
1243 (2,6)	Saponine Br	1181,4128	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	7,4	3,94
	Holothurin A/ Scabraside B/ 25-hydroxyfuscocineroside B			7,6	63,69
1227 (1,7)	Saponine Cr	1165,5151	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	7,6	1,48
	24-Dehydroechinoside A/ Scabraside A/ Fuscocineroside B/ 17-dehydroxyholothurin A			7,9	1,65
	24-Dehydroechinoside A/ Scabraside A/ Fuscocineroside B/ 17-dehydroxyholothurin A			10,1	1,72
	24-Dehydroechinoside A/ Scabraside A/ Fuscocineroside B/ 17-dehydroxyholothurin A			10,8	13,02
	Saponine Dr			11,3	5,97

3.2.3. Caractérisation de la structure moléculaire des saponines par LC-MS/MS

L'analyse LC-MS/MS a été réalisée sur les trois ions *m/z* identifiées pour l'individu 3 par MALDI-MS chez *P. regalis*. Au total, 12 structures de saponines ont été identifiées dont quatre sont nouvelles qu'on nomme de « Saponine Ar » à « Saponine Dr ». Comme c'est le cas pour les espèces du genre *Holothuria* étudiés ci-dessus, les structures reconstituées à certains temps de rétention correspondaient à plusieurs saponines reportées dans la bibliographie et dont la différence entre eux se trouve au niveau de l'aglycone. Parmi les structures identifiées, une seule représente une possibilité unique, il s'agit de la Cousteside H identifiée à la *m/z* 1271 [M+Na]⁺.

Excepté la Saponine Ar, les autres nouvelles saponines identifiées à savoir la Saponine Br, Saponine Cr et Saponine Dr correspondent en réalité à la Saponine G (= Saponine 14), Saponine H (= Saponine 19) et Saponine I (= Saponine 20) identifiée chez *H. algeriensis* et *H. arguinensis*.

La **Figure 69** présente les schémas de fragmentation de deux saponines retrouvées aux ions m/z 1249 et 1165 $[M+H]^+$. La première (**Figure 69A**) correspond à la Saponine Ar et à partir de l'ion parent, les pertes de quatre sucres [MeGlu-Qui-Glu-Qui] se succèdent jusqu'à l'ion qui correspond à l'aglycone à m/z 469. La **Figure 69B** représente le schéma de fragmentation de la Saponine Dr (= Saponine I ou 20) qui est sulfatés. Tout d'abord, l'ion parent perd trois sucres [MeGlu-Glu-Glu] ensuite, étant donné que le sulfate est attaché au Xylose, il est perdu avant ce dernier sucre et cette perte est définie par une différence de 80 Da. Après cela, l'aglycone qui possède une masse de 452 Da, apparaît au pic m/z 453.

Le **Tableau 19** présente les propriétés structurales des saponines identifiées chez *P. regalis*. Comme c'était le cas pour les deux espèces d'*Holothuria* étudiées, il s'avère impossible de déterminer avec exactitude la structure de l'aglycone, raison pour laquelle nous citons l'ensemble des propositions de saponine et d'aglycone pour les nouvelles. Vu le nombre faible de saponines identifiées, nous ne pouvons pas trancher sur la structure des aglycones et nous supposons que les saponines communes avec les autres espèces présentent la même structure.

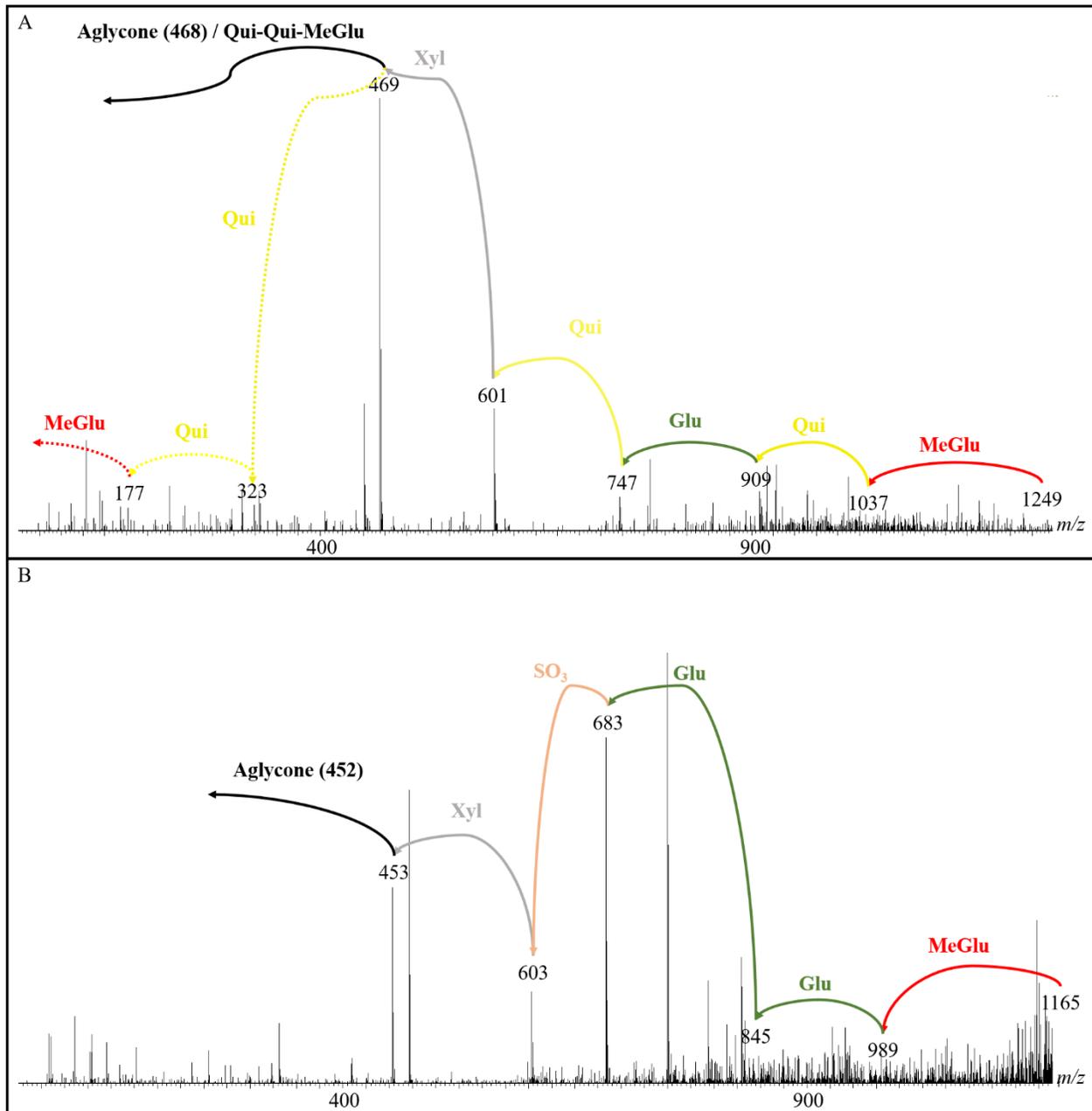


Figure 69: Analyse LC-MS/MS des ions provenant du mélange de saponines de l'individu 3 de *Parastichopus regalis*. **A.** Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine Ar (m/z 1249) au temps de rétention 9,7 min. **B.** Spectre de masse LC-MS/MS de la Saponine Dr (m/z 1165) au temps de rétention 11,3 min.

Tableau 19: Propriétés structurales des saponines identifiées chez *Parastichopus regalis*. Les lettres et les chiffres dans les colonnes Aglycone-R1, R2 et R3 correspondants aux sous-structures indiquées dans les **Figures 62, 63 et 64** respectivement. Le gras dans la colonne « Saponine » indique les nouvelles structures.

Saponine	Formule moléculaire	Aglycone	R2	R3	Masse nominale	<i>m/z</i> [M+Na] ⁺
Cousteside H	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₇	A5	f	III	1248	1271
Saponine Ar		A1/A9/A11/B4/B5/D1	f	IV		
25-hydroxyfuscocineroside B	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₇ S	A10	f	II	1198	1243
Holothurin A		B1	f	II		
Saponine Br (= Saponine G, Saponine 14)		A1/A9/A11/B4/B5/D1	g	II		
Scabraside B (= 17-hydroxyfuscocineroside B)		B9	f	II		
17-dehydroxyholothurin A (Fuscocineroside C)	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₆ S	A1	f	II	1182	1227
24-Dehydroechinoside A		B4	f	II		
Fuscocineroside B		A9	f	II		
Saponine Cr (= Saponine H, Saponine 19)		A10/B9/B11/B1	h	II		
Saponine Dr (=Saponine I, Saponine 20)		A4/A5/C1	g	II		
Scabraside A		B5	f	II		

Etant donnée que nous n'avons pas pu réaliser l'analyse LC-MS et LC-MS/MS sur les saponines présentes chez l'individu 1 et 2 et qui présentent un profil plus complet des saponines qui peuvent se trouver chez *P. regalis*, nous avons tenté de les identifier par une recherche bibliographique sur la base de leur *m/z*. Le **Tableau 20** présente un résumé des saponines qui pourraient correspondre aux 15 autres *m/z* détectées chez les individus 1 et 2 de *P. regalis* avec leur composition élémentaire ainsi que les genres d'holothurie où elles ont été retrouvées.

Parmi les *m/z* identifiées, certaines correspondent à une seule saponine déjà mise en évidence telle que l'holothurin A2 (*m/z* 1229) et l'Holothurinoside J (*m/z* 1157). D'autres *m/z* peuvent correspondre à un des isomères d'une même composition élémentaire telle que les Holothurinoside I/I1, H/H1, A/A1, E/E1 et C/C1 aux *m/z* 1479, 1463, 1303, 1287 et 1125 respectivement. Tandis que les *m/z* 1259 et 1123, plusieurs possibilités de saponines à même ou à différentes compositions élémentaires peuvent leur correspondre.

La plupart des espèces où ont été identifiées les saponines qui pourraient correspondre aux m/z détectées chez *P. regalis* appartiennent à l'ordre des Holothuriida représenté par les genres *Actinopyga*, *Bohadschia*, *Holothuria*, *Pearsonothuria*, *Cucumaria*, *Pentacta* et *Eupentacta*. Toutefois, cinq saponines ont également ou uniquement été identifiées chez quelques espèces de la famille des Stichopodidae comme suit ; l'Holothurin B/B4 chez *Stichopus chloronotus* (**Thao et al., 2014**), le Composé 1 et la Thelenotoside A chez *Thelenota ananas* (**Hegde et al., 2002**), l'Holothurin A2 chez *Apostichopus japonicus* (**Dai et al., 2020**) et la Variegatuside D chez *Stichopus variegatus* (**Wang et al., 2014**).

La composition élémentaire des saponines qui pourraient correspondre aux m/z détectés chez *P. regalis* est indiquée dans le **Tableau 20**. Nous retrouvons des saponines sulfatées et non-sulfatées avec deux (m/z 889–921), trois (m/z 965), quatre (m/z 1111–1259), cinq (m/z 1259–1303) ou six (m/z 1463–1479) unités de sucre. La m/z 1259 revient deux fois vu qu'elle peut correspondre à deux saponines, l'Holothurin A3 avec quatre unités de sucre ou la Variegatuside D avec 5 unités de sucres.

Cette comparaison reste à prendre avec précaution car les saponines qui sont présentes chez *P. regalis* pourraient ne pas être les mêmes que celles citées dans le tableau. La différence pourrait se présenter soit sous forme de différents isomères pour la même composition élémentaire, soit sous forme de différentes compositions élémentaires et par conséquent, différentes structures.

Tableau 20: Saponines qui pourraient correspondre aux m/z détectés chez les individus 1 et 2 de *Parastichopus regalis*.

$[M + Na]^+$ m/z	Saponine	Composition élémentaire	Genre	Références
1479	Holothurinoside I/I1	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₄	<i>Bohaschia, Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2009, 2010a, b, 2011) ; Bahrami (2015)
1463	Holothurinoside H/H1	C ₆₇ H ₁₀₈ O ₃₃	<i>Bohaschia, Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2009, 2010a, 2010b) ; Bondoc <i>et al.</i> (2013) ; Caulier <i>et al.</i> (2013) ; Eeckhaut <i>et al.</i> (2015)
1303	Holothurinoside A/ A1	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₉	<i>Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2009, 2010a, 2011)
1287	Holothurinoside E/E1	C ₆₀ H ₉₆ O ₂₈	<i>Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2009, 2010a, 2011) ; Bahrami <i>et al.</i> (2014)
1259	Holothurin A3	C ₅₄ H ₈₅ NaO ₂₈ S	<i>Holothuria</i>	Dang <i>et al.</i> (2007)
	Variegatuside D	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₇	<i>Stichopus</i>	Wang <i>et al.</i> (2014)
1229	Holothurin A2 (Echinoside A)	C ₅₄ H ₈₇ NaO ₂₆ S	<i>Apostichopus, Holothuria, Pearsonothruia</i>	Caulier <i>et al.</i> (2013) ; Van Dyck <i>et al.</i> (2010b) ; Dai <i>et al.</i> (2020)
1157	Holothurinoside J1	C ₅₄ H ₁₀₉ O ₂₅	<i>Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2010b) ; Bahrami (2015)
1141	Desholothurin A (Nobiliside 2a)/ A1 (Arguside E)	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₄	<i>Actinopyga, Bohaschia, Holothuria, Pearsonothuria</i>	Kitagawa <i>et al.</i> (1982) ; Van Dyck <i>et al.</i> (2011b) ; Elbandy <i>et al.</i> (2014)
1125	Holothurinoside C/C1	C ₅₄ H ₈₆ O ₂₃	<i>Holothuria, Pearsonothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2010b) ; Caulier-Mezali <i>et al.</i> (2016)
1123	Lefevreioside A1	C ₅₅ H ₈₈ O ₂₂	<i>Cucumaria</i>	Rodriguez et Riguera (1990)
	Cucumarioside A12	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₃	<i>Eupentacta</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2012)
	Sans nom 1	C ₅₄ H ₈₄ O ₂₃	<i>Holothuria</i>	Bahrami (2015)
	Cucumarioside A15	C ₅₅ H ₈₈ O ₂₂	<i>Eupentacta</i>	Silchenko <i>et al.</i> (2012)
	Thelenotoside A	C ₅₅ H ₈₈ O ₂₂	<i>Thelenota</i>	Mal'tsev <i>et al.</i> (1985)
1111	Bivittoside B	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₂	<i>Bohaschia, Holothuria</i>	Bondoc <i>et al.</i> (2013) ; Caulier <i>et al.</i> (2013)
956	Composé 1	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉	<i>Thelenota</i>	Hegde <i>et al.</i> (2002)
921	Leucospilotaside A	C ₄₁ H ₆₃ NaO ₁₈ S	<i>Holothuria</i>	Han <i>et al.</i> (2009)
905	Holothurin B/B4	C ₄₁ H ₆₃ NaO ₁₇ S	<i>Actinopyga, Bohaschia, Holothuria, Pearsonothuria, Stichopus</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2010b) ; Thao <i>et al.</i> (2014)
889	Holothurin B3	C ₄₁ H ₆₃ NaO ₁₆ S	<i>Actinopyga, Holothuria</i>	Van Dyck <i>et al.</i> (2010b) ; Yu <i>et al.</i> (2015)

3.2.4. Discussion

La caractérisation des saponines par les techniques de la spectrométrie de masse a été effectuée sur 27 individus de *Parastichopus regalis* et ce, en deux périodes différentes. La majorité des extraits de *P. regalis* analysés (à savoir 22) ont montré un spectre MALDI ne présentant pas des pics qui pourrait correspondre à des saponines. L'absence de ces molécules pourrait être expliquée par plusieurs hypothèses ; 1) la première est la méthode de conservation des échantillons surtout que la plupart des individus qui ont montré un spectre avec des saponines ont été congelés puis lyophilisés ; 2) la deuxième est que les saponines soient perdues dans les autres fractions éliminées lors de l'extraction à savoir le n-hexane, le dichlorométhane, le chloroforme ou l'eau MQ, cependant, cette théorie a été vérifiée et les spectres de ces derniers ne présentent pas des m/z qui pourrait correspondre à des saponines ; 3) la troisième suppose que les individus étudiés ont relâché leurs saponines dans l'environnement pour une quelconque raison et la plus évidente étant le stress suite à l'activité de pêche, malheureusement, cela n'a pas pu être vérifiée étant donné que l'eau dans lequel ont été gardés les individus n'a pas été récupérée et analysée. De plus, il se pourrait que les saponines aient été relâchées sous l'eau de mer lors de la pêche surtout que ce sont des espèces provenant de grande profondeur (plus de 48 m) (**Tableau 21**) et ces derniers rencontrent des conditions physico-chimiques différentes de celles des faibles profondeurs. Ces conditions comprennent une forte pression hydrostatique, une basse température et éventuellement une pénurie d'oxygène, ce qui pourrait affecter la formation, la structure, la régulation des gènes et la biosynthèse des métabolites secondaires (**Kamyab et al., 2020**).

Tableau 21: Information d'échantillonnage des individus de *Parastichopus regalis* analysés

Méthode d'échantillonnage/ Conservation	Région	P (m)	Extraits analysés	Extrait avec des spectres de saponines
Campagne océanographique/ Dans l'éthanol 96%	Mostaganem (16)	68	2	0
	Arzew (17)	77	2	0
	Bouzedjar (18)	96	1	0
	Ghazaouet (22)	113	2	0
	Béni-Saf (20)	125	1	0
	Mostaganem (14)	225	4	1 (Janvier 2020)
Chalutiers professionnels/ Congelés	Cherchell (23)	-	5	1 (Janvier 2020)
	Bahara Mostaganem (24)	73	7	1 (Septembre 2022)
	Kharrouba 2 Mostaganem (25)	60	1	0
	Kharrouba 1 Mostaganem (26)	48	2	2 (Septembre 2022)

Sur les cinq individus présentant des saponines, les deux qui montrent un profil complet ont été analysés en Mars 2020, cependant, la suite des analyses LC-MS et LC-MS/MS n'a pas été effectué sur le champ et les extraits ont été conservés à -4 °C pour les traiter ultérieurement. En analysant une deuxième fois les échantillons en Septembre 2022, il s'est avéré que les saponines se sont dégradées et les spectres ne montraient aucun signal correspondant à ces derniers. De ce fait, et en tenant compte de l'absence des saponines dans la plupart des individus étudiés, on suppose que les saponines de *P. regalis* sont très fragiles et se dégradent rapidement par rapport aux autres espèces d'*Holothuria* surtout que les échantillons de *Holothuria arguinensis* étudiés ci-dessus ont été analysés de la même façon et après 2 ans et demi, les saponines ne se sont pas dégradées.

Les données concernant les structures chimiques et la distribution taxinomique des glycosides triterpéniques ont été utilisées pour résoudre plusieurs problèmes de taxinomie des holothuries notamment dans la famille des Stichopodidae (**Kalinin et al., 2014**). La réalisation récente la plus importante est l'utilisation de ces structures dans la reclassification de l'holothurie néo-zélandaise *Stichopus mollis*. En réalité, les représentants de la famille des Stichopodidae ont de manière caractéristique des hexosides non sulfatés comme composants majeurs dans les fractions glycosidiques tandis que le composant majeur chez *Stichopus mollis* est la Neothyonidioside ayant quatre sucres et un groupe sulfate, significativement différent des glycosides triterpéniques de *Stichopus chloronotus*, espèce type du genre *Stichopus* et de tous les autres représentants de la famille Stichopodidae étudiés jusqu'à présent (**Moraes et al., 2004 ; Kalinin et al., 2005**). En combinant cela avec l'aspect morphologique différent de l'espèce, elle a été séparée en un nouveau genre *Australostichopus* (**Moraes et al., 2004**).

Auparavant, et par une comparaison des caractéristiques morphologiques et des structures des glycosides triterpéniques, les espèces *Apostichopus japonicus* et *Apostichopus californicus* ont été séparées du genre *Stichopus* (**Levin, 1986**). En fait, les deux premières espèces sont caractérisées par les holotoxines qui sont dérivés d'holostane ayant une double liaison 9(11) et un groupe 16-oxo tandis que les genres *Stichopus* et *Thelenota*, présentent les Stichoposides et les Thélenotosides dont l'aglycone est dérivé d'holostane ayant une double liaison 7(8) et un groupe 23-O-acétyle. Ces résultats ont été validés par la suite par une analyse comparative de l'ADN mitochondrial COI et 16S (**Byrne et al., 2010**). Cette dernière a également révélé que l'espèce

Australostichopus mollis est dans un groupe frère des espèces *Apostichopus japonicus* et *Apostichopus californicus*. Ceci est corrélé aux données chimiques en raison de l'identité des aglycones de l'holotoxine A1 de *A. japonicus*, *A. californicus* et *A. parvimensis*, et de l'aglycone de la Neothyonidioside de *Australostichopus mollis* (Levin, 1986 ; Iñiguez-Martinez *et al.*, 2005).

A ce stade de l'étude, il est intéressant d'étudier le mélange des saponines de l'espèce *Parastichopus tremulus*, l'espèce type et la seule autre représentante de ce genre pour comparer les deux compositions. Par la suite, il est intéressant de procéder à une cartographie du caractère présence/absence des saponines sulfatés sur un arbre phylogénétique de la famille des Stichopodidae [comme l'a été réalisée pour le genre *Holothuria* par Bondonc *et al.* (2013)] pour étudier l'évolution des saponines au sein de cette famille.

Comme chaque méthode, l'utilisation de ces structures à des fins taxinomique présente un problème qui est leur évolution parallèle dans les différents taxons d'holothuries ce qui peut conduire à une similitude des structures de saponines dans des taxons éloignés et aboutir (rarement) à une ressemblance totale des structures (Kalinin *et al.*, 1990). De plus, Il existe également des variations saisonnières dans le contenu des différents composants des fractions glycosidiques qui peuvent également entraîner des conclusions taxinomiques incorrectes, ainsi, toutes les conclusions taxinomiques doivent être basées sur un ensemble de données chimiques, morphologiques et moléculaires (Kalinin *et al.*, 2014).

Discussion générale

Lors de cette étude, nous avons échantillonné une seule espèce appartenant à la famille des Stichopodidae sur la côte algérienne à savoir *Parastichopus regalis*. Cette dernière présente deux morphotypes qui diffèrent uniquement par la coloration de la face dorsale. *Parastichopus tremulus* est l'unique autre représentante et l'espèce type du genre *Parastichopus*. Sur le plan morphologique, elle ressemble légèrement à *P. regalis*, en fait, elle présente un corps plutôt cylindrique et une coloration rouge-orange et de petites taches sombres réparties uniformément le long du corps (**Schagerström et Sundell, 2021**). La différence entre les deux espèces réside au niveau endosquelettique où sont observées des tables avec des bords épineux chez *P. tremulus* et des bords lisses chez *P. regalis*.

Parastichopus tremulus est à la base retrouvée en Atlantique Nord-Est mais son aire de répartition a changé et elle s'est introduite en méditerranée où elle a été signalée en 2019 (**Ordines et al., 2019**). Son apparition sur les côtes algériennes est fort probable dans les années à venir comme c'était le cas de l'espèce *H. arguinensis* qui a été signalé sur les côtes espagnoles en 2012 puis sur les côtes algériennes en 2014 (**González-Wangüemert et Borrero-Perez, 2012 ; Mezali et Thandar, 2014**). Ainsi, cette éventuelle introduction doit être surveillée et prise en considération surtout si les autorités du secteur de pêche souhaitent lancer l'exploitation de l'espèce *P. regalis*. La distinction entre les deux espèces s'avère indispensable pour leurs gestions respectives.

Le profil nutritionnel de *P. regalis* et celui des espèces du genre *Holothuria* les rend propres à la consommation humaine et leurs téguments sont autant digérés par la pepsine que les viandes couramment consommées. Malheureusement, en Algérie, les holothuries en général ne font pas partie des traditions culinaires de la population algérienne, cependant, suite à un questionnaire en ligne établie par **Mezali et al. (2021a)** où plusieurs plats à base d'holothurie ont été proposés à une population d'environ 500 personnes tout en les sensibilisant sur les bienfaits de ces espèces, les répondants ont confirmé leur aptitude à les introduire dans leur alimentation s'ils les trouvent disponibles sur le marché. Par la suite, une petite séance de dégustation des plats préparés à base d'holothuries a été réalisée et ces derniers ont été très appréciés (**Belkacem et Mezali, 2022**). En considérant l'ensemble de ces éléments, il serait donc intéressant de proposer les espèces d'holothuries sur les marchés locaux sous forme de « bêche-de-mer » ou de plats préparés pour faire profiter la population algérienne de leurs bienfaits nutritionnels et médicinaux.

La pêche illicite des holothuries destinées à l'exportation a débuté il y a quelques années ciblant majoritairement les espèces du genre *Holothuria* et elle va probablement inclure l'espèce *Parastichopus regalis* dans peu de temps vu sa valeur économique élevée. Bien que cette exploitation reste bénéfique sur le plan économique, il est important que sa gestion soit prise en charge par les responsables du secteur de la pêche et un plan d'action doit être élaboré dans le but de protéger cette ressource en l'exploitant raisonnablement et éviter qu'elle soit surexploitée.

Un plan d'action pour la gestion des pêcheries des holothuries au niveau mondial a été proposé par **Conand (2004)** et il comprend principalement quatre niveaux ;

- Niveau de la ressource : qui nécessite une bonne documentation biologique (traits de vie, recrutement, croissance, mortalité... etc) et écologie des espèces commerciales ;
- Niveau des pêcheurs : qui exige une réglementation de la pêche en se basant sur des paramètres biologiques pour limiter les captures par l'établissement de permis de pêche, des périodes de fermeture, d'un système de quota et/ou de rotation de zone ;
- Niveau des transformateurs : qui implique une amélioration des procédures de collecte et de traitement et une assurance d'une bonne transformation pour la rentabilité et la viabilité de l'industrie ;
- Niveau des services de la pêche : qui ont pour rôle d'améliorer et de normaliser les statistiques de captures aux niveaux national et international.

En Algérie, plusieurs recherches sur les holothuries ont été effectuées et certaines sont en cours de réalisation. Bien qu'elles n'englobent pas l'ensemble des régions et des espèces, elles constituent tout de même une base donnée sur laquelle les chargés du secteur peuvent s'appuyer pour établir certaines mesures de gestion qui pourront d'une part relâcher la pression exercée sur les stocks des holothuries actuellement exploitée et d'autre part, lancer et accompagner les nouvelles pêcheries.

L'autorisation de la pêche des holothuries pour leur proposition sur le marché pour la consommation humaine doit prendre en considération la qualité environnementale du milieu étant donné que les holothuries accumulent les métaux lourds et certaines espèces sont même recommandées pour leur utilisation comme bio-indicateurs (**Bat et al., 2020 ; Marrugo-Negrete et al., 2020**).

Finalement, malgré le fait que les mesures de gestion pourront contribuer à la durabilité des stocks, le meilleur moyen de profiter de cette ressource est de maîtriser sa reproduction artificielle pour lancer son aquaculture monospécifique ou multitrophique intégrée. Cette dernière a également un autre avantage qui est de minimiser la pollution en mer générée par les fermes piscicoles.

Conclusion et perspectives

Le présent travail avait pour but de contribuer à l'étude éco-biologique et biochimique de trois espèces d'holothuries dont les recherches sont peu nombreuses surtout sur la côte algérienne. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'espèce *Parastichopus regalis* en étudiant sa systématique, sa croissance relative, son endosymbiote, la composition approximative de son tégument et la digestibilité de ce dernier par la pepsine. Par la suite, nous avons exploré le mélange en saponines de *P. regalis*, *Holothuria arguinensis* et *Holothuria algeriensis*.

L'espèce *P. regalis* présente deux morphotypes, l'un pourvu de taches sombre au niveau de la face dorsale et l'autre dépourvue de celle-ci. La comparaison morphologique et anatomique (y compris endosquelettique) n'a pas révélé de différence entre les deux morphotypes, les deux présentent une seule vésicule de Poli, un seul canal de pierre avec une madréporite sphérique et des muscles longitudinaux fins aux extrémités antérieures où ils s'insèrent à l'anneau calcaire. L'analyse statistique du diamètre et de la surface de la forme de sclérites la plus abondante qui est la table, a montré des différences significatives entre les individus, cependant, cette dernière n'est pas liée au polymorphisme de cette espèce. L'une des hypothèses émises pour expliquer ce phénomène est l'influence des facteurs environnementaux et plus précisément la lumière. Pour confirmer cette hypothèse, des études doivent être effectuées en exposant les spécimens à la lumière tout contrôlant son intensité et le temps d'exposition afin de déterminer le comportement des individus vis-à-vis de ce facteur.

Les individus de *P. regalis* de la côte Ouest algérienne présentent une relation taille-poids de $W=0,429L^{1,784}$. En utilisant l'indice SLW qui prend en considération la longueur et la largeur des individus pour calculer une nouvelle valeur de longueur qu'on appelle longueur estimée, la relation taille-poids devient $W=0,371Le^{1,836}$. Cette méthode permet d'éliminer le biais dû à la contraction et la décontraction du tégument des holothuries et donne ainsi une meilleure idée des paramètres de la relation taille-poids. Dans les deux cas, la relation taille-poids montre une allométrie minorante indiquant que la longueur croît plus rapidement que le poids des individus. Ceci est couramment observé chez les espèces d'holothurie de la famille des Stichopodidae ou celle des autres familles et ce, dans différentes régions du monde.

Les individus du poisson *Carapus acus* retrouvés à l'intérieur de la cavité coelomique de *P. regalis* sont des adultes dont la longueur est comprise entre 9 et 16,60 cm et pèsent entre 0,47 et

4,11 g. Les différentes mensurations morphométriques réalisées sur les individus de la côte algérienne sont similaires à celles des individus des côtes tunisienne et marocaine.

L'évaluation de la composition approximative du tégument de *P. regalis* a révélé un fort taux d'humidité ($90,98 \pm 0,71$ %), une faible teneur en lipides ($1,40 \pm 0,57$ %), une teneur en cendres de $40,45 \pm 0,54$ %, une teneur en sucres totaux de $0,15 \pm 0,01$ % et une bonne digestibilité par la pepsine ($46,96 \pm 3,08$ %). Ainsi, *P. regalis* de la côte algérienne pourrait constituer une nouvelle source nutritionnelle et économique à exploiter. Néanmoins, des études sur sa reproduction doivent être menées afin d'établir des mesures de gestion qui garantissent la durabilité des stocks telles que la détermination de périodes de fermeture de pêche et les tailles commerciales, qui ne sont disponibles pour aucune espèce exploitée en Algérie.

Cette étude est la première qui aborde à la composition des saponines des espèces *Holothuria arguinensis*, *Holothuria algeriensis* et *Parastichopus regalis*. Les techniques combinées de spectrométrie de masse incluant la MALDI-MS, MALDI-HRMS, LC-MS et LC-MS/MS nous ont permis de mettre en évidence le mélange complexe des saponines des trois espèces en révélant 11, 18 et trois compositions élémentaires pour *H. algeriensis*, *H. arguinensis* et *P. regalis* respectivement. Au total, 22 nouvelles structures de saponines ont été proposées dont 3 sont communes entre les trois espèces, une est commune entre *H. algeriensis* et *H. arguinensis*, sept sont propres à *H. algeriensis* et 11 à *H. arguinensis*.

Cette thèse a été réalisée dans le but d'apporter des éléments de réponse à la connaissance des holothuries de la côte algérienne, cependant, à son terme, nous nous posons plus de questions et nous ouvrons la porte à d'autres thématiques recherches tel que :

- 1) L'étude du comportement de l'espèce *Parastichopus regalis* vis-à-vis des conditions environnementales et leur influence sur le polymorphisme de cette espèce ;
- 2) L'élargissement des connaissances écologiques en étudiant le rôle que joue cette espèce pour son endosymbiote et est-ce qu'il existe une communication chimique à travers les saponines qui ferait que les poissons puissent repérer leur hôte ;
- 3) La réalisation des études de comportement sur *P. regalis* ou même les autres espèces en induisant différentes sources de stress (manipulation, variation de la température, de l'oxygène, de la nourriture ...etc.) pour étudier les réponses chimiques de ces

- organismes et élucider le phénomène de leur absence ou de leur dégradation et le processus de leur régénération par ces organismes ;
- 4) L'étude des activités biologiques des extraits de saponines des trois espèces étudiées dans le but de les exploiter dans l'industrie pharmaceutique et nutraceutique ;
 - 5) L'établissement des profils de saponines des autres espèces du genre *Holothuria* et *Parastichopus* dont les données sont inexistantes ou incomplètes et ce, dans le but de procéder à leur révision taxinomique ;
 - 6) L'étude de l'écobiologie de la reproduction et des dynamiques des populations de *P. regalis* dans le but d'établir des mesures et des modalités de son exploitation rationnelle et sa gestion à long terme ;
 - 7) Le lancement des projets de reproduction artificielle des holothuries et leur aquaculture monospécifique ou multitrophique intégrée pour relâcher la pression de la pêche illicite qui se fait actuellement sur les espèces de genre *Holothuria* avant l'effondrement de leur stock.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

« A »

- Abad, E., Preciado, I., Serrano, A. & Baro, J. (2007). Demersal and epibenthic assemblages of trawlable grounds in the northern Alboran Sea (western Mediterranean). *Scientia Marina*, 71 (3), 513–524. <https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n3513>
- Abad, E., Valeiras, J., Abad, E., Barreiro, M., Solla, A., Villaverde, A., Álvarez, M. & Valeiras, J. (2018). Reproductive biology of the sea cucumber *Parastichopus tremulus* (Holothuroidea) from European trawl fisheries. *Holoplus*, 10. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33773.74723>
- Abdel Razek, F. A., Abdel Rahman, S. H., Mona, M. H. & Moussa, R. M. (2007). Fission of the Mediterranean Sand Sea Cucumber, *Holothuria arenicola* (Semper, 1868) in Egypt. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 26, 33–34.
- Altenburger, K., Bandesha, F., Bronstein, O., Ducarme, F., Forstner, M., Grun, T. B., Krapf, A., Kroh, A., Martínez-Melo, A., Miskelly, A., Mongiardino Koch, N., Mooi, R., Saucède, T., Steger, J., & Ziegler, A. (2023). World Echinoidea Database. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, J. Abbott, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aesch, N. Akkari, et al., *Catalogue of Life Checklist* (ver. (01/2023)). <https://doi.org/10.48580/dfqt-3c6>
- Althunibat, O. Y., Hashim, R. Bin, Taher, M., Daud, J. M., Ikeda, M. A. & Zali, B. I. (2009). *In vitro* antioxidant and antiproliferative activities of three malaysian sea cucumber species. *European Journal of Scientific Research*, 37(3), 376–387.
- Altobelli, C., Perzia, P., Falautano, M., Consoli, P., Canese, S., Romeo, T. & Andaloro, F. (2017). Mediterranean banks in EBSA area: Hotspots of biodiversity under threat. *Marine Environmental Research*, 131, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.09.005>
- Amini, E., Nabiuni, M., Baharara, J., Parivar, K. & Asili, J. (2014). Hemolytic and cytotoxic effects of saponin like compounds isolated from Persian Gulf brittle star (*Ophiocoma erinaceus*). *Journal of Coastal Life Medicine*, 2(10), 762–768. <https://doi.org/10.12980/jclm.2.2014jclm-2014-0056>
- Aminin, D. L., Chaykina, E. L., Agafonova, I. G., Avilov, S. A., Kalinin, V. I. & Stonik, V. A. (2010). Antitumor activity of the immunomodulatory lead Cumaside. *International Immunopharmacology*, 10(6), 648–654. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.03.003>
- Aminin, D. L., Menchinskaya, E. S., Pislugin, E. A., Silchenko, A. S., Avilov, S. A. & Kalinin, V. I. (2015). Anticancer activity of sea cucumber triterpene glycosides. *Marine Drugs*, 13(3), 1202–1223. <https://doi.org/10.3390/md13031202>
- Amon, R. M. W. & Herndl, G. J. (1991). Deposit Feeding and Sediment: I. Interrelationship Between *Holothuria tubulosa* (Holothurioida, Echinodermata) and the Sediment Microbial Community. *Marine Ecology*, 12(2), 163–174. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.1991.tb00250.x>
- Anderson, S. C., Flemming, J. M., Watson, R. & Lotze, H. K. (2011). Serial exploitation of global

- sea cucumber fisheries. *Fish and Fisheries*, 12(3), 317–339. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2010.00397.x>
- Aprianto, R., Amir, N., Kasmiati, Matusalach, Fahrul, Syahrul, Tresnati, J., Tuwo, A. & Nakajima, M. (2019). Economically important sea cucumber processing techniques in South Sulawesi, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 370, 1–9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/370/1/012082>
- Armah, C. N., Mackie, A. R., Roy, C., Price, K., Osbourn, A. E., Bowyer, P. & Ladha, S. (1999). The membrane-permeabilizing effect of avenacin A-1 involves the reorganization of bilayer cholesterol. *Biophysical Journal*, 76, 281–290. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(99\)77196-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(99)77196-1)
- Arnold, D.C. (1953). Observation on *Carapus acus* (Brünnich) (Jugulares, Carapidae). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 24, 152–166.
- Arnold, D. C. (1956). A systematic revision of the fishes of the teleost family Carapidae (Percomorphi, Blennioidea), with descriptions of two new species. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology*, 4(6), 247–307. <https://www.ptonline.com/articles/how-to-get-better-mfi-results>
- Arnold, D.C. (1957). Further studies on the behaviour of the fish *Carapus acus* (Brünnich). *Pubblicazioni della Stazione Zoologica di Napoli*, 30, 263–268.
- Aronson, L.H. & Mosher, C. (1951). Observations on the behaviour and ecology of the West Indian pearlfish. *Anatomical Record*, 111–489.
- Arrebola-Liébanas, F. J., Romero-González, R. & Garrido Frenich, A. (2017). HRMS: Fundamentals and Basic Concepts. In *Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis* (pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809464-8.00001-4>
- Atkinson, L., Mah, C., Filander, Z., Olbers, J. & Thandar, A. (2018). PHYLUM: ECHINODERMATA. In Atikson L.J. & Sank K.J. (Eds.), *Field Guide to the Offshore Marine Invertebrates of South Africa* (pp. 393–476). Malachite Marketing and Media.
- Augier, H. (1985). Première contribution à l'étude et à la cartographie des biocénoses marines benthiques de l'île de Madère. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 37, 86–129.
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B. & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72(6), 435–457. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.01.015>
- Aumeeruddy, R. & Conand, C. (2008). Seychelles : a hotspot of sea cucumber fisheries in Africa and the Indian Ocean region. In V. Toral-Granda, A. Lovatelli & M. Vasconcellos (Eds.), *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 516 (pp. 195–209). Rome, FAO.
- Avilov, S. A., Kalinin, V. I. & Smirnov, A. V. (2004). Use of triterpene glycosides for resolving taxonomic problems in the sea cucumber genus *Cucumaria* (Holothurioidea, Echinodermata). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 715–733. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2003.12.008>

- Aydın, M. (2008). The commercial sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 28, 40–41.
- Aydın, M. (2017). Present status of the sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 37, 30–34.
- Aydın, M. (2018). Biometry, density and the biomass of the commercial sea cucumber population of the Aegean Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19 (6), 463–474. <https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19602>
- Aydın, M. (2020). Length-weight relationships and condition factor of four different sea cucumber species in the Aegean Sea. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 5(1), 80–85. <https://doi.org/10.35229/jaes.677940>
- Aydın, M., Sevgili, H., Tufan, B., Emre, Y. & Köse, S. (2011). Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(3), 500–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x>

« B »

- Bahrami, Y. (2015). *Discovery of novel saponins as potential future drugs from sea cucumber viscera*. Faculty of Medicine, Nursing and Health Sciences Flinders University, Australia.
- Bahrami, Y. & Franco, C. M. M. (2016). Acetylated triterpene glycosides and their biological activity from holothuroidea reported in the past six decades. *Marine Drugs*, 14(8), 1–38. <https://doi.org/10.3390/md14080147>
- Bahrami, Y., Zhang, W. & Franco, C. (2014). Discovery of novel saponins from the viscera of the sea cucumber *Holothuria lessona*. *Marine Drugs*, 12(5), 2633–2667. <https://doi.org/10.3390/md12052633>
- Baine, M. & Choo, P. S. (1999). Sea cucumber fisheries in Malaysia, towards a conservation strategy. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 12, 6–10.
- Bakalem, A., Gillet, P., Pezy, J. P. & Dauvin, J. C. (2020). Inventory and the biogeographical affinities of Annelida Polychaeta in the Algerian coastline (Western Mediterranean). *Mediterranean Marine Science*, 21(1), 157–182. <https://doi.org/10.12681/MMS.20408>
- Bakus, G. J. (1968). Defensive mechanisms and ecology of some tropical holothurians. *Marine Biology*, 2(1), 23–32. <https://doi.org/10.1007/BF00351634>
- Bakus, G. J. (1973). *the Biology and Ecology of Tropical Holothurians* (pp. 325–367). Academic Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395526-5.50018-3>
- Bat, L., Ahmed, Q., Öztekin, A. & Arici, E. (2020). A review on heavy metal levels in sea cucumbers. *International Journal of Environment and Geoinformatic*, 7(3), 2148–9173.
- Bayoğullari, B. & Tolon, T. (2021). The importance of sea cucumber in integrated multitrophic aquaculture (IMTA) and its worldwide applications. *International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences*, 21–25.
- Beauregard, K. A., Truong, N. T., Zhang, H., Lin, W. & Beck, G. (2001). The detection and

- isolation of a novel antimicrobial peptide from the echinoderm, *Cucumaria frondosa*. In *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*, 484 (pp. 55–62). Kluwer Aca. Plenum. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_5
- Belbachir, N. (2018). *Rôle des Holothuries aspidochirotés dans le fonctionnement du réseau trophique de l'écosystème à Posidonia oceanica (L.) Delile (1813) de la frange côtière de Mostaganem*. Thèse de Doctorat, Université de Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 160 p.
- Belbachir, N. & Mezali, K. (2018). Food preferences of four aspidochirotid holothurians species (Holothuroidea: Echinodermata) inhabiting the *Posidonia oceanica* meadow of Mostaganem area (Algeria). *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 38, 55–59.
- Belbachir, N. & Mezali, K. (2020a). Seasonal variation in food intake of *Holothuria (Roweothuria) poli* (Holothuroidea: Echinodermata) of Stidia in Mostaganem, Algeria. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 40, 27-31.
- Belbachir, N. & Mezali K. (2020b). Interspecific competition and invasive capacity of *Holothuria (Roweothuria) arguinensis*: does its diet represent a danger for native Mediterranean species?. *Vie et milieu - life and environment*, 70 (3–4): 311–314.
- Belbachir, N., Mezali, K. & Soualili, D. L. (2014). Selective Feeding behavior in some aspidochirotid holothurians (Echinodermata: Holothuroidea) at Stidia, Mostaganem Province, Algeria. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 34, 34–37.
- Belhaouari, B. & Belguermi, A. (2020). Assessment of the ecological status of Algerian coastal water: recommendations and proposal. *International Invention of Scientific Journal*, 4(9), 1439–1444.
- Belkacem, N. E. & Mezali, K. (2022). Culinary valorisation of sea cucumbers from the Algerian west coast. *SPC Bêche-de-mer*, 42, 73–78.
- Benzait, H. (2020). *Écologie, dynamique de la population et reproduction d'Echinaster sepositus, Ophioderma longicauda et de Parastichopus regalis au niveau de la côte de Mostaganem*. Thèse de Doctorat, Université de Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, 162 p.
- Benzait, H., Khodja, I., Soualili, D. L. & Mezali, K. (2020). Note on *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) from the Sidi-Medjdoub Area of Mostaganem, Algeria. *SPC Bêche-de-mer Information Bulletin*, 40, 43–45.
- Berrill, M. (1966). The ethology of the synaptid holothurian, *Opheodesoma spectabilis*. *Canadian Journal of Zoology*, 44, 457–482.
- Bingham, B. L. & Braithwaite, L. F. (1986). Defense adaptations of the dendrochirote holothurian *Psolus chitonoides* Clark. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 98(3), 311–322. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(86\)90220-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(86)90220-0)
- Blunden, G. (2001). Biologically active compounds from marine sources. *Phytotherapy Research*, 15, 89–94. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(83\)90091-9](https://doi.org/10.1016/0304-4203(83)90091-9)
- Bondoc, K. G. V., Lee, H., Cruz, L. J., Lebrilla, C. B. & Juinio-Meñez, M. A. (2013). Chemical

- fingerprinting and phylogenetic mapping of saponin congeners from three tropical holothurian sea cucumbers. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 166, 182–193. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.09.002>
- Bonham, K. & Held, E. E. (1963). Ecological Observations on the Sea Cucumbers *Holothuria atra* and *H. leucospilota* at Rongelap Atoll, Marshall Islands. *Pacific Science*, 17, 305–314.
- Bonnet, S., Tovar-Sánchez, A., Panzeca, C., Duarte, C. M., Ortega-Retuerta, E. & Sañudo-Wilhelmy, S. A. (2013). Geographical gradients of dissolved Vitamin B12 in the Mediterranean Sea. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00126>
- Bordbar, S., Anwar, F. & Saari, N. (2011). High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - A review. *Marine Drugs*, 9(10), 1761–1805. <https://doi.org/10.3390/md9101761>
- Boyle, E. A., Chapnick, S. D., Bai, X. X. & Spivack, A. (1985). Trace metal enrichments in the Mediterranean Sea. *Earth and Planetary Science Letters*, 74, 405–419. [https://doi.org/10.1016/S0012-821X\(85\)80011-X](https://doi.org/10.1016/S0012-821X(85)80011-X)
- Brasseur, L., Parmentier, E., Caulier, G., Vanderplanck, M., Michez, D., Flammang, P., Gerbaux, P., Lognay, G. & Eeckhaut, I. (2016). Mechanisms involved in pearlfish resistance to holothuroid toxins. *Marine Biology*, 163(6). <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2901-3>
- Bruckner, A. W. (2005). The recent status of sea cucumber fisheries in the continental United States of America. *SPC Bêche-de Mer Information Bulletin*, 22, 39–46.
- Bruckner, A. W., Johnson, K. A., & Field, J. D. (2003). Conservation strategies for sea cucumbers : Can a CITES Appendix II listing promote sustainable international trade ? *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 18, 24–33.
- Bullough, WS . (1958). *Practical Invertebrate Anatomy*. London. MacMillan.
- Byrne, M. (1985). Evisceration behaviour and the seasonal incidence of evisceration in the holothurian *eupentacta quinquesemita* (Selenka). *Ophelia*, 24(2), 75–90. <https://doi.org/10.1080/00785236.1985.10426621>
- Byrne, M., Rowe, F. & Uthicke, S. (2010). Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 1068–1081. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.013>

« C »

- Cai, Z. & Liu, S. (2013). *Applications of MALDI-TOF Spectroscopy*, Springer, 215p.
- Çakli, S., Cadun, A., Kisla, D. & Dinçer, T. (2004). Determination of quality characteristics of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) in Turkish Sea (Aegean Region) depending on sun drying process step used in Turkey. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 13(3), 69–78. <https://doi.org/10.1300/J030v13n03>
- Capinpin Jr., Emmanuel Federico, C., Parreño, S. C., Aban, S. M. & Argente, F. A. T. (2020). Integrated Multi-Trophic Aquaculture (IMTA) of Abalone, Sea Cucumber and Seaweeds in

- an Intertidal Pond. *Journal of Natural and Allied Sciences*, 4(1), 53–60.
- Careaga, V. P., Bueno, C., Muniain, C., Alché, L. & Maier, M. S. (2008). Antiproliferative, cytotoxic and hemolytic activities of a triterpene glycoside from *Psolus patagonicus* and its desulfated analog. *Chemotherapy*, 55(1), 60–68. <https://doi.org/10.1159/000180340>
- Cattaneo, M. (1981). Contribution à l'étude du plateau continental de la mer Ligure et haute Tyrrhénienne. II. Echinodermata (1). *Cahiers de Biologie Marine*, 22, 11–24.
- Caulier, G., Van Dyck, S., Gerbaux, P., Eeckhaut, I. & Flammang, P. (2011). Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family Holothuriidae. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 31, 48–54.
- Caulier, G., Flammang, P., Gerbaux, P. & Eeckhaut, I. (2013). When a repellent becomes an attractant: Harmful saponins are kairomones attracting the symbiotic Harlequin crab. *Scientific Reports*, 3, 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep02639>
- Caulier, G., Mezali, K., Soualili, D. L., Decroo, C., Demeyer, M., Eeckhaut, I., Gerbaux, P. & Flammang, P. (2016). Chemical characterization of saponins contained in the body wall and the Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823). *Biochemical Systematics and Ecology*, 68, 119–127. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.06.005>
- Chang-Lee, M. V., Price, R. J. & Lampila, L. E. (1989). Effect of Processing on Proximate Composition and Mineral Content of Sea Cucumbers (*Parastichopus spp.*). *Journal of Food Science*, 54(3), 567–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb04653.x>
- Chatzivasileiou, D., Papageorgiou, N., Dimitriou, P. D. & Karakassis, I. (2019). Use of holothurians in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *17th Hellenic Conference of Ichthyologists*, 261–264.
- Chen, J. (2003). Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 18, 18–23.
- Chen, J. (2004). Present status and prospects of sea cucumber industry in China. In A. Lovatelli, C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.-F. Hamel & A. Mercier (Eds.), *Advances in sea cucumber aquaculture and management* (pp. 25–38).
- Chen, S., Xue, C., Yin, L., Tang, Q., Yu, G. & Chai, W. (2011). Comparison of structures and anticoagulant activities of fucosylated chondroitin sulfates from different sea cucumbers. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.08.040>
- Cherbonnier, G. (1953). Note sur une nouvelle espèce de synapte de l'île Maurice: *Patinapta Vaughani* n. sp. *Bulletin Du Muséum*, 25(4), 501–504.
- Cherbonnier, G. (1965). Holothurides. *Expédition océanographique belge dans les eaux côtières africaines de l'Atlantique Sud (1948–1949): résultats scientifiques*, Brussels, 3 (2), 1–23.
- Chopin, T., Buschmann, A. H., Halling, C., Troell, M., Kautsky, N., Neori, A., Kraemer, G. P., Zertuche-González, J. A., Yarish, C. & Neefus, C. (2001). Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: A key toward sustainability. *Journal of Phycology*, 37(6), 975–986. <https://doi.org/10.1046/j.1529-8817.2001.01137.x>

- Claereboudt, E. J. S., Caulier, G., Decroo, C., Colson, E., Gerbaux, P., Claereboudt, M. R., Schaller, H., Flammang, P., Deleu, M. & Eeckhaut, I. (2019). Triterpenoids in echinoderms: Fundamental differences in diversity and biosynthetic pathways. *Marine Drugs*, 17(6). <https://doi.org/10.3390/md17060352>
- Claereboudt, E. J. S., Claereboudt, M. R., Savarino, P., Caulier, G., Gaumez, L., Deleu, M., Gerbaux, P., Eeckhaut, I. (2023). A Distinct Saponin Profile Drives an Olfactory-Mediated Aggregation in the Aquacultivated Sea Cucumber *Holothuria scabra*. *Marine drugs*, 21, 3, 184. <https://doi.org/10.3390/md21030184>
- Clark, H.L. (1922). The holothurians of the genus *Stichopus*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 65(3), 39–74.
- Coll, M., Piroddi, C., Steenbeek, J., Kaschner, K., Lasram, F. B. R., Aguzzi, J., Ballesteros, E., Bianchi, C. N., Corbera, J., Dailianis, T., Danovaro, R., Estrada, M., Frogli, C., Galil, B. S., Gasol, J. M., Gertwage, R., Gil, J., Guilhaumon, F., Kesner-Reyes, K., ... Voultziadou, E. (2010). The biodiversity of the Mediterranean Sea: Estimates, patterns, and threats. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011842>
- Colson, E., Savarino, P., Claereboudt, E. J. S., Cabrera-Barjas, G., Deleu, M., Lins, L., Eeckhaut, I., Flammang, P. & Gerbaux, P. (2020). Enhancing the membranolytic activity of chenopodium quinoa saponins by fast microwave hydrolysis. *Molecules*, 25(7), 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules25071731>
- Conand, C. (1990). *The fishery resources of Pacific Island countries Part 2. Holothurians*. FAO. 142 p.
- Conand, C. (1993). Ecology and reproductive biology of *Stichopus variegatus* an Indo- Pacific coral reef sea cucumber (Echinodermata: Holothuroidea). *Bulletin of Marine Science*, 52(3), 970–981.
- Conand, C. (1995). Asexual reproduction by fission in *Holothuria atra*: Variability of some parameters in populations from the tropical Indo-Pacific. *Oceanologica Acta*, 19(3–4), 209–216.
- Conand, C. (2001). Overview of sea cucumbers fisheries over the last decade - what possibilities for a durable management ? In Barker (Ed.), *Echinoderms 2000*, (pp. 339–344). Swets & Zeitlinger.
- Conand, C. (2004). Present status of world sea cucumber resources and utilisation: An international overview. *Advances in Sea Cucumber Aqua- Culture and Management. FAO Fisheries Technical Paper*, 463, 13–24.
- Conand, C. (2006b). Harvest and Trade in Sea Cucumbers. In A. W. Bruckner (Ed.), *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR 34 (pp. 51–73). Silver Spring.
- Conand, C. (2006a). Sea Cucumber Biology, Taxonomy, Distribution and Conservation Status. In A. W. Bruckner (Ed.), *Proceedings of the CITES workshop on the conservation of sea cucumbers in the families Holothuriidae and Stichopodidae*. NOAA Technical Memorandum NMFSOPR 34 (pp. 33–50). Silver Spring.

- Conand, C. (2017). Expansion of global sea cucumber fisheries buoys exports. *Revisita de Biologia Tropical*, 65. <https://doi.org/10.1201/9781003077565-43>
- Conand, C. (2018). Tropical sea cucumber fisheries: Changes during the last decade. *Marine Pollution Bulletin*, 133, 590–594. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.05.014>
- Conand, C. & Byrne, M. (1993). A review of recent developments in the world sea cucumber fisheries. *Marine Fisheries Review*, 55(4), 1–13.
- Conand, C., Shea, S. & To, A. (2014a). Beche-de-mer trade statistics for Hong Kong in 2012. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 34, 43–46.
- Conand, C., Polidoro, B., Mercier, A., Gamboa, R., Hamel, J.-F. & Purcell, S. (2014b). The IUCN Red List assessment of aspidochirotid sea cucumbers and its implications. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 34, 3–7.
- Corning, W. C., Dyal, J. A. & Willlos, A. O. D. (1975). Intertebrate Learning. Volume 3. Cephalopods and Echinoderms. In *The Quarterly Review of Biology*, 51(2). Plenum Press. <https://doi.org/10.1086/409428>
- Coulon, P. & Jangoux, M. (1993). Feeding rate and sediment reworking by the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) in a Mediterranean seagrass bed off Ischia Island, Italy. *Marine Ecology Progress Series*, 92(1–2), 201–204. <https://doi.org/10.3354/meps092201>
- Cranford, P. J., Reid, G. K. & Robinson, S. M. C. (2013). Open water integrated multi-trophic aquaculture: Constraints on the effectiveness of mussels as an organic extractive component. *Aquaculture Environment Interactions*, 4(2), 163–173. <https://doi.org/10.3354/aei00081>
- Crozier, W. J. (1914). the Orientation of a Holothurian By Light. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 36(1), 8–20. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1914.36.1.8>
- « D »**
- Dai, Y. L., Kim, E. A., Luo, H. M., Jiang, Y. F., Oh, J. Y., Heo, S. J. & Jeon, Y. J. (2020). Characterization and anti-tumor activity of saponin-rich fractions of South Korean sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*). *Journal of Food Science and Technology*, 57(6), 2283–2292. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04266-z>
- Dang, N. H., Van Thanh, N., Van Kiem, P., Huong, L. M., Minh, C. Van & Kim, Y. H. (2007). Two new triterpene glycosides from the Vietnamese sea cucumber *Holothuria scabra*. *Archives of Pharmacal Research*, 30(11), 1387–1391. <https://doi.org/10.1007/bf02977361>
- Dass, C. (2007). *Fundamentals of contemporary mass spectrometry*. John Wiley & Sons. 585 p. <https://doi.org/10.5860/choice.45-1519>
- Dauvin, J. C., Bakalem, A., Baffreau, A. & Grimes, S. (2017). Benthic ecological status of Algerian harbours. *Marine Pollution Bulletin*, 125(1–2), 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.09.049>
- Dauvin, J. C., Grimes, S. & Bakalem, A. (2013). Marine biodiversity on the Algerian Continental Shelf (Mediterranean Sea). *Journal of Natural History*, 1–21. <https://doi.org/10.1080/00222933.2012.752545>

- Decroo, C., Colson, E., Demeyer, M., Lemaire, V., Caulier, G., Eeckhaut, I., Cornil, J., Flammang, P. & Gerbaux, P. (2017). Tackling saponin diversity in marine animals by mass spectrometry: data acquisition and integration. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(12), 3115–3126. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0252-7>
- Deichmann, E. (1940). Report on the holothurians, collected by the Harvard-Havana expeditions 1938 and 1939, with a revision of the Molpadonia of the Atlantic Ocean. *Memorias de La Sociedad Cubana de Historia Natural*, 14(8), 188–240.
- Demeyer, M. (2015). Contribution des techniques modernes de la spectrométrie de masse à l'évaluation du rôle biologique des saponines chez *Asterias rubens*. Université de Mons-Faculté des Sciences.
- Diniz, G. S. D., Barbarino, E. & Lourenço, S. O. L. (2012). On the Chemical Profile of Marine Organisms from Coastal Subtropical Environments: Gross Composition and Nitrogen-to-Protein Conversion Factors. *Oceanography*, 298–320. <https://doi.org/10.5772/29294>
- Dolmatov, I. Y. (2014). Asexual reproduction in holothurians. *The Scientific World Journal*, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/527234>
- Dolmatov, I. Y., Khang, N. A. & Kamenev, Y. O. (2012). Asexual reproduction, evisceration, and regeneration in holothurians (Holothuroidea) from Nha Trang Bay of the South China Sea. *Russian Journal of Marine Biology*, 38(3), 243–252. <https://doi.org/10.1134/S1063074012030042>
- Dolorosa, R. G. (2015). The sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) of Tubbataha Reefs Natural Park, Philippines. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 35, 10–18.
- Domantay, J.S. (1931). Autotomy in holothurians. *Natural and Applied Science Bulletin (University of the Philippines)*, 1, 389–404.
- Domínguez-Godino, J. A. & González-Wangüemert, M. (2019). *Holothuria arguinensis*: A new sea cucumber species for aquaculture. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 39, 60–64.
- Domínguez-Godino, J. A., Slater, M. J., Hannon, C., & González-Wangüemert, M. (2015). A new species for sea cucumber ranching and aquaculture: Breeding and rearing of *Holothuria arguinensis*. *Aquaculture*, 438, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.004>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. & Smith, F. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>

« E »

- Eeckhaut, I., Parmentier, E., Becker, P., Gomez da Silva, S. & Jangoux, M. (2004). Parasites and biotic diseases in field and cultivated sea cucumbers. *Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*, 311–325.
- Eeckhaut, I., Caulier, G., Brasseur, L., Flammang, P., Gerbaux, P. & Parmentier, E. (2015). Effects of holothuroid ichthyotoxic saponins on the gills of free-living fishes and symbiotic pearlfishes. *Biological Bulletin*, 228(3), 253–265. <https://doi.org/10.1086/BBLv228n3p253>
- Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A. M. & Kraj, A. (2009). *Mass spectrometry*,

Instrumentation Interpretation and applications. John Wiley & Sons. 371 p.

- El Aamri, F. & Tamsouri, M. N. (2018). First finding of rare Pearlfish , *Carapus acus* (Brünnich, 1768) (Ophidiiformes : Carapidae) from Mediterranean coasts of Morocco. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 9(11), 3134–3136.
- Elakkermi, M., Mezali, K., Khodja, I., Belbachir, N. E., Benzait, H. & Soualili, D. L. (2021). Gut content analysis of *Parastichopus regalis* (Cuvier , 1817) from the west Algerian coast. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 41, 15–18.
- Elbandy, M., Rho, J. R. & Afifi, R. (2014). Analysis of saponins as bioactive zoochemicals from the marine functional food sea cucumber *Bohadschia cousteaui*. *European Food Research and Technology*, 238(6), 937–955. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2171-6>
- El-Geziry, T. M. & Bryden, I. G. (2010). The circulation pattern in the Mediterranean Sea: Issues for modeller consideration. *Journal of Operational Oceanography*, 3(2), 39–46. <https://doi.org/10.1080/1755876X.2010.11020116>
- Enajjar, S. & Bradai, M. N. (2016). First Record of *Carapus acus* (Osteichthyes: Carapidae) in the Gulf of Gabès (southern Tunisia, central Mediterranean Sea). *Marine Biodiversity Records*, 9(1), 7–10. <https://doi.org/10.1186/s41200-016-0015-8>
- Escudero, E., Sentandreu, M. Á. & Toldrá, F. (2010). Characterization of peptides released by *in vitro* digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(8), 5160–5165. <https://doi.org/10.1021/jf904535m>

« F »

- Fabinyi, M. (2011). Historical, cultural and social perspectives on luxury seafood consumption in China. *Environmental Conservation*, 39(1), 83–92. <https://doi.org/10.1017/S0376892911000609>
- Fang, S., Hao, C., Sun, W., Liu, Z. & Liu, S. (1998). Rapid analysis of steroidal saponin mixture using electrospray ionization mass spectrometry combined with sequential tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12, 589–594. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(19980529\)12:10<589::AID-RCM200>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(19980529)12:10<589::AID-RCM200>3.0.CO;2-Q)
- Feral, J.-P. & Massin, C. (1982). Digestive systems: Holothuroidea. In M. Jangoux & J. M. Lawrence (Eds.), *Echinoderm nutrition*. (pp. 191–212). A.A. Balakema. <https://doi.org/10.1201/9781003078920>
- Ferdouse, F. (2004). World markets and trade flows of sea cucumber/beche-de-mer. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper*, 101–118.
- Flammang, P. (2005). The glue of sea cucumber cuvierian tubules: a novel marine bioadhesive. *Marine Biotechnology: An Overview of Leading Fields*, 36, 176–185.
- Folch, J., M. Lees & Sloane Stanley, G. H. (1957). A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipides from Animal Tissues. *The Journal of biological chemistry*, 226(1), 497–509.
- Francour, P. (1989). Le taux d'ingestion de sédiment par *Holothuria polii* et *H. Tubulosa* (Echinodermata: Holothuroidea) dans un herbier à *Posidonia oceanica*. *Posidonia Newsletter*,

2(1), 33–43.

Francour, P. (1997). Predation on Holothurians: A Literature Review. *Invertebrate Biology*, 116(1), 52. <https://doi.org/10.2307/3226924>

Fredalina, B. D., Ridzwan, B. H., Abidin, A. A. Z., Kaswandi, M. A., Zaiton, H., Zali, I., Kittakooop, P. & Jais, A. M. M. (1999). Fatty acid compositions in local sea cucumber, *Stichopus chloronotus*, for wound healing. *General Pharmacology*, 33(4), 337–340. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00253-5](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00253-5)

« G »

Galimany, E., Baeta, M. & Ramón, M. (2018). Immune response of the sea cucumber *Parastichopus regalis* to different temperatures: implications for aquaculture purposes. *Aquaculture*, 357–363. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.005>

Gao, F. & Yang, H. (2015). Chapter 4. Anatomy. In Yang, H., Hamel, J. F., Mercier, A. (Eds.), *The Sea Cucumber *Apostichopus Japonicus*, History, Biology and Aquaculture* (pp. 53–76). Academic Press.

Garneau, F. X., Harvey, C., Simard, J. L., Apsimon, J. W., Burnell, D. J. & Himmelman, J. H. (1989). The distribution of asterosaponins in various body components of the starfish *Leptasterias polaris*. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part B*, 92(2), 411–416. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(89\)90302-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(89)90302-7)

Geer Wallace, M. A. & McCord, J. P. (2020). High-resolution mass spectrometry. In *Fundamentals of high-resolution mass spectrometry* (pp. 253–270). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819967-1.00016-5>

Giner, R. M., Villalba, M. L., Recio, M. C., Máñez, S., Cerdá-Nicolás, M. & Ríos, J. L. (2000). Anti-inflammatory glycoterpenoids from *Scrophularia auriculata*. *European Journal of Pharmacology*, 389(2–3), 243–252. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00846-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00846-8)

Giribet, G. & Edgecombe, G. D. (2020). *The invertebrate tree of life*. Prince Ton University Press Prince. 589 p.

Goad, L., Garneau, F. X., Simard, J.-L., ApSimon, J. W. & Girard, M. (1985). Isolation of Δ^9 (11)-sterols from the sea cucumber *psolus fabricii*. Implications for holothurin biosynthesis. *Tetrahedron Letters*, 26(29), 3513–3516.

González-Wangüemert, M. & Borrero-Pérez, G. (2012). A new record of *Holothuria arguinensis* colonizing the Mediterranean Sea. *Marine Biodiversity Records*, 5(3), 1–4. <https://doi.org/10.1017/S1755267212000887>

González-Wangüemert, M., Maggi, C., Valente, S., Martínez-Garrido, J. & Vasco Rodrigues, N. (2014a). *Parastichopus regalis* — The main host of *Carapus acus* in temperate waters of the Mediterranean Sea and northeastern Atlantic Ocean. *Beche-de-Mer Information Bulletin*, 34, 38–42.

González-Wangüemert, M., Aydın, M. & Conand, C. (2014b). Assessment of sea cucumber populations from the Aegean Sea (Turkey): First insights to sustainable management of new fisheries. *Ocean and Coastal Management*, 92, 87–94.

<https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.02.014>

González-Wangüemert, M., Valente, S., Henriques, F., Domínguez-Godino, J. A. & Serrão, E. A. (2016). Setting preliminary biometric baselines for new target sea cucumbers species of the NE Atlantic and Mediterranean fisheries. *Fisheries Research*, 179, 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.02.008>

González-Wangüemert, M., Domínguez-Godino, J. A. & Cánovas, F. (2018a). The fast development of sea cucumber fisheries in the Mediterranean and NE Atlantic waters: From a new marine resource to its over-exploitation. *Ocean and Coastal Management*, 151, 165–177. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2017.10.002>

González-Wangüemert, M., Roggatz, C. C., Rodrigues, M. J., Barreira, L., da Silva, M. M. & Custódio, L. (2018b). A new insight into the influence of habitat on the biochemical properties of three commercial sea cucumber species. *International Aquatic Research*, 10(4), 361–373. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0210-9>

Graham, R. L. J., Graham, C. & McMullan, G. (2016). Microbial proteomics: A mass spectrometry primer for biologists. *Mediterranean Marine Science*, 6. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-26>

Grimes, S. (2010). *Peuplements benthiques des substrats meubles de la côte algérienne : taxonomie, structure et statut écologique*. Université d'Oran - Faculté des Sciences Département. 360 p.

Gross, J. H. (2017). Mass Spectrometry. In *Analytical Chemistry*, 56 (5). Springer Nature. 968 p. <https://doi.org/10.1021/ac00269a027>

Gubbay, S., Sanders, N., Haynes, T., Janssen, J. A. M., Rodwell, J. R., Nieto, A., Criado, M. G., Beal, S., Borg, J., Kennedy, M., D. Micu, M., Otero, M., Saunders, G. & Calix, M. (2016). European Red List of Habitats. Luxembourg, European Commission. 46 p. <https://doi.org/10.2779/032638>

Guérard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floch, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P. & Bourseau, P. (2010). Recent developments of marine ingredients for food and nutraceutical applications: a review. *Journal Des Sciences Halieutique et Aquatique*, 2, 21–27.

Guo, M., Song, F., Liu, Z. & Liu, S. (2006). Characterization of triterpenoidic saponin mixture in crude extracts from leaves of *Acanthopanax senticosus* Harms by saponin structural correlation and mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 557(1–2), 198–203. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.056>

« H »

Haddi, I., Benzha, F., Maanan, M., Siddique, S., Rhinane, H., Charouki, N. & Zidane, H. (2021). Population Index and Growth Estimation Based On SLW Index of the Sea Cucumber (*Holothuria arguinensis* Koehler & Vaney, 1906) in the Moroccan Waters of the Atlantic Coast. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 38(1), 535–551. <https://doi.org/10.1007/s41208-021-00362-9>

- Hamel, J. F. & Mercier, A. (1998). Diet and Feeding Behaviour of the Sea Cucumber *Cucumaria Frondosa* in the St. Lawrence Estuary, Eastern Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 76(6), 1194–98.
- Hamel, J. F. & Mercier, A. (1999). Mucus as a mediator of gametogenic synchrony in the sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea: Echinodermata). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 79(1), 121–129. <https://doi.org/10.1017/S0025315498000137>
- Hamel, J. F. & Mercier, A. (2008). Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in temperate areas of the Northern hemisphere. In *Sea cucumbers, A global review of fisheries and trade* (pp. 257–292). Toral-Gran, FAO.
- Hamel, J. F. & Mercier, A. (2014). Cuvierian tubules in tropical holothurians: Usefulness and efficiency as a defence mechanism. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 33(2), 115–139. <https://doi.org/10.1080/10236240009387085>
- Hamel, J. F., Himmelman, J. H. & Dufresne, L. (1993). Gametogenesis and spawning of the sea cucumber *Psolus fabricii* (Duben and Koren). *Biological Bulletin*, 184(2), 125–143. <https://doi.org/10.2307/1542223>
- Hamel, J. F., Ng, P. K. L. & Mercier, A. (1999). Life cycle of the pea crab *Pinnotheres halingsp.* Nov., an obligate symbiont of the sea cucumber *Holothuria scabra* jaeger. *Ophelia*, 50(3), 149–175. <https://doi.org/10.1080/00785326.1999.10409393>
- Hamuro, Y., Coales, S. J., Molnar, K. S., Tuske, S. J. & Morrow, J. A. (2008). Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 1041–1046. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Han, H., Yi, Y., Xu, Q., La, M. & Zhang, H. (2009). Two new cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Holothuria scabra*. *Planta Medica*, 75(15), 1608–1612. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185865>
- Han, L. T. & Hua, N. F. (2022). First trials to induce spawning and larviculture of *Holothuria scabra* in Palau. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 42, 58–64.
- Harms, C. A. (2012). Echinoderms. In Lewbart, G. A., MS, VMD, ACZM, Diplomate (Ed.), *Invertebrate Medicine* (pp. 365–379). John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9780470344606>
- Hassoun, A. E. R., Guglielmi, V., Gemayel, E., Goyet, C., Saab, M. A.-A., Giani, M., Ziveri, P., Ingrosso, G. & Touratier, F. (2015). Is the Mediterranean Sea Circulation in a Steady State. *Journal of Water Resources and Ocean Science*, 4, 6–17. <https://doi.org/10.11648/j.wros.20150401.12>
- Hegde, V. R., Chan, T. M., Pu, H., Gullo, V. P., Patel, M. G., Das, P., Wagner, N., Parameswaran, P. S. & Naik, C. G. (2002). Two selective novel triterpene glycosides from sea cucumber, *Telenata ananas*: Inhibitors of chemokine receptor-5. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12(21), 3203–3205. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(02\)00599-1](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(02)00599-1)
- Hegner, R. W. (1933). *Invertebrate Zoology*. New York. The Macmillan Company. 556 p.

- Hemida, F. (2005). *Les Sélaciens de la côte algérienne : Biosystématique des Requins et des Raies: Écologie, Reproduction et Exploitation de quelques populations capturées*. Thèse de Doctorat d'état, Université Des Sciences Et De La Technologie Houari Boumediene, Alger, 204 p.
- Hernández, J.C., Clemente, S., Tuya, F., Pérez-Ruzafa, A., Sangil, C., Moro-Abad, L. & Bacallado-Aránega, J.J. (2013). Echinoderms of the Canary Islands, Spain. In J.J. Alvarado, F. A., Solís-Marín (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America* (pp. 471–510). Springer-Verlag Berlin and Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-20051-9>
- Herrero-Pérezrul, M. D. & Reyes-Bonilla, H. (2008). Weight-Length relationship and relative condition of the holothurian *Isostichopus fuscus* at Espíritu Santo Island, Gulf of California, México. *Revista de Biología Tropical*, 56, 273–280.
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A. & Hatziolos, M. E. (2007). Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science*, 318, 1737–1743. <https://doi.org/10.1126/science.1152509>
- Honey-Escandón, M., Arreguín-Espinosa, R., Solís-Marín, F. A. & Samyn, Y. (2015). Biological and taxonomic perspective of triterpenoid glycosides of sea cucumbers of the family Holothuriidae (Echinodermata, Holothuroidea). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - B*, 180, 16–39. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.09.007>
- Hostettmann, K. & Marston, A. (1995). *Chemistry and pharmacology of natural products. Saponines*. Cambridge University Press, New York. 548 p.
- Hu, S. (2005). Food plants of China. In *Choice Reviews Online*. Nature. 844 p. <https://doi.org/10.5860/choice.43-0928>
- Hu, X-Q., Wang, Y-M., Wang, J-F., Xue, Y., Li, Z-J., Nagao, K., Yanagita, T. & Xue, C-H. (2010). Dietary Saponins of Sea Cucumber Alleviate Orotic Acid-Induced Fatty Liver in Rats via PPAR and SREBP-1c Signaling. *Lipids in Health and Disease*, 9(25), 1–9.
- Hyman, L. (1955). *The Invertebrates, Echinoderms*. McGraw-Hill Book Company. 763 p.

« I »

- Iñiguez-Martinez, A. M. D. M., Guerra-Rivas, G., Rios, T. & Quijano, L. (2005). Triterpenoid oligoglycosides from the sea cucumber *Stichopus parvimensis*. *Journal of Natural Products*, 68(11), 1669–1673. <https://doi.org/10.1021/np050196m>
- Işgören-Emiroğlu, D. & Günay, D. (2007). The effect of sea cucumber *Holothuria tubulosa* G. 1788 on nutrient and organic matter contents of bottom sediment of oligotrophy and hypereutrophic shores. *Fresenius Environmental Bulletin*, 16(3), 290–294.
- Iyengar, E. V. & Harvell, C. D. (2001). Predator deterrence of early developmental stages of temperate lecithotrophic asteroids and holothuroids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 264(2), 171–188. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00314-8](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00314-8)

« J »

- Janakiram, N. B., Mohammed, A., Zhang, Y., Choi, C. I., Woodward, C., Collin, P., Steele, V. E.

- & Rao, C. V. (2010). Chemopreventive effects of Frondanol A5, a *Cucumaria frondosa* extract, against rat colon carcinogenesis and inhibition of human colon cancer cell growth. *Cancer Prevention Research*, 3(1), 82–91. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0112>
- Janakiram, N. B., Mohammed, A. & Rao, C. V. (2015). Sea cucumbers metabolites as potent anti-cancer agents. In *Marine Drugs*, 13(5). <https://doi.org/10.3390/md13052909>
- Jangoux, M. (1990). Diseases of Echinodermata. In O. Kinne (Ed.), *Diseases of marine animals* (pp. 439–568). Biologische Anstalt Helgoland. <https://doi.org/10.1145/1350843.1350844>
- Jangoux, M. & Lawrence, J.M. (1982). *Echinoderm nutrition*. A.A. Balkema: Rotterdam. XV, 654 pp. ISBN 90-6191-080-3
- Jena, A. K., Biswas, P. & Saha, H. (2017). Advanced Farming Systems in Aquaculture: Strategies To Enhance the Production. *Innovative Farming*, 1(1), 84–89.
- Jesús-Navarrete, A. de, Poot, M. N. M. & Medina-Quej, A. (2018). Density and population parameters of sea cucumber *isostichopus badionotus* (Echinodermata: Stichopodidae) at Sisal, Yucatan. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 46(2), 416–423. <https://doi.org/10.3856/vol46-issue2-fulltext-17>
- Jia, W. W. G., Bu, X., Philips, D., Yan, H., Liu, G., Chen, X., Bush, J. A. & Li, G. (2004). Rh2, a compound extracted from ginseng, hypersensitizes multidrug-resistant tumor cells to chemotherapy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 82(7), 431–437. <https://doi.org/10.1139/y04-049>
- Jiang, S., Dong, S., Gao, Q., Wang, F. & Tian, X. (2011). Comparative study on nutrient composition and growth of green and red sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka, 1867), under the same culture conditions. *Aquaculture Research*, 317–320. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.03033.x>
- Jin, H. X., Xu, H. P., Li, Y., Zhang, Q. W. & Xie, H. (2019). Preparation and evaluation of peptides with potential antioxidant activity by microwave assisted enzymatic hydrolysis of collagen from sea cucumber *Acaudina molpadioides* obtained from Zhejiang province in China. *Marine Drugs*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/md17030169>
- Jørgensen, C. B. (1966). *Biology of suspension feeding*. New York. Pergamon. 357 p.
- JY Chen, R., Chung, T. Y., Li, F. Y., Lin, N. H. & Tzen, J. T. C. (2009). Effect of sugar positions in ginsenosides and their inhibitory potency on Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, 30(1), 61–69. <https://doi.org/10.1038/aps.2008.6>

« K »

- Kalinin, V.I., Stonik, V.A. & Avilov, S.A. (1990). Homological variability and trend in the evolution of triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothurioidea, Echinodermata). *Zhurnal Obshchej Biologii*, 51, 247–260
- Kalinin, V. I. & Stonik, V. A. (1996). Application of morphological trends of evolution to phylogenetic interpretation of chemotaxonomic data. *Journal of Theoretical Biology*, 180(1), 1–10. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1996.0073>

- Kalinin, V. I., Anisimov, M M, Prokofieva, N. G. & Avilov, S. A. (1996). Biological activities and biological role of triterpene glycosides from holothuroids (Echinoderms). In J. M. Jangoux, M., Lawrence (Ed.), *Echinoderm Studies 5* (pp. 139–182). A.A. Balkema.
- Kalinin, V. I., Avilov, S. & Stonik, V. A. (2000). Triterpene Glycosides from Sea Cucumbers (Holothurioidea): Structure, Function and Evolution. In A. Oleszek, W, Marston (Ed.), *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants* (pp 439–568). London. Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-9339-7>
- Kalinin, V. I., Silchenko, A. S., Avilov, S. A., Stonik, V. A. & Smirnov, A. V. (2005). Sea cucumbers triterpene glycosides, the recent progress in structural elucidation and chemotaxonomy. *Phytochemistry Reviews*, 4(2–3), 221–236. <https://doi.org/10.1007/s11101-005-1354-y>
- Kalinin, V. I., Aminin, D. L., Avilov, S. A., Silchenko, A. S. & Stonik, V. A. (2008). Triterpene glycosides from sea cucumbers (holothurioidea, echinodermata). Biological activities and functions. In Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, 35 (pp. 135–196). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80006-3](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80006-3)
- Kalinin, V. I., Avilov, S. A., Silchenko, A. S. & Stonik, V. A. (2014). Triterpene glycosides of sea cucumbers (Holothuroidea, Echinodermata) as Taxonomic Markers. *Natural Product Communications*, 10(1), 21–26. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501000108>
- Kalinin, V. I., Silchenko, A. S. & Avilov, S. A. (2016). Taxonomic significance and ecological role of triterpene glycosides from holothurians. *Biology Bulletin*, 6, 616–624. <https://doi.org/10.1134/S1062359016060108>
- Kaltashov, I. A., Wang, S. & Wang, G. (2022). *Mass Spectrometry in Biopharmaceutical Analysis*. Berlin, Boston. Walter De Gruyter. 270 p.
- Kamyab, E., Kellermann, M. Y., Kunzmann, A. & Schupp, P. J. (2020). Chemical Biodiversity and Bioactivities of Saponins in Echinodermata with an Emphasis on Sea Cucumbers (Holothuroidea). In S. Jungblut *et al.* (Eds.), *YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future*. (pp. 121–157). https://doi.org/10.1007/978-3-030-20389-4_7
- Kareh, M., El Nahas, R., Al-Aaraj, L., Al-Ghadban, S., Naser Al Deen, N., Saliba, N., El-Sabban, M. & Talhouk, R. (2018). Anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the sea cucumber *Holothuria polii* aqueous extract . *SAGE Open Medicine*, 6, 205031211880954. <https://doi.org/10.1177/2050312118809541>
- Kerr, R. G. & Chen, Z. (1995). *In vivo* and *in vitro* biosynthesis of saponins in sea cucumbers. *Journal of Natural Products*, 58(2), 172–176. <https://doi.org/10.1021/np50116a002>
- Keukens, E. A. J., de Vrije, T., Van den Boom, C., De Waard, P., Plasman, H. H., Thiel, F., Chupin, V., Jongen, W. M. F. & De Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *BBA - Biomembranes*, 1240(2), 216–228. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)00186-7](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)00186-7)
- Khattab, R. A., Elbandy, M., Lawrence, A., Paget, T., Rae-Rho, J., Binnaser, Y. S. & Ali, I. (2018). Extraction, Identification and Biological Activities of Saponins in Sea Cucumber

- Pearsonothuria graeffei*. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 21(3), 222–231. <https://doi.org/10.2174/1386207321666180212165448>
- Khotimchenko, Y. S. (2015). The nutritional value of holothurians. *Russian Journal of Marine Biology*, 41(6), 409–423. <https://doi.org/10.1134/S1063074015060061>
- Khotimchenko, Y. (2018). Pharmacological potential of sea cucumbers. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1342), 1–42. <https://doi.org/10.3390/ijms19051342>
- Kille, F. (1936). Regeneration in holothurians. *Annu Rept Tortugas Laboratory, Carnegie Inst Washington, Yearbook*, 35, 85–86.
- Kitagawa, I., Kobayashi, M., Hori, M. & Kyogoku, Y. (1981). Structures of Four New Triterpenoidal Oligoglycosides, Bivittoside A, B, C, and D, from the Sea Cucumber *Bohadschia bivittata* Mitsukuri. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 29(1), 282–285. <https://doi.org/10.1248/cpb.29.282>
- Kitagawa, I., Kobayashi, M. & Kyogoku, Y. (1982). Marine Natural Products. IX. Structural Elucidation of Triterpenoidal Oligoglycosides from the Bahamean Sea Cucumber *Actinopyga agassizi* Selenka. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 30(6), 2045–2050. <https://doi.org/10.1248/cpb.30.2045>
- Kleypas, J. A., Buddemeier, R. W., Archer, D., Cattuso, J.-P., Langdor, C. & Opdyke, B. N. (1999). Geochemical consequences of increased atmospheric carbon dioxide on coral reefs. *Science*, 284, 118–120. www.sciencemag.org
- Kobayashi, M., Hori, M., Kan, K., Yasuzawa, T., Matsui, M., Suzuki, S. & Kitagawa, I. (1991). Marine Natural Products XXVII. Distribution of Lanostane-Type Triterpene Oligoglycosides in Ten Kinds of Okinawan Sea Cucumbers. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39(9), 2282–2287.
- Kodama, M., Sumbing, J. G., Lebata-Ramos, M. J. H. & Watanabe, S. (2015). Metabolic rate characteristics and sediment cleaning potential of the tropical sea cucumber *Holothuria scabra*. *Japan Agricultural Research Quarterly*, 49(1), 79–84. <https://doi.org/10.6090/jarq.49.79>
- Koehler, R. (1921). *Echinodermes. Faune de France, I*. Librairie de la Faculté des Sciences, Paris. 216 p.
- Kropp, R. K. (1982). Responses of Five Holothurian Species to Attacks by a Predatory Gastropod, *Tonna pernix*. *Pacific Science*, 36(4), 445–452.
- Kloss, K. & Pfeiffer, W. (2000). Zur Biologie des "Eigenweidefisches" *Carapus acus* (Brünnich, 1768) (Carapidae, Teleostei), mit Hinweisen auf eine nicht-parasitische Ernährung. *Revue suisse de zoologie*, 107, 335–349.

« L »

- Lavitra, T., Rachele, D., Rasolofonirina, R., Jangoux, M. & Eeckhaut, I. (2008). Processing and marketing of holothurians in the Toliara region, southwestern Madagascar. *SPC Bêche-de-Mer Bulletin*, 28, 24–33.
- Leonard, C., Evans, J., Knittweis, L., Aguilar, R., Alvarez, H., Borg, J.A., Garcia, S. & Schembri,

- P.J. (2020). Diversity, distribution, and habitat associations of deep-water Echinoderms in the Central Mediterranean. *Marine Biodiversity*, 50 (5), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12526-020-01095-3>
- Levin, V.S., Kalinin, V.I. & Stonik, V.A. (1984). Experience of the use of chemical characters at revision of the taxonomic status of the sea cucumber *Bohadschia graerffei* with establishing of new genus. *Biologiya Morya*, 3, 33–38.
- Levin, V.S., Kalinin, V.I., Fedorov, S.N. & Smiley, S. (1986). Structure of triterpene glycosides and taxonomical position of two new species of the family Stichopodidae. *Biologiya Morya*, 4, 72–77.
- Li, R., Zhou, Y., Wu, Z. & Ding, L. (2006). ESI-QqTOF-MS/MS and APCI-IT-MS/MS analysis of steroid saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica*. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 1–22. <https://doi.org/10.1002/jms.988>
- Liao, Y.L. (1997). *Fauna Sinica, Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea*. Beijing, Science Press. 334 p.
- Lin, C., Zhang, L., Liu, S., Gao, S., Xu, Q. & Yang, H. (2013). A comparison of the effects of light intensity on movement and growth of albino and normal sea cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46(6), 351–366. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.841350>
- Lin, C.G. (2011). *Research and comparison of important structural parameters of artificial reefs*. PhD Thesis, Ocean University of China, Qingdao.
- Lin, F. & Wang, R. (2010). Hemolytic mechanism of dioscin proposed by molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Modeling*, 16(1), 107–118. <https://doi.org/10.1007/s00894-009-0523-0>
- Lin, L., Lin, H., Zhang, M., Dong, X., Yin, X., Qu, C. & Ni, J. (2015). Types, Principle, and Characteristics of Tandem High-Resolution Mass Spectrometry and Its Applications. *RSC Advances*, 5(130), 1–27.
- Lionello, P., Abrantes, F., Congedi, L., Dulac, F., Gačić, M., Gomis, D., Goodess, C., Hoff, H., Kutiel, H., Luterbacher, J., Planton, S., Reale, M., Schröder, K., Vittoria Struglia, M., Toreti, A., Tsimplis, M., Ulbrich, U. & Xoplaki, E. (2012). Introduction: Mediterranean Climate-Background Information. *The Climate of the Mediterranean Region: From the Past to the Future*. pp. xxxv-xc. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416042-2.00012-4>
- Liu, X., Chenggang, L., Sun, L., Liu, S., Sun, J. & Yang, H. (2020). Behavioural response of different epithelial tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) to light and differential expression of the light-related gene Pax6. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 53(2), 73–85. <https://doi.org/10.1080/10236244.2020.1767505>
- Lohrer, A. M., Thrush, S. F. & Gibbs, M. M. (2004). Bioturbators enhance ecosystem function through complex biogeochemical interactions. *Letters to Nature*, 431(7012), 1092–1095. <https://doi.org/10.1038/nature03042>
- Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. & Mercier, A. (2004). *Advances in*

sea cucumber aquaculture and management. Rome. FAO. 418 p.

- Low, L. K. & Ng, C. S. (1987). Extraction of lipids (modified Folch's Method). In H. Hasegawa (Ed.), *Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products* (pp. C-2.1-C-2.2). Singapore, Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Lucinda Cordeiro, M. & Djerassi, C. (1990). Biosynthetic Studies of Marine Lipids. 25. Biosynthesis of $\Delta^9(11)$ and Δ^7 sterols and saponins in sea cucumbers. *Journal of Organic Chemistry*, 55, 2806–2813. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(89\)80125-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(89)80125-5)

« M »

- Maatallah, R. & Borhane, A. D. (2014). *Patella rustica* Linnaeus, 1758 (Gastropoda, Patellogastropoda) Inhabiting Coast of Skikda (Algérie). *David publishing*, 8(1), 65–77.
- Mackie, A. M. (1970). Avoidance reactions of marine invertebrates to either steroid glycosides of starfish or sythetic surface-active agents. *Experimental Marine Biology and Ecology*, 5, 63–69.
- Mackie, A. M. & Turner, A. M. (1970). Partial Characterization of a Biologically Active Steroid Glycoside Isolated from the Starfish *Marthasterias glacialis*. *Biochemistry*, 117, 543–550.
- Mactavish, T., Stenton-dozey, J., Vopel, K. & Savage, C. (2012). Deposit-Feeding Sea Cucumbers Enhance Mineralization and Nutrient Cycling in Organically-Enriched Coastal Sediments. *PLoS ONE*, 7(11), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050031>
- Madeira, P., Kroh, A., Cordeiro, R., De, A. M., Martins, F. & Ávila, S. P. (2019). The Echinoderm Fauna of the Azores (NE Atlantic Ocean), *Zootaxa*, 4639(1), 152–154
- Maggi, C. & González-Wangüemert, M. (2015). Genetic differentiation among *Parastichopus regalis* populations in the Western Mediterranean Sea: Potential effects from its fishery and current connectivity. *Mediterranean Marine Science*, 16(3), 489–501.
- Mah, C. (2023). World Asteroidea Database. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, J. Abbott, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aesch, N. Akkari, *et al.*, *Catalogue of Life Checklist* (ver. (01/2023)). <https://doi.org/10.48580/dfqz-3bs>
- Maier, M. S. (2008). Biological Activities of sulfated glycosides from Echinoderms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35, 311–354. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(08\)80008-7](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(08)80008-7)
- Maier, M. S., Roccatagliata, A. J., Kuriss, A., Chludil, H., Seldes, A. M., Pujol, C. A. & Damonte, E. B. (2001). Two New Cytotoxic and Virucidal Trisulfated Triterpene Glycosides from the Antarctic Sea Cucumber *Staurocucumis liouvillei*. *Journal of Natural Product*, 6, 732–736.
- Makarieva, T. N., Stonik, V. A., Kapustina, I. I., Boguslavsky, V. M., Dmitrenoik, A. S., Kalinin, V. I., Cordeiro, M. L. & Djerassit, C. (1993). Biosynthetic studies of marine lipids . 42 . Biosynthesis of steroid and triterpenoid metabolites in the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Biosynthesis of Sea Cucumber Steroids*, 58, 508–517.
- Mal'tsev, I. I., Stekhova, S. I., Shentsova, E. B., M. M. Anisimov, A. & Stonik, V. A. (1985).

- Antimicrobial activity of glycosides from holothurians of the family Stichopodidae. *Pacific Ocean Institute of Bioorganic Chemistry*, 19, 54–56.
- Malyarenko, T. V., Kicha, A. A., Kalinovskiy, A. I., Dmitrenok, P. S., Malyarenko, O. S., Kuzmich, A. S., Stonik, V. A. & Ivanchina, N. V. (2021). New Triterpene Glycosides from the Far Eastern Starfish *Solaster pacificus* and their Biological Activity. *Biomolecules*, 11(427), 1–15.
- Mamelona, J., Pelletier, E., Girard-Lalancette, K., Legault, J., Karboune, S. & Kermasha, S. (2007). Food Chemistry Quantification of phenolic contents and antioxidant capacity of Atlantic sea cucumber, *Cucumaria frondosa*. *Food Chemistry*, 104, 1040–1047. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.016>
- Mangion, P., Taddei, D., Frouin, P. & Conand, C. (2004). Feeding rate and impact of sediment reworking by two deposit feeders *Holothuria leucospilota* and *Holothuria atra* on a fringing reef (Reunion Island, Indian Ocean). In J. H. Heinzeller, T. Nebelsick (Ed.), *Echinoderms: Munchen* (pp. 311–320). A.A. BALKEMA. <https://doi.org/10.1201/9780203970881>
- Mannino, A. M., Balistreri, P. & Deidun, A. (2017). The Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea in a Changing Climate: The Impact of Biological Invasions. In *Mediterranean Identities - Environment, Society, Culture* (pp. 101–127). UNTECH. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69214>
- Marenzeller, E. von (1893). Polychaeten des Grundes, gesammelt 1890, 1891 und 1892. *Denkschrift der Königl. Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematische und Naturwissenschaften Klasse*, 60, 25–48.
- Markle, D.F. & Olney, J.E. (1990). Systematics of the pearlfishes (Pisces: Carapidae). *Bulletin of Marine Science*, 47(2), 269–410.
- Marquet, N., Conand, C., Power, D. M., Canário, A. V. M. & González-Wangüemert, M. (2017). Sea cucumbers, *Holothuria arguinensis* and *H. mammata*, from the southern Iberian Peninsula: variation in reproductive activity between populations from different habitats. *Fisheries Research*, 191, 1–52.
- Marrugo-Negrete, J., Pinedo-Hernández, J., Marrugo-Madrid, S., Navarro-Frómata, E. (2020). Sea Cucumber as Bioindicator of Trace Metal Pollution in Coastal Sediments, *Biological Trace Element Research*, 1–9.
- Martinez, M. I., Alba-Posse, E. J., Lauretta, D. & Penchaszadeh, P. E. (2020). Reproductive features in the sea cucumber *Pentactella perrieri* (Ekman, 1927) (Holothuroidea: Cucumariidae): a brooding hermaphrodite species from the southwestern Atlantic Ocean. *Polar Biology*, 43(9), 1383–1389. <https://doi.org/10.1007/s00300-020-02715-1>
- Mashanov, V. S., Zueva, O. R., Heinzeller, T., Aschauer, B., Naumann, W. W., Grondona, J. M., Cifuentes, M. & Garcia-Ararras, J. E. (2009). The central nervous system of sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) shows positive immunostaining for a chordate glial secretion. *Frontiers in Zoology*, 6(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-6-11>
- Massin, C. (1982). Food & feeding mechanisms : Holothuroidea. In M. Jangoux & J. M. Lawrence (Eds.), *Echinoderm nutrition* (pp. 43–56).

- Mecheta, A. & Mezali, K. (2019). A biometric study to determine the economic and nutritional value of sea cucumbers (Holothuroidea : Echinodermata) collected from Algeria's shallow water areas. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 39, 65–70.
- Mecheta, A., Hanachi, A., Jeandel, C., Arab-Tehrany, E., Bianchi, A., Velot, E., Mezali, K. & Linder, M. (2020). Physicochemical properties and liposomal formulations of hydrolysate fractions of four sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) from the northwestern algerian coast. *Molecules*, 25(2972), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25132972>
- Mercier, A. & Hamel, J. F. (2005). Note on the association between *Plakobranthus ocellatus* (Mollusca: Gastropoda: Opisthobranchia) and *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea). *Cahiers de Biologie Marine*, 46(4), 399–402.
- Mercier, A. & Hamel, J.F. (2013). *Parastichopus regalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2013, e.T180298A1612492. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180298A1612492.en>
- Mercier, A., Battaglione, S. C. & Hamel, J. F. (1999). Daily burrowing cycle and feeding activity of juvenile sea cucumbers *Holothuria scabra* in response to environmental factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 239(3), 125–156. <https://doi.org/10.1108/HRMID-05-2014-0067>
- Mert Ozupek, N. & Cavas, L. (2017). Triterpene glycosides associated antifouling activity from *Holothuria tubulosa* and *H. polii*. *Regional Studies in Marine Science*, 13, 32–41. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.04.003>
- Messing, C. (2023). World List of Crinoidea. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, J. Abbott, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aesch, N. Akkari, et al., *Catalogue of Life Checklist* (ver. (01/2023)). <https://doi.org/10.48580/dfqz-4rc>
- Meyer-Rochow, V. B. (1977). Comparison between 15 *Carapus mourlani* in a Single Holothurian and 19 *C. mourlani* from Starfish. *Copeia*, 1977(3), 582584. <https://doi.org/10.2307/1443286>
- Mezali, K. (1998). Contribution à la systématique, la biologie, l'écologie et la dynamique de cinq espèces d'holothuries aspidochirotes [*Holothuria (H.) tubulosa*, *H. (L.) polii*, *H. (H.) stellati*, *H. (P.) forskali* et *H. (P.) sanctori*] de l'herbier à *Posidonia oceanica* (L.) Delille de la presqu'île de Sidi-Fredj. Alger: École National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (Ex- ISMAL), 192 p.
- Mezali, K. (2008). *Phylogénie , systématique , dynamique des populations et nutrition de quelques espèces d ' holothuries aspidochirotes (Holothuroidea : Echinodermata) inféodées aux herbiers de Posidonies de la cote algéroise* . Thèse de Doctorat, Université Des Sciences Et De La Technologie Houari Boumediene, Alger, 207 p.
- Mezali, K. (2011). Some insights on the phylogeny of Algerian shallow-water sea cucumbers species (Holothuroidea: Aspidochirotida). *SPC Beche-de-mer Information Bulletin*, 31, 45–47.
- Mezali, K. (2013). Polymorphism in *Holothuria (Platyperona) sanctori* from the algerian costal area. Communication orale. 40^{ème} congrès de la CIESM, 28 octobre-1^{er} novembre 2013,

- Marseille, France. <http://www.ciesm.org/online/archives/abstracts/pdf/40/index.php#>
- Mezali, K. & Francour, P. (2012). Les holothuries aspidochirotes de quelques sites des côtes algériennes: révision systématique et relations phylogénétiques. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 137 (1–4), 177–192.
- Mezali, K. & Khodja, I. (2021). First record of pearlfish (*Carapus acus*) in the western Algerian coast. *J. Black Sea/ Mediterranean Environment*, 27(3), 365–371.
- Mezali, K. & Semroud, R. (1997). Sur la présence dans le golfe de Skikda (Algérie) de l'holothurie apode *Oostergrenia digitata* (Montagu, 1815): description et note préliminaire. *Premières Journées Nationales des Sciences de la Mer. J'NESMA. Commandement des Forces Navales - Tamentefoust - Algérie. 25- 27 Mai 1997*
- Mezali, K. & Slimane-tamacha, F. (2020). The status of Algeria' s sea cucumbers and their illegal trade. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 40, 23–31.
- Mezali, K. & Soualili, D. L. (2013). The ability of holothurians to select sediment particles and organic matter. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 1(33), 38–43.
- Mezali, K. & Thandar, A. S. (2014). First record of *Holothuria (Roweothuria) arguinensis* (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida: Holothuriidae) from the Algerian coastal waters. *Marine Biodiversity Records*, 7, 1–4. <https://doi.org/10.1017/S1755267214000438>
- Mezali, K., Chekaba, B., Zupo, V. & Asslah, B. (2003). Feeding behavior of five aspidochirotid holothurian species (Holothuroidea: Echinodermata) of the Sidi-Fredj Peninsula, Algeria. *Bulletin de La Societe Zoologique de France*, 128(1–2).
- Mezali, K., Soualili, D. L., Neghli, L. & Conand, C. (2014). Reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Holothuroidea: Echinodermata) in the southwestern Mediterranean Sea: Interpopulation variability. *Invertebrate Reproduction and Development*, 58(3), 179–189. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.883337>
- Mezali, K., Thandar, A. S. & Khodja, I. (2020). *Paraleptopentacta*, a new Mediterranean and north-west Atlantic sea cucumber genus, with the first record of *P. tergestina* n. comb. (Echinodermata: Dendrochirotida: Cucumariidae) from the north-western Algerian coast. *Zootaxa*, 4860(2), 199–210. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4860.2.3>
- Mezali, K., Khodja, I., Lebouazda, Z. & Belkacem, N.E. (2021a). Knowledge of sea cucumbers by the Algerian community and an attempt to introduce them into the national gastronomy. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 41, 69–72.
- Mezali, K., Thandar, A. S. & Khodja, I. (2021b). On the taxonomic status of *Holothuria (Holothuria) tubulosa* (s.s.) from the Algerian coast with the description of a new Mediterranean species, *Holothuria (Holothuria) algeriensis* n. sp. (Echinodermata: Holothuroidea: Holothuriidae). *Zootaxa*, 4981(1), 89–106. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4981.1.4>
- Mezali, K., Lebouazda, Z., Slimane-Tamacha, F. & Soualili, D. L. (2022). Biometry, size structure and reproductive cycle of the sanded sea cucumbers *Holothuria poli* (Echinodermata, Holothuriidae) from the west Algerian coast. *Invertebrate Reproduction and Development*, 66(1), 67–77. <https://doi.org/10.1080/07924259.2022.2033331>

- Michio, K., Kengo, K., Yasunori, K., Hitoshi, M., Takayuki, Y., Hideaki, Y. & Hiroshi, S. (2003). Effects of deposit feeder *Stichopus japonicus* on algal bloom and organic matter contents of bottom sediments of the enclosed sea. *Marine Pollution Bulletin*, 47(1–6), 118–125. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00411-3](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00411-3)
- Miguel-Ruiz, J. E. S. & García-Ararrás, J. E. (2007). Common cellular events occur during wound healing and organ regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*. *BMC Developmental Biology*, 7(115), 1–19. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-7-115>
- Miller, A. K., Kerr, A. M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N. G., Carvajal, J. I. & Rouse, G. W. (2017). Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 110–131. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.02.014>
- Millot, C. (1999). Circulation in the Western Mediterranean Sea. *Journal of Marine Systems*, 20, 423–442.
- Mills, D. J., Duy, N. D. Q., Juinio-Menez, M. A., Raison, C. M. & Zarate, J. M. (2014). Overview of sea cucumber aquaculture and sea-ranching research in the South-East Asian region. *Proceedings of an International Symposium Held in Noumea, New Caledonia*, 22–31.
- Mitu, S. A., Bose, U., Suwansa-ard, S., Turner, L. H., Zhao, M., Elizur, A., Ogbourne, S. M., Shaw, P. N. & Cummins, S. F. (2017). Evidence for a saponin biosynthesis pathway in the body wall of the commercially significant sea cucumber *Holothuria scabra*. *Marine Drugs*, 15(11), 1–13. <https://doi.org/10.3390/md15110349>
- Mladenov, P. (1996). Environmental factors influencing asexual reproductive processes in echinoderms. *Oceanologica Acta*, 19(3–4), 227–235.
- Mohsen, M. & Yang, H. (2021). Introduction to sea cucumbers. In *Sea Cucumbers. Aquaculture, Biology and Ecology* (pp. 1–18). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824377-0.00002-5>
- Mojica, E.-R. E. & Merca, F. E. (2004). Lectin from the Body Walls of Black Sea Cucumber (*Holothuria atra* Jaeger). *Philippine Journal of Science*, 133(2), 77–85.
- Mondol, M. A. M., Shin, H. J., Rahman, M. A. & Islam, M. T. (2017). Sea cucumber glycosides: Chemical structures, producing species and important biological properties. *Marine Drugs*, 15(317), 1–35. <https://doi.org/10.3390/md15100317>
- Monticelli, F.S. (1896). Sull' autotomia delle *Cucumaria planci* (Br.). *Atti della Reale Accademia dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche, Matematiche e Naturali, Rendiconti*, 5, 231–239.
- Moore, J. (2006). *An introduction to the invertebrates*. New York. Cambridge university press. 318 p.
- Moraes, G., Norhcote, P. C., Kalinin, V. I., Avilov, S. A., Silchenko, A. S., Dmitrenok, P. S., Stonik, V. A. & Levin, V. S. (2004). Structure of the major triterpene glycoside from the sea cucumber *Stichopus mollis* and evidence to reclassify this species into the new genus *Australostichopus*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(7), 637–650. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.02.005>
- Moriarty, D. J. W. (1982). Feeding of *Holothuria atra* and *Stichopus chloronotus* on bacteria,

- organic carbon and organic nitrogen in sediments of the great barrier reef. *Marine and Freshwater Research*, 33(2), 255–263. <https://doi.org/10.1071/MF9820255>
- Mortensen, T. (1927). *Handbook of the Echinoderms of the British Isles*, 66. Humphrey Milford. 470 p. <https://doi.org/10.1126/science.66.1721.625>
- Morton, B. (1991). Aspects of predation by *Tonna zonatum* (prosobranchia: Tonnoidea) feeding on holothurians in Hong Kong. *Journal of Molluscan Studies*, 57(1), 11–19. <https://doi.org/10.1093/mollus/57.1.11>
- Mosher, C. (1956). Observations on Evisceration and Visceral Regeneration in the Sea-cucumber *Actinopyga agassizi* Selenka. *Zoologica*, 41(1), 17–26.
- Mourão, P. A. S. & Pereira, M. S. (1999). Searching for alternatives to heparin: Sulfated fucans from marine invertebrates. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(8), 225–232. [https://doi.org/10.1016/S1050-1738\(00\)00032-3](https://doi.org/10.1016/S1050-1738(00)00032-3)
- Mourão, P. A. S., Pereira, M. S., Pavo, M. S. G., Mulloy, B., Tollefsen, D. M., Mowinckel, M. C. & Abildgaard, U. (1996). Structure and anticoagulant activity of a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. Sulfated fucose branches on the polysaccharide account for its high anticoagulant action. *Journal of Biological Chemistry*, 271(39), 23973–23984. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23973>
- Murdy, E.O. & Cowan, M.E. (1980). Observation on the behaviour and symbiotic relationship of the pearlfish *Encheliophis vermicularis* (Osteichthys: Carapidae). *Kalikasan, Philipp. J. Biol.*, 9, 309 – 312.
- Murray, A. P., Muniaín, C., Seldes, A. M. & Maier, M. S. (2001). Patagonicoside A: A novel antifungal disulfated triterpene glycoside from the sea cucumber *Psolus patagonicus*. *Tetrahedron*, 57(47), 9563–9568. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00970-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00970-X)

« N »

- Navarro, P. G. (2012). Biología y ecología de las holoturias (Echinodermata: Holothuroidea) de la isla de Gran Canaria (Atlántico central– oriental). La Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. 235 p.
- Navarro, P. G., García-Sanz, S. & Tuya, F. (2012). Reproductive biology of the sea cucumber *Holothuria sanctori* (Echinodermata: Holothuroidea). *Scientia Marina*, 76(4), 741–752. <https://doi.org/10.3989/scimar.03543.15B>
- Neto, R. R., Wolff, G. A., Billett, D. S. M., Mackenzie, K. L. & Thompson, A. (2006). The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. *Deep-Sea Research Part I*, 53(3), 516–527. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2005.12.001>
- Nigrelli, R. F. (1952). The effects of holothurin on fish, and mice with Sarcoma 180. *Zoologica : Scientific Contributions of the New York Zoological Society.*, 37(8), 89–90. <https://doi.org/10.5962/p.203461>
- Nixon, S. W. (1995). Coastal marine eutrophication: A definition, social causes, and future concerns. *Ophelia*, 41(1), 199–219. <https://doi.org/10.1080/00785236.1995.10422044>

« O »

- O'Hara, T., Stöhr, S., & Thuy, B. (2023). World Ophiuroidea Database. In O. Bánki, Y. Roskov, M. Döring, G. Ower, L. Vandepitte, D. Hobern, D. Remsen, P. Schalk, R. E. DeWalt, M. Keping, J. Miller, T. Orrell, R. Aalbu, J. Abbott, R. Adlard, E. M. Adriaenssens, C. Aedo, E. Aescht, N. Akkari, *et al.*, *Catalogue of Life Checklist* (ver. (01/2023)). <https://doi.org/10.48580/dfqj-39k>
- O'Loughlin, P. M., Eichler, J., Altoff, L., Falconer, A., Mackenzie, M., Whitfield, E. & Rowley, C. (2009). Observations of reproductive strategies for some dendrochirotid holothuroids (Echinodermata: Holothuroidea: Dendrochirotida). *Memoirs of Museum Victoria*, 66(2), 215–220. <https://doi.org/10.24199/j.mmv.2009.66.19>
- O'Loughlin, M., Kohlberg, G. & D. Schories. (2016). Sea cucumbers, Holothuroidea. In G. Schories, D., Kohlberg (Ed.), *Marine Wildlife King Geirge Island Antarctica* (pp. 220–346). Dirk Schories Publications.
- Oedjoe, M. D. R. (2017). Composition of Nutritional Content of Sea Cucumbers (Holothuroidea) in Mania Waters, Sabu Raijua Regency, East Nusa Tenggara. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 8(07), 10–12. <https://doi.org/10.4172/2155-9546.1000502>
- Ogushi, M., Yoshie-Stark, Y. & Suzuki, T. (2005). Cytostatic activity of hot water extracts from the sea cucumber in Caco-2. *Food Science and Technology Research*, 11(2), 202–206. <https://doi.org/10.3136/fstr.11.202>
- Okada, A. & Kondo, M. (2019). Regeneration of the digestive tract of an anterior-eviscerating sea cucumber, *Eupentacta quinquesemita*, and the involvement of mesenchymal-epithelial transition in digestive tube formation. *Zoological Letters*, 5(21), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40851-019-0133-3>
- Omran, N. E. & Khedr, A. M. (2015). Structure elucidation, protein profile and the antitumor effect of the biological active substance extracted from sea cucumber *Holothuria polii*. *Toxicology and Industrial Health*, 31(1), 1–8. <https://doi.org/10.1177/0748233712466135>
- Ordines, F., Ferriol, P., Moya, F., Farias, C., Rueda J.L. & García-Ruiz, C. (2019). First record of the sea cucumber *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida) in the Mediterranean Sea (Alboran Sea, western Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine*, 60, 111–115. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.137C121D>
- Özer, N. P., Mol, S. & Varlık, C. (2004). Effect of the Handling Procedures on the Chemical Composition of Sea Cucumber. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 4, 71–74.

« P »

- Pacheco, R. G., Vicente, C. P., Zancan, P. & Mourão, P. A. S. (2000). Different antithrombotic mechanisms among glycosaminoglycans revealed with a new fucosylated chondroitin sulfate from an echinoderm. *Blood Coagulation and Fibrinolysis*, 11(6), 563–573. <https://doi.org/10.1097/00001721-200009000-00009>
- Paltzat, D. L., Pearce, C. M., Barnes, P. A. & McKinley, R. S. (2008). Growth and production of California sea cucumbers (*Parastichopus californicus* Stimpson) co-cultured with suspended Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture*, 275(1–4), 124–137.

- <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.12.014>
- Pandian, T. J. (2018). *Reproduction and Development in Echinodermata and Prochordata*. CRC Press. 270 p. <https://doi.org/10.1201/9780815364733>
- Pangestuti, R. & Arifin, Z. (2018). Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. In *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 8(3) (pp. 341–351). National Taiwan University. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2017.06.007>
- Pañola-Madrigal, A., Calderon-Aguilera, L. E., Aguilar-Cruz, C. A., Reyes-Bonilla, H. & Herrero-Pérezrul, M. D. (2017). Reproductive cycle of the sea cucumber (*Isostichopus fuscus*) and its relationship with oceanographic variables at its northernmost distribution site. *Revista de Biología Tropical*, 65(1), S180–S196. <https://doi.org/10.15517/rbt.v65i1-1.31687>
- Pauly, D. (1983). Some simple methods for the assessment of tropical fish stocks. *FAO Fisheries Technical Paper No. 234*, 52 p.
- Parmentier, E. & Das, K. (2004). Commensal vs. parasitic relationship between Carapini fish and their hosts: Some further insight through $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 310(1), 47–58. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.019>
- Parmentier, E. & Michel, L. (2013). Boundary Lines in Symbiosis Forms. *Symbiosis*, 60, 1–5.
- Parmentier, E. & Vandewalle, P. (2005). Morphological adaptations of Pearlfish (Carapidae) to their various Habitats. *Fish Adaptations*, 261–276.
- Parmentier, E., Castro-Aguirre, J. L. & Vandewalle, P. (2000). Morphological comparison of the buccal apparatus in two bivalve commensal Teleostei, *Encheliophis dubius* and *Onuxodon fowleri* (Ophidiiformes, Carapidae). *Zoomorphology*, 120, 29–37. <https://doi.org/10.1007/s004359900020>
- Parmentier, E., Fine, M., Vandewalle, P., Ducamp, J.J. & Lagardère, J.P. (2006). Sound production in two carapids (*Carapus acus* and *C. mourlani*) and through the sea cucumber tegument. *Acta Zoologica*, 87, 113–119.
- Pasqueron de Fommervault, O., D’Ortenzio, F., Mangin, A., Serra, R., Migon, C., Claustre, H., Lavigne, H., D’Alcala, M. R., Prieur, L., Taillandier, V., Schmechtig, C., Poteau, A., Leymarie, E., Dufour, A., Besson, F. & Obolensky, G. (2015). Seasonal variability of nutrient concentrations in the Mediterranean Sea: Contribution of Bio-Argo floats. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 8528–8550. <https://doi.org/10.1002/2015JC011103>
- Paulay, G., & Rogacheva, A. (2023). World List of Holothuroidea. In Bánki, O., Roskov, Y., Döring, M., Ower, G., Vandepitte, L., Hobern, D., Remsen, D., Schalk, P., DeWalt, R. E., Keping, M., Miller, J., Orrell, T., Aalbu, R., Abbott, J., Adlard, R., Adriaenssens, E. M., Aedo, C., Aesch, E., Akkari, N., et al., *Catalogue of Life Checklist* (ver. (01/2023)). <https://doi.org/10.48580/dfqt-3c7>
- Pawlik, J. R. (1993). Marine Invertebrate Chemical Defenses. *Chemical Reviews*, 93(5), 1911–1922. <https://doi.org/10.1021/cr00021a012>
- Pawson, D. L. (1970). The Marine Fauna of New Zealand: Sea Cucumbers (Echinodermata :

- Holothuroidea) The Marine Fauna of New Zealand: Sea Cucumbers (Echinodermata : Holothuroidea). *Bulletin New Zeland Department of Scientific and Industrial Research*, 201, 1–69.
- Pawson, D. L. & Fell, H. B. (1965). A revided classification of the Dendrochirote Holothurians. *Breviora*, 214, 1–7.
- Pawson, D. L., Pawson, D. J. & King, R. A. (2010). A taxonomic guide to the Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*, 48(2449), 1–48. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2449.1.1>
- Pearse, A. S. (1909). Autotomy in holothurians. *Biological Bulltin*, 18, 42–49.
- Pearse, J. S. (1968). Patterns of reproductive periodicities in four species of Indo-Pacific Echinoderms. *Reproduction of Indo-Pacific Echinoderms*, 247–279.
- Perez-Ruzafa, A., Marcos, C. & Bacallado, y J. J. (1992). Holoturias (Echinodermata: Holothuroidea) De Las Islas Canarias: I. Consideraciones Generales Y Orden Aspidochirotida. *Revisita de La Academia Canaria de Ciensias*, 4, 139–162.
- Poot-Salazar, A., Hernández-Flores, Á. & Ardisson, P. L. (2014). Use of the SLW index to calculate growth function in the sea cucumber *Isostichopus badionotus*. *Scientific Reports*, 4(5151), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep05151>
- Preston, G.L. (1993). Beche-de-mer. In Wright A. & Hill L. (Eds.), *Nearshore Marine Resources of the South Pacific* (pp. 371–407). Institute of Pacific Studies, Suva; Forum Fisheries Agency, Honiara; International Centre for Ocean Development, Canada.
- Purcell, S.W. (2014b). Processing sea cucumbers into beche-de-mer: A manual for Pacific Island fishers. Noumea. Southern Cross University, Lismore, and the Secretariat of the Pacific Community. 44 pp.
- Purcell, S. W. (2014a). Value, Market Preferences and Trade of Bêche-De-Mer from Pacific Island Sea Cucumbers. *PLoS ONE*, 9(4), e95075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095075>
- Purcell, S. W. (2017). *La transformation des holothuries en bêches-de-mer : manuel à l'usage des pêcheurs océaniens*. Pacific Community, Communauté du Pacifique.
- Purcell, S. W., Lovatelli, A., Vasconcellos, M. & Ye, Y. (2010). Managing sea cucumber fisheries with an ecosystem approach. In *FAO. Fisheries Technical Paper*, 520. <http://www.fao.org/docrep/012/i1384e/i1384e00.htm>
- Purcell, S. W., Mercier, A., Conand, C., Vero, M., Lovatelli, A. & Uthicke, S. (2011). Sea cucumber fisheries: global analysis of stocks , management measures and drivers of overfishing. *Fish and Fisheries*, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2011.00443.x>
- Purcell, S. W., Samyn, Y. & Conand, C. (2012). Commercially important sea cucumbers of the world. In *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*, 6.
- Purcell, S. W., Conand, C., Uthicke, S. & Byrne, M. (2016). Ecological roles of exploited sea cucumbers. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 54, 367–386. <https://doi.org/10.1201/9781315368597>

Puspitasari, Y. E., De Bruyne, T., Foubert, K., Aulanni'am, A., Pieters, L., Hermans, N. & Tuentner, E. (2022). *Holothuria* triterpene glycosides: a comprehensive guide for their structure elucidation and critical appraisal of reported compounds. In *Phytochemistry Reviews*, 21(4). Netherlands. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09783-z>

« R »

Rafiuddin, A., M., Venkateshwarlu, U. & Jayakumar, R. (2004). Multilayered peptide incorporated collagen tubules for peripheral nerve repair. *Biomaterials*, 25(13), 2585–2594. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.075>

Rai, S., Acharya-Siwakoti, E., Kafle, A., Devkota, H. P. & Bhattarai, A. (2021). Plant-Derived Saponins: A Review of Their Surfactant Properties and Applications. *Sci*, 3(4), 44. 1–19. <https://doi.org/10.3390/sci3040044>

Rakaj, A., Fianchini, A., Boncagni, P., Lovatelli, A., Scardi, M. & Cataudella, S. (2017). Spawning and rearing of *Holothuria tubulosa*: A new candidate for aquaculture in the Mediterranean region. *Aquaculture Research*, 49(1), 557–568. <https://doi.org/10.1111/are.13487>

Ramírez-González, J., Moity, N., Andrade-Vera, S. & Mackliff, H. R. (2020). Estimation of age and growth and mortality parameters of the sea cucumber *Isostichopus fuscus* (Ludwig, 1875) and implications for the management of its fishery in the Galapagos Marine Reserve. *Aquaculture and Fisheries*, 5(5), 245–252. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2020.01.002>

Ramón, M., Lleonart, J. & Massutí, E. (2010). Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research*, 105, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.02.006>

Ramón, M., Simarro, G., Galimany, E. & Lleonart, J. (2019). Evaluation of sediment particle size selection during feeding by the holothurian *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817). *Regional Studies in Marine Science*, 31, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100763>

Ramón, M., Amor, M. J. & Galimany, E. (2022). Reproductive biology of the holothurian *Parastichopus regalis* in the Mediterranean Sea and its implications for fisheries management. *Fisheries Research*, 247, 106191. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2021.106191>

Richard, P. (2022). Observation de prédation par le baliste titan sur une holothurie à La Réunion. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 42, 96.

Ridhowati, S., Chasanah, E., Syah, D. & Zakaria, F. (2018). A study on the nutrient substances of sea cucumber *Stichopus variegatus* flour using vacuum oven. *International Food Research Journal*, 25(4), 1419–1426.

Roberts, D., Gebrur, A., Levin, V. & Manship, B. A. D. (2000). Feeding and digestive strategies in deposit-feeding holothurians. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 38, 257–310.

Robinson, A. R., Leslie, W. G., Theocharis, A. & Lascaratos, A. (2001). Mediterranean Sea Circulation. *Encyclopedia of Ocean Sciences: Second Edition*, 710–725. <https://doi.org/10.1016/B978-012374473-9.00376-3>

Robinson, G. (2013). A bright future for sandfish aquaculture. *World Aquaculture*, 18–24.

<https://doi.org/10.1038/nchem.2084>

- Robinson, G. & Lovatelli, A. (2015). Global sea cucumber fisheries and aquaculture FAO's inputs over the past few years. *FAO Aquaculture Newsletter*, 53, 55–57.
- Rodrigues, F., Valente, S., & González-Wanguemert, M. (2015). Genetic diversity across geographical scales in marine coastal ecosystems: *Holothuria arguinensis* a model species. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 463, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.12.006>
- Rodriguez, J. & Riguera, R. (1990). Lefevreiosides: Four Novel Triterpenoid Glycosides from the Sea Cucumber *Cucumaria lefevrei*. *ChemInform*, 21(14), 2620–2636. <https://doi.org/10.1002/chin.199014299>
- Rodriguez, J., Castro, R. & Riguera, R. (1991). Holothurinosides: New antitumour non sulphated triterpenoid glycosides from the sea cucumber *holothuria forskalii*. *Tetrahedron*, 47(26), 4753–4762. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)86479-6](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)86479-6)
- Rogers, A., Caal, W., Hamel, J. F. & Mercier, A. (2020). Loggerhead sea turtle *Caretta caretta* found preying on a sea cucumber on a reef in Belize. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 40, 17–19.
- Roggatz, C. C., González-Wangüemert, M., Pereira, H., Rodrigues, M. J., da Silva, M. M., Barreira, L., Varela, J. & Custódio, L. (2015). First report of the nutritional profile and antioxidant potential of *Holothuria arguinensis*, a new resource for aquaculture in Europe. *Natural Product Research*, 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1107555>
- Roggatz, C. C., González-Wangüemert, M., Pereira, H., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M. J., Barreira, L., da Silva, M. M., Varela, J. & Custódio, L. (2018). A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research*, 32(1), 116–120. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1331224>
- Roginsky, A., Singh, B., Ding, X.-Z., Collin, P., Woodward, C., Amonti, M. S. T., R.H. Bell, J. & Adrian, T. E. (2004). Frondanol®-A5p From The Sea Cucumber, *Cucumaria Frondosa* Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis In Pancreatic Cancer Cells. *The American Pancreatic Association*, 29(4).
- Ru, R., Guo, Y., Mao, J., Yu, Z., Huang, W., Cao, X., Hu, H., Meng, M. & Yuan, L. (2022). Cancer Cell Inhibiting Sea Cucumber (*Holothuria leucospilota*) Protein as a Novel Anti-Cancer Drug. *Nutrients*, 14(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu14040786>
- Ruiz, S., Font, J., Emelianov, M., Isern-Fontanet, J., Millot, C., Salas, J. & Taupier-Letage, I. (2002). Deep structure of an open sea eddy in the Algerian Basin. *Journal of Marine Systems*, 33–34, 179–195. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(02\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(02)00058-1)
- Russell, F. E. (1984). Marine Toxins and Venomous and Poisonous Marine Plants and Animals (Invertebrates). *Advances in Marine Biology*, 21, 59–217. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60099-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60099-1)

« S »

- Saang'onyo, D. S. (2011). *Optimization And Validation Of Direct Analysis In Real Time Mass Spectrometry (dart-Ms) For Quantitation Of Sugars To Advance Biofuel Production*. Faculty of the Graduate School of Eastern Kentucky University. 156 p.
- Saito, M., Kunisaki, N., Urano, N. & Kimura, S. (2002). Collagen as the major edible component of sea cucumber (*Stichopus japonicus*). *Journal of Food Science*, 67(4), 1319–1322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb10281.x>
- Sales, S., Lourenço, H. M., Pessoa, M. F., Pombo, A., Félix, P. M. & Bandarra, N. M. (2021). Chemical Composition and Omega 3 Human Health Benefits of Two Sea Cucumber Species of North Atlantic. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 30(5), 596–614. <https://doi.org/10.1080/10498850.2021.1909683>
- Samyn, Y., VandenSpiegel, D. & Massin, C. (2006). *Taxonomie des holothuries des Comores* (Vol. 1). ABC Taxa. 130 p.
- Sánchez-Solís, M. J., Gullian-Klanian, M., Toledo-López, V. & Lora-Vilchis, M. C. (2021). Proximate composition and fatty acid profile of the sea cucumber *Isostichopus badionotus* and *Holothuria floridana*. *Food Science and Technology Research*, 27(2), 319–327. <https://doi.org/10.3136/FSTR.27.319>
- Santé-Lhoutellier, V., Astruc, T., Daudin, J.-D., Kondjoyan, A., Scislowski, V., Duchène, H., Gaudichon, C. & Rémond, D. (2017). Digestion des protéines des viandes en fonction de la cuisson. *Viandes & Produits Carnés*, 1–10.
- Santos, R., Dias, S., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Tecelão, C., Pombo, A. & Pedrosa, R. (2015). The Biotechnological and Seafood Potential of *Stichopus regalis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 06, 194–204. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63019>
- Sarthou, G. & Jeandel, C. (2001). Seasonal variations of iron concentrations in the Ligurian Sea and iron budget in the Western Mediterranean Sea. *Marine Chemistry*, 74(2–3), 115–129. [https://doi.org/10.1016/S0304-4203\(00\)00119-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4203(00)00119-5)
- Savarino, P., Demeyer, M., Decroo, C., Colson, E. & Gerbaux, P. (2021). Mass spectrometry analysis of saponins. *Mass Spectrometry Reviews*, 1–30. <https://doi.org/10.1002/mas.21728>
- Savarino, P., Colson, E., Caulier, G., Eeckhaut, I., Flammang, P. & Gerbaux, P. (2022). Microwave-Assisted Desulfation of the Hemolytic Saponins Extracted from *Holothuria scabra* Viscera. *Molecules*, 27(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/molecules27020537>
- Scannella, D, Bono, G, Di Lorenzo, M, Di Maio, F, Falsone, F, Gancitano, V, Garofalo, G, Geraci, ML, Lauria, V, Mancuso, M, Quattrocchi, F, Sardo, G, Titone, A, Vitale, S, Fiorentino, F & Massi, D. (2022) How does climate change affect a fishable resource? The case of the royal sea cucumber (*Parastichopus regalis*) in the central Mediterranean Sea. *Frontiers in Marine Science*, 9:934556. <http://doi.org/10.3389/fmars.2022.934556>
- Schagerström, E. & Sundell, K. S. (2021). *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) red sea cucumber, red signal sea cucumber (Sweden), rødpølse (Norway and Denmark), Aspidochirotida, Stichopodidae. *SPC Bêche-de-mer*, 41, 22–24.
- Schneider, K., Silverman, J., Woolsey, E., Eriksson, H., Byrne, M. & Caldeira, K. (2011). Potential influence of sea cucumbers on coral reef CaCO₃ budget: A case study at One Tree Reef.

- Journal of Geophysical Research: Biogeosciences*, 116(4), 2–7. <https://doi.org/10.1029/2011JG001755>
- Schneider, K., Silverman, J., Kravitz, B., Rivlin, T., Schneider-Mor, A., Barbosa, S., Byrne, M. & Caldeira, K. (2013). Inorganic carbon turnover caused by digestion of carbonate sands and metabolic activity of holothurians. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 133, 217–223. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.08.029>
- Segal, R. & Schlösser, E. (1975). Role of glycosidases in the membranolytic, antifungal action of saponins. *Archives of Microbiology*, 104(1), 147–150. <https://doi.org/10.1007/BF00447315>
- Selenka, E. (1867). Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 17, 291–374.
- Selig, G. M., Netburn, A. N. & Malik, M. (2019). Distributions of the Pelagic Holothurian Pelagothuria in the Central Pacific Ocean as Observed by Remotely-Operated Vehicle Surveys. *Frontiers in Marine Science*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00684>
- Senadheera, T. R. L., Dave, D. & Shahidi, F. (2020). Sea cucumber derived type I collagen: A comprehensive review. *Marine Drugs*, 18, 1–44. <https://doi.org/10.3390/md18090471>
- Sewell, M. A. (1994). Small size, brooding, and protandry in the apodid sea cucumber *Leptosynapta clarki*. *Biological Bulletin*, 187(1), 112–123. <https://doi.org/10.2307/1542170>
- Shahidi, F. (2009). Nutraceuticals and functional foods: Whole versus processed foods. *Trends in Food Science and Technology*, 20(9), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.08.004>
- Shinn, G. L. (1983). *Anoplodium hymanae* sp. n., an umagillid turbellarian from the coelom of *Stichopus californicus*, a Northeast Pacific holothurian. *Canadian Journal of Zoology*, 61(4), 750–760. <https://doi.org/10.1139/z83-100>
- Siahaan, E. A., Pangestuti, R., Munandar, H. & Kim, S.-K. (2017). Cosmeceuticals Properties of Sea Cucumbers: Prospects and Trends. *Cosmetics*, 4(26), 1–12. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4030026>
- Sicuro, B. & Levine, J. (2011). Sea Cucumber in the Mediterranean: A Potential Species for Aquaculture in the Mediterranean. *Reviews in Fisheries Science*, 19(3), 299–304. <https://doi.org/10.1080/10641262.2011.598249>
- Siddique, S. & Ayub, Z. (2019). To Estimate Growth Function by the Use of SLW Index in the Sea Cucumber *Holothuria arenicola* (Holothuroidea: Echinodermata) of Pakistan (Northern Arabian Sea). *Thalassas*, 35(1), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s41208-018-0099-5>
- Siegenthaler, A., Cánovas, F., & González-Wangüemert, M. (2015). Spatial distribution patterns and movements of *Holothuria arguinensis* in the Ria Formosa (Portugal). *Journal of Sea Research*, 102, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2015.04.003>
- Silchenko, A. S., Stonik, V. A., Avilov, S. A., Kalinin, V. I., Kalinovskiy, A. I., Zakharenko, A. M., Smirnov, A. V., Mollo, E. & Cimino, G. (2005). Holothurins B2, B3, and B4, new triterpene glycosides from Mediterranean sea cucumbers of the genus *Holothuria*. *Journal of Natural Products*, 68(4), 564–567. <https://doi.org/10.1021/np049631n>
- Silchenko, A. S., Kalinovskiy, A. I., Avilov, S. A., Andryjaschenko, P. V., Dmitrenok, P. S.,

- Martyyas, E. A. & Kalinin, V. I. (2012). Triterpene glycosides from the sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. Structure and biological action of cucumariosides A1, A3, A4, A5, A6, A12 and A15, seven new minor non-sulfated tetraosides and unprecedented 25-keto, 27-norholostane aglycone. *Natural Product Communications*, 7(4), 517–525. <https://doi.org/10.1177/1934578x1200700426>
- Singh, R., MacDonald, B. A., Lawton, P. & Thomas, M. L. H. (1998). Feeding response of the dendrochirote sea cucumber *Cucumaria frondosa* (Echinodermata: Holothuroidea) to changing food concentrations in the laboratory. *Canadian Journal of Zoology*, 76(10), 1842–1849. <https://doi.org/10.1139/z98-133>
- Siokou-Frangou, I., Christaki, U., Mazzocchi, M. G., Montresor, M., Ribera D’Alcala, M., Vaque, D. & Zingone, A. (2010). Plankton in the open mediterranean Sea: A review. *Biogeosciences*, 7(5), 1543–1586. <https://doi.org/10.5194/bg-7-1543-2010>
- Slater, M. J. & Carton, A. G. (2007). Survivorship and growth of the sea cucumber *Australostichopus (Stichopus) mollis* (Hutton, 1872) in polyculture trials with green-lipped mussel farms. *Aquaculture*, 272(1–4), 389–398. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.230>
- Slater, M. J. & Chen, J. (2015). Sea Cucumber Biology and Ecology. In S. D. Brown, N. P., Eddy (Ed.), *Echinoderm Aquaculture* (pp. 47–55). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781119005810.ch3>
- Slimane-Tamacha, F., Soualili, D. L. & Mezali, K. (2019). Reproductive biology of *Holothuria (Roweothuria) poli* (Holothuroidea: Echinodermata) from Oran Bay, Algeria. *S.P.C. Bêche-de-mer Information Bulletin*, 39, 47–53.
- Sloan, N.A. (1984). Echinoderm fisheries of the world: a review. In Keegan, B. F. & O’Connor, B.D.S, *Proceedings of the Fifth International Echinoderm Conference* (pp. 109–124). Rotterdam, Netherlands, A.A. Balkema.
- Smiley, F.S., McEuen, F.S., Chaffee, C. & Krishnan, S. (1991). Echinodermata: Holothuroidea. In Giese A., Pearse J., Pearse V.B. (Eds.), *Reproduction of marine invertebrates, Vol. VI. Echinoderms and lophophorates* (pp. 663–750). Pacific Grove, California. Boxwood Press.
- Smith, C.L. (1964). Some pearlfishes from Guam, with notes on their ecology. *Pacific Science*, 18, 34–40.
- Smith, C. L., Tyler, J. C. & Feinberg, M. N. (1981). Population ecology and biology of the pearlfish (*Carapus bermudensis*) in the lagoon at Bimini, Bahamas. *Bulletin of Marine Science*, 31(4), 876–902.
- Smoluch, M., Grasso, G., Suder, P. & Silberring, J. (2019). Mass spectrometry. In *Analysis of Post-Translational Modifications Using Mass Spectrometry*. John Wiley & Sons, Inc. 418 p. <https://doi.org/10.1002/9781119250906>
- Solan, M., Cardinale, B. J., Downing, A. L., Engelhardt, K. A. M., Ruesink, J. L. & Srivastava, D. S. (2004). Extinction and ecosystem function in the marine benthos. *Science*, 306, 1177–1180. <https://doi.org/10.1126/science.1103960>
- Solís-Marín, F. A., Hooker, Y. & Laguarda-Figueras, A. (2012). Primer registro del pepino de mar

- nadador *Eynpniastes eximia* Theel, 1882 (Echinodermata: Holothuroidea) en aguas peruanas. *Revista Peruana de Biología*, 19(1), 1–3. <https://doi.org/10.15381/rpb.v19i1.793>
- Sparg, S. G., Light, M. E. & Van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2–3), 219–243. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.05.016>
- Stonik, V. A. (1986). Some terpenoid and steroid derivatives from echinoderms and sponges. *Pure and Applied Chemistry*, 58(3), 423–436. <https://doi.org/10.1351/pac198658030423>
- Stonik, V. A. & Elyakov, G. B. (1988). Secondary Metabolites from Echinoderms as Chemotaxonomic Markers. In *Biorganic Marine Chemistry, Volume 2* (pp. 43–86). Springer-Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-48346-2_2
- Stricker, S. A. (1986). The fine structure and development of calcified skeletal elements in the body wall of holothurian echinoderms. *Journal of Morphology*, 188(3), 273–288. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051880303>
- Sukmiwati, M., Ilza, M., Diharmi, A. & Sherrin, S. (2021). Antibacterial Activity of Sea Cucumber (*Stichopus ocellatus*) against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* Bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 934(1), 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/934/1/012024>
- Sukmiwati, M., Ilza, M., Putri, A. E. & Sidauruk, S. W. (2019). Antibacterial activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against *Pseudomonas aeruginosa*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 404(1), 1–6. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/404/1/012047>
- « T »
- Taboada, M. C., González, M. & Rodriguez, E. (2003). Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali*. *Nutrition Research*, 23, 1661–1670. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00175-1)
- Thao, N. P., Luyen, B. T. T., Vien, L. T., Tai, B. H., Dat, L. D., Cuong, N. X., Nam, N. H., Kiem, P. Van, Minh, C. Van & Kim, Y. H. (2014). Triterpene saponins from the sea cucumber *Stichopus chloronotus*. *Natural Product Communications*, 9(5), 615–618. <https://doi.org/10.1177/1934578x1400900505>
- Théel, H. (1886). Report on the Holothuroidea dredged by H. M. S. Challenger during the years 1873–76. Part I. Report on the Scientific Results of the Voyage of H. M. S. Challenger During the Years 1873–76. *Zoology*, 14(39), 1–290.
- Therkildsen, N. O. & Petersen, C. W. (2006). A review of the emerging fishery for the sea cucumber *Cucumaria frondosa* : Biology , policy , and future prospects. *SPC Bêche-de-Mer Information Bulletin*, 23, 16–25.
- Tian, F., Zhang, X., Tong, Y., Yi, Y., Zhang, S., Li, L., Sun, P., Lin, L. & Ding, J. (2005). PE, a new sulfated saponin from sea cucumber, exhibits anti-angiogenic and anti-tumor activities *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biology and Therapy*, 4(8), 874–882. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.8.1917>
- Tolon, T. M., Emiroglu, D., Gunay, D. & Ozgul, A. (2017). Sea cucumber (*Holothuria tubulosa*

- Gmelin, (1790) culture under marine fish net cages for potential use in integrated multi-trophic aquaculture (IMTA). *Indian Journal of Geo Marine Sciences*, 46(4), 749–756.
- Tong, Y., Zhang, X., Tian, F., Yi, Y., Xu, Q., Li, L., Tong, L., Lin, L. & Ding, J. (2005). Philinopside A, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *International Journal of Cancer*, 114(6), 843–853. <https://doi.org/10.1002/ijc.20804>
- Tortonese, E. (1965). *Fauna d'Italia Vol. 6 (VI). Echinodermata*. Edizioni Calderini, Bologna, 419 p.
- Tovar-Sánchez, A., Rodríguez-Romero, A., Engel, A., Zäncker, B., Fu, F., Marañón, E., Pérez-Lorenzo, M., Bressac, M., Wagener, T., Triquet, S., Siour, G., Desboeufs, K. & Guieu, C. (2020). Characterizing the surface microlayer in the Mediterranean Sea: Trace metal concentrations and microbial plankton abundance. *Biogeosciences*, 17(8), 2349–2364. <https://doi.org/10.5194/bg-17-2349-2020>
- Troell, M., Halling, C., Neori, A., Chopin, T., Buschmann, A. H., Kautsky, N. & Yarish, C. (2003). Integrated mariculture: Asking the right questions. *Aquaculture*, 226(1–4), 69–90. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00469-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00469-1)
- Trott, L.B. (1970). Contribution of the biology of carapid fishes (Paracanthopterygian: Gadiformes). *University of California publications in zoology*, 89, 1–41.
- Trott, L.B. (1981). A general review of the pearlfishes (Pisces, Carapidae). *Bulletin of Marine Science*, 31, 623–629.
- Trott, L.B. & Trott, E.B. (1972). Pearlfishes (Carapidae : Gadiforme) collected from Puerto Galera, Minobra, Philippines. *Copeia*, 839–843.
- Tursi, A., Mastrototaro, F., Matarrese, A., Maiorano, P. & D'Onghia, G. (2004). Biodiversity of the white coral reefs in the Ionian Sea (central Mediterranean). *Chemistry and Ecology*, 20, 107–116. <https://doi.org/10.1080/02757540310001629170>

« U »

- Unuma, T., Tsuda, N., Sakai, Y., Kamaishi, T., Sawaguchi, S., Itoh, N. & Yamano, K. (2020). Coccidian parasite in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) ovaries. *Biological Bulletin*, 238(1), 64–71. <https://doi.org/10.1086/707807>
- Uthicke, S. (1999). Sediment bioturbation and impact of feeding activity of *Holothuria (Halodeima) atra* and *Stichopus chloronotus*, two sediment feeding holothurians, at Lizard Island, great barrier reef. *Bulletin of Marine Science*, 64(1), 129–141.
- Uthicke, S. (2001). Nutrient regeneration by abundant coral reef holothurians. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 265(2), 153–170. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(01\)00329-X](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(01)00329-X)

« V »

- Van Dyck, S., Gerbaux, P. & Flammang, P. (2009). Elucidation of molecular diversity and body distribution of saponins in the sea cucumber *Holothuria forskali* (Echinodermata) by mass

- spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 152(2), 124–134. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.10.011>
- Van Dyck, S., Flammang, P., Meriaux, C., Bonnel, D., Salzet, M., Fournier, I. & Wisztorski, M. (2010a). Localization of secondary metabolites in marine invertebrates: Contribution of MALDI MSI for the study of saponins in Cuvierian tubules of *H. forskali*. *PLoS ONE*, 5(11), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013923>
- Van Dyck, S., Gerbaux, P. & Flammang, P. (2010b). Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian ocean. *Marine Drugs*, 8(1), 173–189. <https://doi.org/10.3390/md8010173>
- Van Dyck, S., Caulier, G., Todesco, M., Gerbaux, P., Fournier, I., Wisztorski, M. & Flammang, P. (2011). The triterpene glycosides of *Holothuria forskali*: Usefulness and efficiency as a chemical defense mechanism against predatory fish. *Journal of Experimental Biology*, 214(8), 1347–1356. <https://doi.org/10.1242/jeb.050930>
- VandenSpiegel, D. & Jangoux, M. (1987). Cuvierian tubules of the holothuroid *Holothuria forskali* (Echinodermata): a morphofunctional study. *Marine Biology*, 96(2), 263–275. <https://doi.org/10.1007/BF00427026>
- VandenSpiegel, D., Flammang, P., Fourmeau, D. & Jangoux, M. (1995). Fine structure of the dorsal papillae in the holothurioid *Holothuria forskali* (Echinodermata). *Tissue and Cell*, 27(4), 457–465. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(95\)80066-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(95)80066-2)
- Verbist, J.E. (1993). Pharmacological effects of compounds from Echinoderms. In: Jangoux, M. & Lawrence, L.M. (Eds.), *Echinoderm Studies*, 4 (pp. 111–186). Rotterdam. Balkema.
- Vergara, W. & Rodríguez, A. (2016). Nutritional Composition of Sea Cucumber *Isostichopus sp.* *Natural Resources*, 07, 130–137. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73013>
- Veronika, K., Edrininghe, U., Sivashanthini, K. & Athauda, A. R. S. B. (2018). Length-weight relationships of four different sea cucumber species in North-East coastal region of Sri Lanka. *Tropical Agricultural Research*, 29(2), 212. <https://doi.org/10.4038/tar.v29i2.8290>
- Vieira, R. P., Mulloy, B. & Mourao, P. A. S. (1991). Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber: Evidence for the presence of 3-O-sulfo- β -D-glucuronosyl residues. *Journal of Biological Chemistry*, 266(21), 13530–13536. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)92730-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)92730-4)
- Vincken, J. P., Heng, L., de Groot, A. & Gruppen, H. (2007). Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, 68(3), 275–297. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.008>
- Vo, N. N. Q., Fukushima, E. O. & Muranaka, T. (2016). Structure and hemolytic activity relationships of triterpenoid saponins and sapogenins. *Journal of Natural Medicines*, 71(1), 50–58. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1026-9>

« W »

- Wang, L., Xiao-qing, L., Xiao-hui, G., Ye, L., Wen-jia, Z., Chun-li, S. & Bang-zhong, Y. (2013). A Method for Determination of Exogenous Total Sugar in Dried Sea Cucumber. *Science*

- Culinaire*, 34(14), 293–297. <https://doi.org/10.7506/spkx1002-6630-201314061>
- Wang, X. H., Zou, Z. R., Yi, Y. H., Han, H., Li, N. & Pan, M. X. (2014). Variegatusides: New non-sulphated triterpene glycosides from the sea cucumber *Stichopus variegates* semper. *Marine Drugs*, 12(4), 2004–2018. <https://doi.org/10.3390/md12042004>
- Wang, Y., Tian, M., Chang, Y., Xue, C. & Li, Z. (2020). Investigation of structural proteins in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) body wall. *Scientific Reports*, 10(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75580-x>
- Watson, J. T. & Sparkman, O. D. (2007). *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, applications and strategies for data interpretation*. John Wiley & Sons, Inc. 819 p. <https://doi.org/10.1201/b13910-3>
- Watson, T. G. (1971). *Studies in steroid and triterpenoid chemistry*. University of New South Wales. 161 p.
- Webb, G. P. (2006). Dietary Supplements and Functional Foods: Second Edition. In *Dietary Supplements and Functional Foods: Second Edition*. Blackwell publishing. 242 p. <https://doi.org/10.1002/9781118788660>
- Wen, J., Hu, C. & Fan, S. (2010). Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 2469–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4108>
- Wen, S., Zhou, G., Song, S., Xu, X., Voglmeir, J., Liu, L., Zhao, F., Li, M., Li, L., Yu, X., Bai, Y. & Li, C. (2015). Discrimination of *in vitro* and *in vivo* digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteomics*, 15(21), 3688–3698. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500179>
- Wolkenhauer, S. M., Uthicke, S., Burrige, C., Skewes, T. & Pitcher, R. (2010). The ecological role of *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) within subtropical seagrass beds. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 90(2), 215–223. <https://doi.org/10.1017/S0025315409990518>
- Wu, M., Xu, L., Zhao, L., Xiao, C., Gao, N., Luo, L., Yang, L., Li, Z., Chen, L. & Zhao, J. (2015). Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Marine Drugs*, 13(4), 2063–2084. <https://doi.org/10.3390/md13042063>
- Wulandari, D. A., Murniasih, T., Sari, M., Syahputra, G., Rasyid, A., Septiana, E., Untari, F., Harahap, I. A., Ardiansyah, A., Gustini, N. & Putra, M. Y. (2021). Characterization, antioxidant and antibacterial activity of cultivated sea cucumbers from Bali, Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 744(1), 1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/744/1/012102>

« Y »

- Yamamoto, M. & Yoshida, M. (1978). Fine Structure of the ocelli of a synaptid holothurian, *Opheodesoma spectabilis*, and the effects of light and darkness. *Zoomorphologie*, 90, 1–17. <https://doi.org/10.1007/BF00993740>

- Yamana, Y. & Hamano, T. (2006). New size measurement for the Japanese sea cucumber *Apostichopus japonicus* (Stichopodidae) estimated from the body length and body breadth. *Fisheries Science*, 72(3), 585–589. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2006.01187.x>
- Yamanouchi, T. (1955). on the Poisonous Substance Contained in Holothurians. *Publications of the Seto Marine Biological Laboratory*, 4(2–3), 183–203. <https://doi.org/10.5134/174528>
- Yang, H., Hamel, J.-F. & Mercier, A. (2015). *The Sea Cucumber Apostichopus japonicus: History, Biology and Aquaculture*. Academic Press. 454 p. https://books.google.com/books?id=p_VDBAAAQBAJ&pgis=1
- Yano, A., Abe, A., Aizawa, F., Yamada, H., Minami, K., Matsui, M. & Kishi, M. (2013). The effect of eating sea cucumber jelly on Candida load in the oral cavity of elderly individuals in a nursing home. *Marine Drugs*, 11(12), 4993–5007. <https://doi.org/10.3390/md11124993>
- Yingst, J. Y. (1976). The utilization of organic matter in shallow marine sediments by an epibenthic deposit-feeding holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 23(1), 55–69. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(76\)90085-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(76)90085-X)
- Yu, S., Ye, X., Huang, H., Peng, R., Su, Z., Lian, X. Y. & Zhang, Z. (2015). Bioactive sulfated saponins from sea cucumber *Holothuria moebii*. *Planta Medica*, 81(2), 152–159. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1383404>
- Yuan, W. H., Yi, Y. H., Tang, H. F., Liu, B. S., Wang, Z. L., Sun, G. Q., Zhang, W., Li, L. & Sun, P. (2009). Antifungal triterpene glycosides from the sea cucumber *Bohadschia marmorata*. *Planta Medica*, 75(2), 168–173. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088348>
- Yudt, M. R. & Cidlowski, J. A. (2002). The glucocorticoid receptor: Coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Molecular Endocrinology*, 16(8), 1719–1726. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0106>
- « Z »
- Zamora, L. N. & Jeffs, A. G. (2013). A review of the research on the Australasian sea cucumber, *Australostichopus mollis* (Echinodermata: Holothuroidea) (Hutton 1872), with emphasis on aquaculture. *Journal of Shellfish Research*, 32(3), 613–627. <https://doi.org/10.2983/035.032.0301>
- Zhang, J., Zhang, S., Kitazawa, D., Zhou, J., Park, S., Gao, S. & Shen, Y. (2019). Bio-Mitigation Based on Integrated Multi-Trophic Aquaculture in Temperate Coastal Waters: Practice, Assessment, and Challenges. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 47(2), 212–23.
- Zhang, W., Cao, Z., Li, Y., Zhao, H., Huang, J., Liang, Z. & Huang, L. (2015). Taxonomic status of the three color variants in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Evidence from mitochondrial phylogenomic analyses. *Mitochondrial DNA*, 1–4. <https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1022765>
- Zhang, Y. F., Fan, X. J., Li, X., Peng, L. L., Wang, G. H., Ke, K. F. & Jiang, Z. L. (2008). Ginsenoside Rg1 protects neurons from hypoxic-ischemic injury possibly by inhibiting Ca²⁺ influx through NMDA receptors and L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels. *European Journal of Pharmacology*, 586(1–3), 90–99. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.12.037>

- Zhao, P., Yang, H.S. & Sun, L.N. (2013). Study on the structures and functions of feeding and locomotor organs of sea cucumber *Apostichopus Japonicus*. *Marine Science Bulletin*, 32(2), 178–183.
- Zhao, Q., Wang, J.F., Xue, Y., Wang, Y., Gao, S., Lei, M. & Xue, C.H. (2008). Comparative study on the bioactive components and immune function of three species of sea cucumber. *J Fishery Sci China*, 1, 22.
- Zhao, Q., Xue, Y., Liu, Z. D., Li, H., Wang, J. F., Li, Z. J., Wang, Y. M., Dong, P. & Xue, C. H. (2010). Differential Effects of Sulfated Triterpene Glycosides, Holothurin A1, and 24-Dehydroechinoside A, on Antimetastatic Activity via Regulation of the MMP-9 Signal Pathway. *Journal of Food Science*, 75(9), 280–288. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01837.x>
- Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X. & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42(12), 1586–1591. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.08.011>
- Zhao, Y. C., Xue, C. H., Zhang, T. T. & Wang, Y. M. (2018). Saponins from Sea Cucumber and Their Biological Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(28), 7222–7237. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01770>
- Zhou, W., Wang, Z.S. & Wang, S.H. (1999). Observation on the behavior of attaching sea cucumber seedlings. *Fisheries Science*, 16 (6), 17–19
- Zou, Z., Yi, Y., Wu, H., Yao, X., Du, L., JiuHong, W., Liaw, C. C. & Lee, K. H. (2003). Intercedensides D-I, cytotoxic triterpene glycosides from the sea cucumber *Mensamaria intercedens* lampert. *Journal of Natural Products*, 66(4), 1055–1060. <https://doi.org/10.1021/np040205b>

**Attestation de stage, communication et
publications scientifiques**

Attestation de stage, communication et publications scientifiques



Objet : attestation de stage dans le laboratoire BOMB (UMONS)

Vendredi 30/09/2022

A qui de droit,

Je soussigné, **Dr. Guillaume Caulier**, premier assistant (maître de conférences) du laboratoire de Biologie des Organismes Marins et Biomimétisme (BOMB) du **Prof. Igor Eeckhaut** de l'Université de Mons (UMONS), atteste par la présente que la **doctorante Ihcene KHODJA**, doctorante à l'université de Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem (Algérie), a réalisé un stage de recherche du **15/01/2020** au **14/02/2020** et du **16/09/2022** au **30/09/2022**. Ce stage avait pour but la caractérisation de saponines d'holothuries en collaboration avec le laboratoire de synthèse organique et spectrométrie de masse du **Prof. Pascal Gerbaux**.

Pour toute information complémentaire :



Guillaume Caulier

Teaching and Research Associate
Marine Organisms and Biomimetics
University of Mons (UMONS)

- Guillaume.caulier@umons.ac.be
- +3265373433
- +32476226822



Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Laboratoire de Protection, Valorisation des Ressources Marines et
Littorales et Systématique Moléculaire



Attestation de Participation

Le comité scientifique de la 2^{ème} Journée d'Étude sur l'Évaluation et la Valorisation des Ressources Marines Littorales (JEEVRML-2), qui s'est déroulée le 08 juin 2021 à Mostaganem, Atteste que M/Mme/Melle

KHODJA Ihcene a présenté une Communication Orale intitulée :

« Valorisation de l'holothurie royale *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1718) : Taux d'humidité, digestibilité par la pepsine et caractérisation des saponines »

Co-auteurs : MEZALI Karim

Pr. SOUALILI Dina Lila

Présidente du Comité Scientifique

SOUALILI DINA LILA

Professeur en Sciences

Naturelles

Pr. MEZALI Karim

Président du Comité d'Organisation





Multiple records and polymorphism of *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) (Echinodermata: Holothuroidea: Stichopodidae) along the Algerian coast

IHCENE KHODJA^{1,3}, KARIM MEZALI^{1*} & AHMED S. THANDAR²

¹Protection, Valorization of Coastal Marine Resources and Molecular Systematics Laboratory (PVCMRMS), Department of Marine Science and Aquaculture. Faculty of Natural Sciences and Life. Abdelhamid Ibn Badis University—Mostaganem, PO Box 227, Route nationale N° 11, Kharrouba, 27000, Mostaganem, Algeria.

²School of Life Sciences, University of KwaZulu-Natal, P/Bag X54001, Durban 4000, South Africa.

✉ thandara@ukzn.ac.za; <https://orcid.org/0000-0002-7368-5560>

³✉ ihcene.khodja.etu@univ-mosta.dz; <https://orcid.org/0000-0003-3905-974X>

*Corresponding author: ✉ karim.mezali@univ-mosta.dz; <https://orcid.org/0000-0002-7222-9002>

Abstract

The family Stichopodidae is represented in the Mediterranean Sea by the genus *Parastichopus* which includes two non-endemic species; *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) and *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817). On the Algerian coast (southwestern Mediterranean Sea), two morphotypes of *P. regalis* were observed, one with dark spots on the dorsal surface and the other non-spotted. In total, 65 individuals of *P. regalis* were recorded from 22 stations along the Algerian coast during an oceanographic campaign. Twelve individuals (6 of each morphotype) were used for a comparative study of the morphological (including endoskeletal) characteristics. Table ossicles, the only ossicles of the body wall of the two morphotypes of *P. regalis*, are here compared with regard to the disk diameter of the tables and the total area of the surface of the disc. Statistical analysis did not show any significant differences between the spotted and the non-spotted morphotypes.

Key words: Holothurians, morphotype, ossicles, southwestern Mediterranean Sea, statistical analysis

Introduction

The family Stichopodidae includes a diverse assemblage of sea cucumber species, most of which are found in the Indo-Pacific (Byrne *et al.* 2010). It includes 9 genera and 35 species (Worms 2020). It is represented in the Mediterranean Sea by only two species of the genus *Parastichopus*. This genus was established by Clark (1922) and, according to Byrne *et al.* (2010), it is restricted to the North Atlantic Ocean. It differs from the genus *Stichopus* which is characteristic of the tropical and subtropical regions of the world. The genus is characterized by the absence of “button” type ossicles (Byrne *et al.* 2010). The family was, until recently, classified in the order Aspidochirotida which was found to be paraphyletic and replaced with the monophyletic Holothuriida. The family Stichopodidae, formerly of the Aspidochirotida, has been transferred to the order Synallactida, which also includes the families Deimatidae and Synallactidae (see Miller *et al.* 2017).

Parastichopus regalis occurs between 5–800 m in depth (Clark 1922; Tortonese 1965; Mercier & Hamel 2013; Ramón *et al.* 2019) on sea-bottoms composed mainly of sand, silt and clay (Ramón *et al.* 2019). In the circalittoral zone of the Mediterranean Sea, there is a sticky mud setting formed in association with the cnidarian *Alcyonium palmatum* Pallas, 1766 in the biocenosis of coastal terrigenous muds (Michez *et al.* 2011, 2014). Like most Synallactida, *Parastichopus regalis* is a deposit-feeder, which ingests fine sediment in size ranging from 0.103 µm to 1 mm (Ramón *et al.* 2019). This species is distributed in the East Atlantic [from the Angola (Cherbonnier 1965) to Northern Ireland, including the Canary Islands (Hernández *et al.* 2013), the Azores (Madeira *et al.* 2018), Madeira (Augier 1985) and Portugal (Santos *et al.* 2015)], the West Atlantic [West Indies and the Gulf of Mexico (Ramón *et al.* 2010)] and the Mediterranean Sea where it has been reported from several regions [Alboran Sea, including Spain and West Algeria (Abad *et al.* 2007; Ramón *et al.* 2010; González-Wangüemert *et al.* 2014; Maggi & González-

Wangüemert 2015; Galimany *et al.* 2018; Benzait *et al.* 2020); the Ionian Sea (Tursi *et al.* 2004); Malta Island (Leonard *et al.* 2020); the Sea of Marmara (Aydin 2008) and the Aegean Sea (Aydin 2018)].

Few studies have been devoted to *P. regalis* in the Mediterranean Sea. These include studies on its distribution and fishery (Ramón *et al.* 2010), its endosymbiont *Carapus acus* Brünnich, 1768 (Gonzalez-Wanguemert *et al.* 2014), the genetic differentiation between its populations (Maggi & Gonzalez-Wanguemert 2015), its immune responses at different temperatures for its implication in aquaculture (Galimany *et al.* 2018) and some qualitative aspects of its feeding behaviour (Elakkeri *et al.* 2021).

From an economic point of view, *P. regalis* is of great commercial interest, its longitudinal muscle bands called *espardeña* or *llongo* in Spain, are highly relished by local consumers and Asian tourists. It is considered to be the most expensive sea-product, reaching a price of USD 154.47 / kg in markets (Ramón *et al.* 2010) and USD 51.09 / 165 g in luxury restaurants (Conand, pers. comm.). In Catalonia, the Balearic Islands and Valencia, only longitudinal muscle bands, *espardeña* are sold, unlike in Galicia where the entire animals are sold (Gonzalez-Wanguemert *et al.* 2018). From a pharmaceutical and nutritional point of view, it has been shown that the extract from the body wall of *P. regalis* exhibits antimicrobial, antifungal and antitumor activity (Santos *et al.* 2015) and also a balanced nutrition suitable for human consumption (Roggatz *et al.* 2018) due to its significant percentage of polyunsaturated fatty acid (Santos *et al.* 2015). This is what allows it to be used as food or nutraceutical supplements to improve the risk of certain diseases, such as improving the brain's resistance to damage and preventing atherosclerosis (Massaro *et al.* 2010; Blondeau 2016; Mecheta *et al.* 2020).

Intraspecific morphological variation has been observed in several species of sea cucumbers, ranging from differences in colour pattern, as is the case in *Holothuria (Metriatyla) scabra* Jaeger, 1833 (Al-Rashdi *et al.* 2007), *Bohadschia vitiensis* Semper, 1868 (Kim *et al.* 2013) and *Apostichopus japonicus* Selenka, 1867 (Xing *et al.* 2017), and/or the appearance of spots in some individuals of *Holothuria (Platyperona) sanctori* Delle Chiaje, 1923 (Mezali 2008, 2011, 2013) and *Bohadschia ocellata* Jaeger, 1833 (Kim *et al.* 2013), thus necessitating a study of polymorphism to determine if one is dealing with one or more species/morphotypes. Indeed, phylogenetic analyses based on mitochondrial DNA sequences have revealed that the spotted and non-spotted variety of *H. (P.) sanctori* and the three-colour variants of *A. japonicus* (red, green and black) each represent a single species (Mezali 2011, 2013; Mezali & Francour 2012; Zhang *et al.* 2015).

The main purpose of this study was therefore to determine, based only on their morphological (including endoskeletal) characters, if the two-colour morphs (morphotypes) of *P. regalis*, co-existing on the Algerian coast, are just colour variants of the same species or represent two different species.

Material and methods

Sampling area

The study was carried out along the Algerian coast between 35° 11.392' N and 37° 05.766' N and 02° 05.491' W and 08° 18.627' E (Figure 1). The individuals of *P. regalis* were collected aboard the Oceanographic Research Vessel *Grine Belkacem* between June 13 and July 16, 2019, under the auspice of the MEDITS program (International bottom trawl survey in the Mediterranean). This used the GOC73 fishing gear rigged with Morgère bottom doors, in order to assess the fishery resources of target species, discover new fishing areas and collect benthic invertebrate samples for systematic study. We relied on an indirect method to recover by-catches generally consisting of non-target benthic invertebrates such as echinoderms (sea cucumbers and starfish) and decapod crustaceans (i.e. crabs). For the systematic study of *P. regalis*, we concentrated on four stations in the west [two in Mostaganem (14 and 15), one in Arzew (17) and one in Bouzedjar (18)] (Table 1; Figure 1).

Biological material examined

In total, 65 individuals of *P. regalis* were collected from 22 stations at depths varying between 36 m and 532 m. Each individual was immediately photographed (dorsal and ventral surfaces) using a Canon EOS 1200D camera, measured (contracted length) and weighed (total wet weight), and then preserved in Ethanol (96%). Preservation was done immediately because the specimens tend to degrade very quickly. Among the collected individuals, twelve (12) were selected for morphological (including endoskeletal) study. Of these, six (6) were spotted and six (6) non-spotted. All measurements of relevant organs of each individual (viz. body wall thickness, calcareous ring diameter,

longitudinal muscle thickness and lengths of Polian vesicle, stone canal and tentacle ampullae) were done with a digital caliper to the precision of 0.01 mm.

Tentacles, papillae, pedicels, cloaca and fragments of the body wall from the dorsal, ventral and anal regions, were dissolved in pure commercial bleach and rinsed several times with distilled water to extract ossicles (Samyn *et al.* 2006). A drop of the solution was then placed on a slide, covered with a coverslip and observed under the Optika light microscope at X4 and X10 magnification for a general view, then at X40 magnification for details of the ossicle assemblage. The ossicles were then photographed using the Optika View Lite software. Measurements of the ossicles were done using ImageJ software to the precision of 0.001 μm . For statistical analysis only the diameter and area of a 120 table discs of spotted and non-spotted individuals are here considered (10 for each individual). Differences between samples were tested with the Kruskal-Wallis H test because the data was found to be non-parametric after testing the normality and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk test and the Levene test, respectively. When significant differences were detected, a Dunn's multiple comparison post-hoc test was performed to identify the source of the differences.

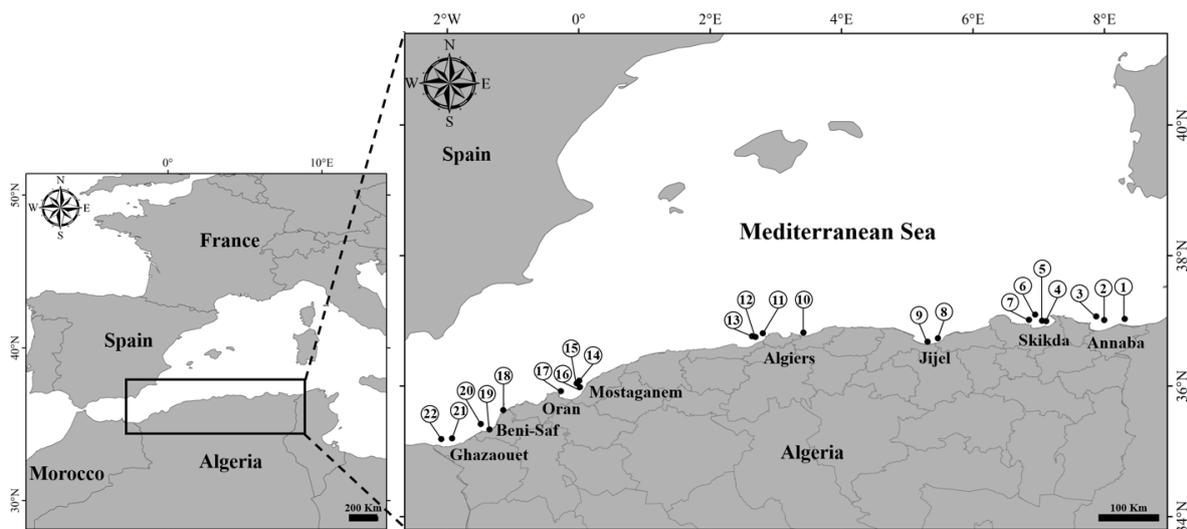


FIGURE 1. Sampling stations of *Parastichopus regalis* along the Algerian coast (the numbered circles represent the sampled stations - see Table 1 for details of the stations).

TABLE 1. *Parastichopus regalis* sampling stations and their geographic coordinates. (D) Depth in meter. Numbers in parentheses indicate station number.

Stations	Coordinates	D	Stations	Coordinates	D
El Kala (1)	37°01.808'N, 8°18.627'E	85	Bou-Ismaïl (12)	36°45.266'N, 2°41.519'E	159
Annaba (2)	37°00.715'N, 7°59.982'E	97	Bou-Ismaïl (13)	36°45.854'N, 2°38.281'E	318
Annaba (3)	37°04.127'N, 7°52.547'E	180	Mostaganem (14)	36°05.077'N, 0°00.490'E	225
Skikda (4)	37°00.272'N, 7°03.249'E	148	Mostaganem (15)	36°02.611'N, 0°01.823'W	117
Skikda (5)	36°59.679'N, 7°06.926'E	110	Mostaganem (16)	35°59.109'N, 0°01.089'E	68
Skikda (6)	37°05.766'N, 6°56.790'E	532	Arzew (17)	35°55.443'N, 0°16.166'W	77
Skikda (7)	37°01.114'N, 6°51.236'E	254	Bouzedjar (18)	35°38.068'N, 1°08.766'W	96
Ziama (8)	36°43.998'N, 5°28.031'E	138	Beni-Saf (19)	35°20.186'N, 1°21.456'W	36
Bejaia (9)	36°40.992'N, 5°18.612'E	79	Beni-Saf (20)	35°25.160'N, 1°29.428'W	125
Boumerdes (10)	36°49.377'N, 3°25.259'E	171	Ghazaouet (21)	35°12.066'N, 1°55.639'W	118
Ain Benian (11)	36°48.756'N, 2°48.164'E	157	Ghazaouet (22)	35°11.392'N, 2°05.491'W	113

Results and discussion

Systematic results

Order Synallactida Miller, Kerr, Paulay, Reich, Wilson, Carvajal & Rouse, 2017

Family Stichopodidae Haeckel, 1896

Genus *Parastichopus* Clark, 1922

Parastichopus regalis (Cuvier, 1817) non-spotted morph

Figures 2–3, Table 2

Pudendum regale Cuvier, 1817: 22.

Holothuria triquetra Delle Chiaje, 1828: 71; Delle Chiaje, 1841: 4.

Holothuria regalis Grube, 1840: 33; Sars, 1859: 96–98, Figures 78–81.

Stichopus regalis Selenka, 1867: 317; Koehler, 1921: 182, Figure 138; 1927: 237, Figure 24; Théel, 1886: 194; Marenzeller, 1893: 15; Mortensen, 1927: 391; Cattaneo, 1981: 15; Peres & Picard, 1964: 91–92, 104, 116; Clark, 1922: 63, plate 1, Figures 17–18; Deichmann, 1940: 193, plate 32, Figures 1–8.

Eostichopus regalis Cutress & Miller, 1982: 720.

Parastichopus regalis Rowe unpublished data (Worms 2020).

Material examined. LPVCMRMS2019.301; LPVCMRMS2019.302; LPVCMRMS2019.303; LPVCMRMS2019.304, Mostaganem, Algeria, 36° 05.077' N, 00° 00.490' E, 225 m, 03 June 2019, 4 specs. LPVCMRMS2019.308, Mostaganem, Algeria, 36° 02.611' N, 00° 01.823' W, 117 m, 03 June 2019, 1 spec. LPVCMRMS2019.309, Mostaganem, Algeria, 35° 59.109' N, 00° 01.089' E, 68 m, 03 June 2019, 1 spec.

Description Body length 10.50–20.50 cm, contracted width 3–5.90 cm, weight 6.34–71.24 g. Body soft, body fairly depressed, trivium flattened, sole like, bivium arched, both separated by a distinct lateral fold on each side bearing large papillae. Dorsal surface (Figure 2A) reddish-brown, characterized by evenly distributed white conical papillae. Ventral surface (Figure 2B) with several rows of podia arranged in three distinct zones, two outer zones whitish brown in colour and mid-ventral one bright red colour forming a distinct groove. Mouth ventral, surrounded by 20 peltate tentacles arranged in two circles; internal and external (Figure 2C). Anus terminal. Mouth and anus each bordered by two papillae (about 1 cm), larger than those of the general body wall (Figure 2D1). Small black spots, each about 1 mm in diameter, cover the both dorsal and ventral surfaces. Thickness of the dorsal integument 1.69–4.74 mm and that of the ventral integument 1–5.01 mm. Calcareous ring delicate, average diameter 10.65 mm. Longitudinal muscles flat, attached to body wall, paired, each about 5.66 mm thick, whitish in life but changing to cream in alcohol, thin at point of insertion to the calcareous ring. Cuvierian tubules absent. Tentacle ampullae about 1.10 to 13 mm (Figure 2E2) in length (Table 2). Polian vesicle (Figure 2E3) single, mean length about 19.23 mm, arising from water vascular ring (Figure 2F) ventrally. Stone canal also single, mean length 9.68 mm, arising from water vascular ring dorsally; madreporite spherical, attached to dorsal body wall (Figure 2G4). Gonadal tubules thin, white, in two tufts, one on each side of dorsal mesentery (Figure 2H). Dissected specimen, based on microscopic observations of the gonad; determined to be a mature female at stage IV of development.

Ossicles. Ossicles of the anal region (Figure 3A), dorsal surface (Figure 3B) and ventral surface (Figure 3C) appear identical and include only tables. Tables (Figures 3Aa; 3Ba; 3Ca) appear more or less symmetrical, disc flat, perforated by 3–6 central holes (4 holed ones most abundant), and 20–60 marginal holes; disc margin smooth; mean diam. of disc, 99.667 μm and mean area 7571.660 μm^2 . Spire 4-pillared (Figure 3Ac), about 67.521 μm high, tapered at end, and with 3–4 cross-bars. Rods of papillae and pedicels (Figures 3Ab; 3Bb; 3Cb) appear straight or curved, smooth or spiny, with an enlarged, perforated, central part and slightly expanded perforated ends; mean length 222.837 μm . Anal region comprises also plates (Figure 3Ad). End plates of pedicels complete or reduced (Figure 3Cc), the former oval to irregular, the latter rounded, slightly concave medially, all plates with small holes, the medial holes the largest; smaller plates average 146.424 μm in length, 86.150 μm in width; average diameter of circular plates 209.472 μm . Tentacles (Figure 3D) present three types of rods; elongated (Figure 3Da), arched (Figure 3Db) and robust, branched type with perforated ends (Figure 3Dc). Cloaca (Figure 3E) possesses dichotomous branched rods.

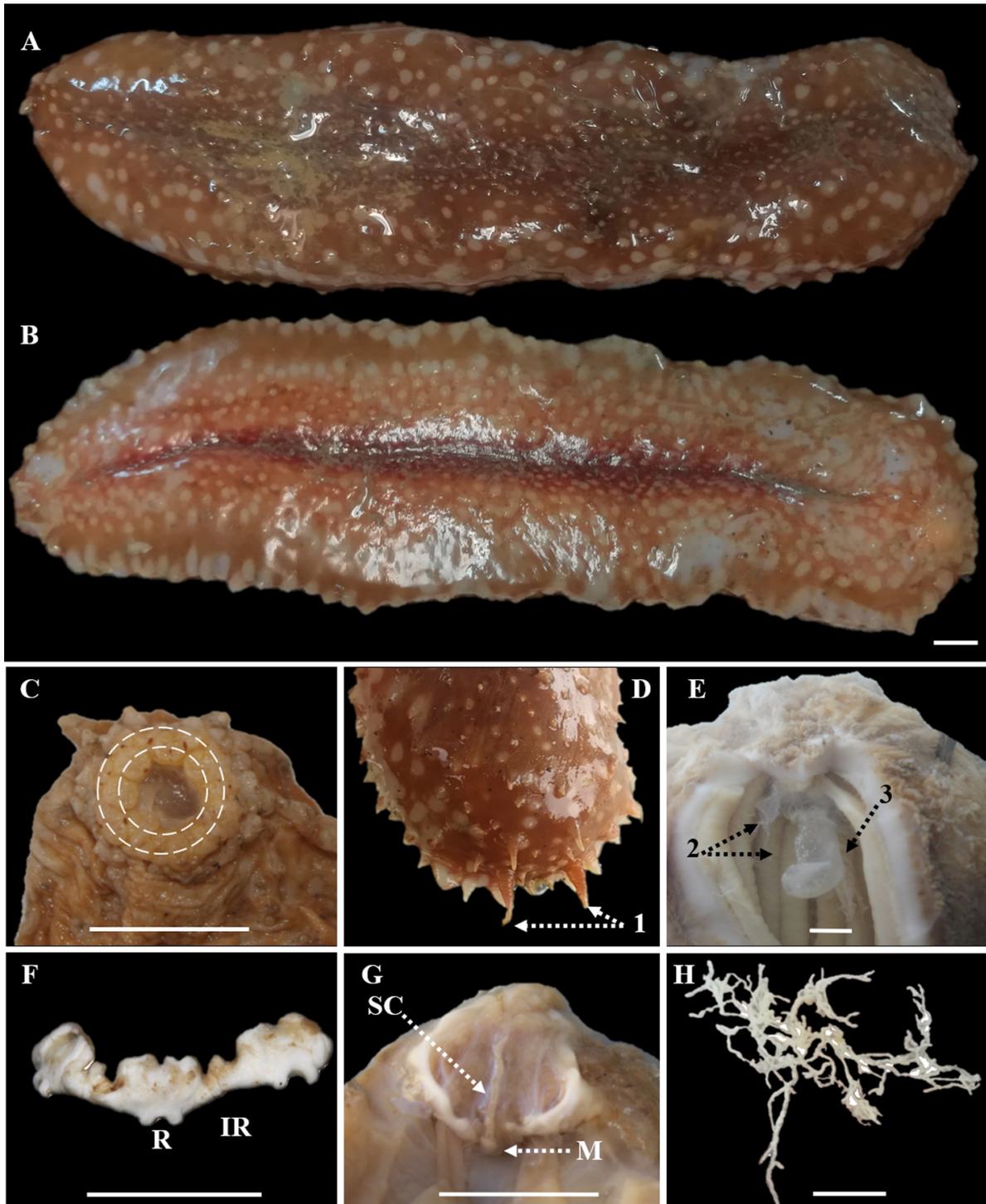


FIGURE 2. Morphological characters of non-spotted *P. regalis*. **A.** Dorsal view. **B.** Ventral view. **C.** Arrangement of tentacles in two circles (indicated by the dotted circles). **D.** **1.** Larger papillae on either side of mouth. **E.** **2.** Tentacle ampullae. **E.** **3.** Polian vesicle. **F.** Calcareous ring (R: Radial and IR: Interradial plates). **G.** **4.** Stone canal (SC) and madreporite (M). **H.** Gonadal tubules. Scale bar = 1 cm.

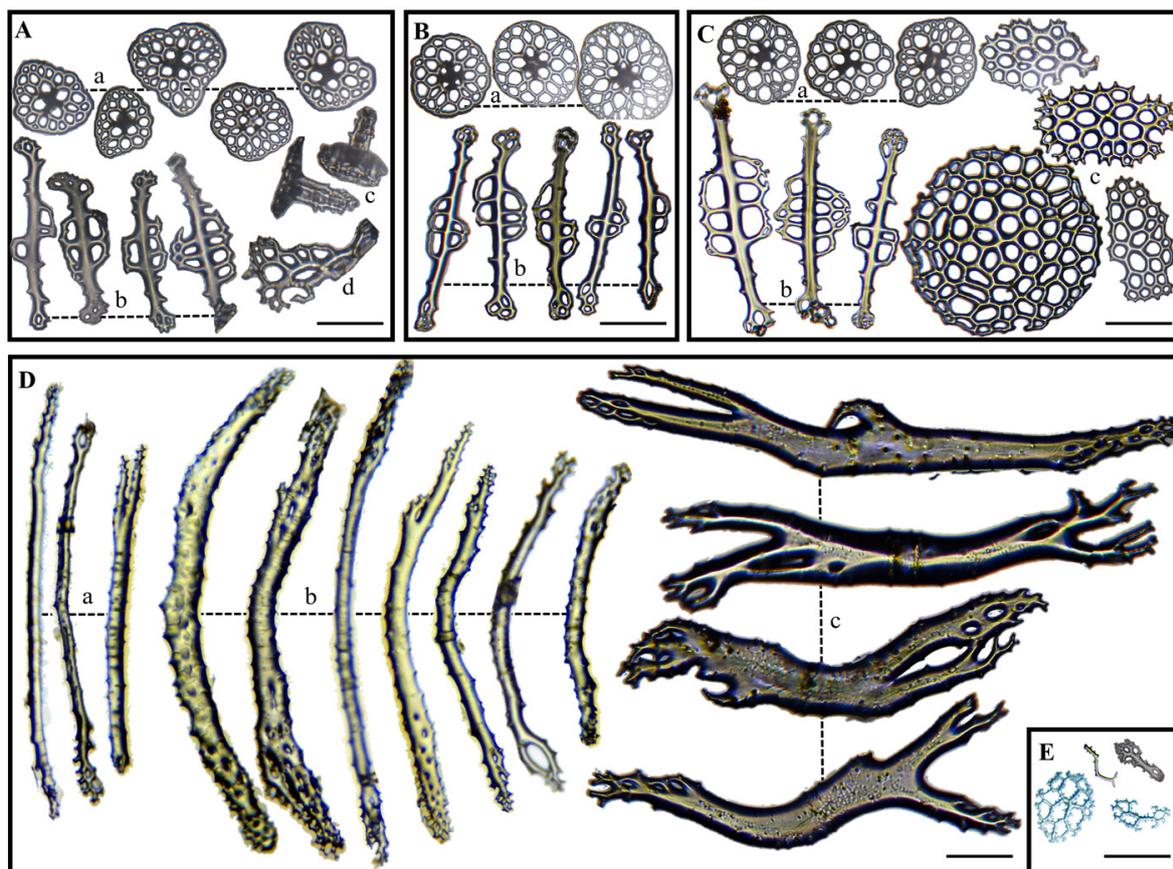


FIGURE 3. Ossicles of *P. regalis* (non-spotted) from different parts of the body. **A.** Anal region. **a.** Tables. **b.** Rods. **c.** Spires of the tables. **d.** Plates. **B.** Dorsal surface and papillae. **a.** Tables. **b.** Rods. **C.** Ventral surface and tube feet. **a.** Tables. **b.** Rods. **c.** End plates. **D.** Tentacles. **a.** Elongated rods. **b.** Arched rods. **c.** Branched rods. **E.** Cloaca. Scale bar = 100 µm.

Parastichopus regalis (Cuvier, 1817) spotted morph

Figures 4–5, Table 2

Material examined. LPVCMRMS2019.305; LPVCMRMS2019.306, Mostaganem, Algeria, 36° 05.077' N, 00° 00.490' E, 225 m, 03 June 2019, 2 specs. LPVCMRMS2019.307, Mostaganem, Algeria, 36° 02.611' N, 00° 01.823' O, 117 m, 03 June 2019, 1 spec. LPVCMRMS2019.311; LPVCMRMS2019.312, Bouzedjar, Algeria, 35° 38.068' N, 01° 08.766' O, 96 m, 04 June 2019, 2 specs. LPVCMRMS2019.310, Arzew, Algeria, 35° 55.444' N, 00° 00.490' E, 77 m, 04 June 2019, 1 spec.

Description. Specimens (Figures 4A and 4B) preserved length 14–24.90 cm, contracted width 4–7.50 cm; total weight 25.07–143.50 g. Each with 5–7 brownish to dark red blotches on the bivium when alive (Figure 4A1) disappearing after storage in ethanol. Morphological characters similar to non-spotted specimens described above. Dorsal body wall 1.23–6.19 mm thick; ventral body wall 1.22–6.77 mm thick. Polian vesicle single, average length 17.57 mm; stone canal also single, average length about 10.71 mm. Calcareous ring about 13 mm in diameter. Longitudinal muscles flat, attached to body wall, about 6.75 mm in thickness (Table 2).

Ossicles. Anal region (Figure 5A), dorsal (Figure 5B) and ventral surfaces (Figure 5C) present the same type of ossicles as non-spotted specimens. Table discs (Figures 5Aa; 5Ba; 5Ca) 97.926 µm in average diameter and 7099.090 µm² in total area. Spire 4-pillared, about 67.521 µm high, 64.691 µm wide, with 3–4 cross-bars. Papillae and pedicels include perforated rods (Figures 5Ab; 5Bb; 5Cb) as in the non-spotted morph, 265.026 µm in average length. Complete pedicel end plates (Figure 5Cc) circular, average diameter 439.218 µm; oval end plates 197.766 µm in mean length and 84.328 µm in mean width. Cloaca (Figure 5D) presents dichotomously branched rods. Ten-

tacle rods (Figure 5E) elongated (Figure 5Ea), or arched (Figure 5Ec), branched (Figure 5Eb) and dichotomously branched rods (Figure 5Ed).

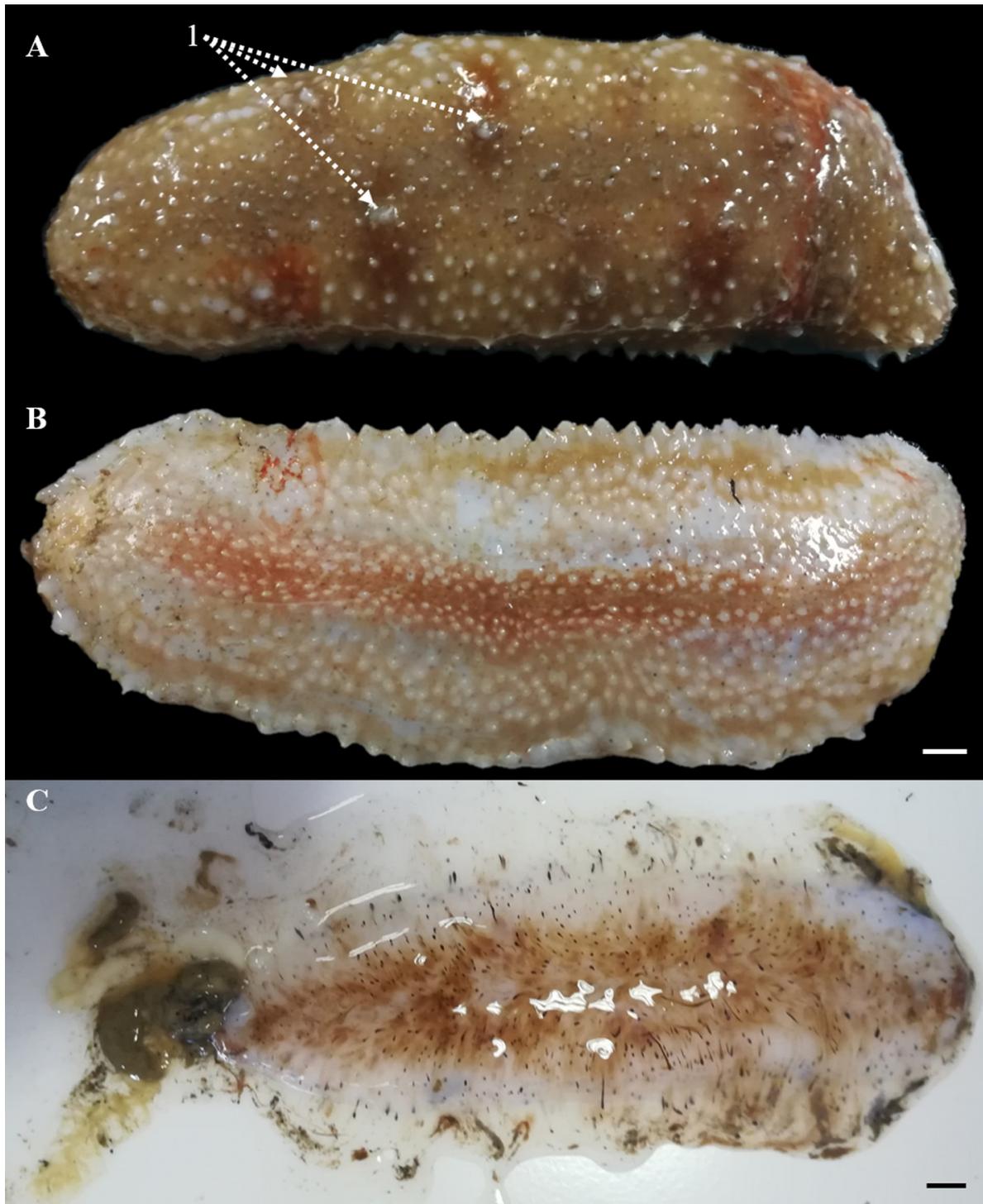


FIGURE 4. Morphological characters of spotted *P. regalis*. **A.** Dorsal view, blotches indicated by arrows (1). **B.** Ventral view spotted individual (note no blotches). **C.** Degradation of the dermis after 2 hours (individual not immediately preserved in ethanol). Scale bar = 1 cm.

TABLE 2. Morphological and anatomical characters of the two morphotypes of *P. regalis* (non-spotted and spotted).

Morphotype	Non-spotted	Spotted
Morphological characters		
Ventral body shape	sole like	
Contracted length (cm)	10.50–20.50	14–24.90
Contracted width (cm)	3–5.90	4–7.50
Consistency of body wall	soft, gelatinous	
Total weight (g)	9.34–71.24	25.07–143.50
Dorsal body wall thickness (mm)	1.69–4.74	1.23–6.19
Ventral body wall thickness (mm)	1–5.01	1.22–6.77
Colour of the trivium	brown and bright red in the center	
Colour of the papillae	White	
Shape of the bivium	Arched	
Colour of the bivium	reddish brown	reddish brown with 5–7 dark blotches
Disposition of the pedicels (bivium)	In more or less regular rows	
Position of the mouth	Ventral	
Position of the anus	Terminal	
Number of tentacles	20	20
Internal characters (mm)		
Tentacle ampullae length	1.10–13	5.94–13
Polian vesicle length	12.54–25.19	12.53–21.69
Stone canal length	6.97–13	8.12–12.37
Shape of the madreporite	Spherical	
Longitudinal muscles edges	Flat, attached	
Average width of longitudinal muscles	3.39–7.30	4.49–13.79
Diameter of calcareous ring	8.75–12.28	9.28–17.20
Endoskeletal characters mean (µm)		
Diameter of table discs	99.668	97.926
Length of perforated rods of papillae and pedicels	222.837	265.026
Length of oval end plates	146.424	197.766
Width of oval end plates	86.150	84.328
Diameter of the complete end plates	209.472	439.218
Length of elongated rods of tentacles	600.410	809.232
Length of arched rods of tentacles	663.903	459.545
Length of branched rods of tentacles	788.369	688.710

Remarks. Both spotted and non-spotted *Parastichopus regalis* individuals degrade very quickly if they are not immediately preserved in ethanol, after collection. The dermis rapidly disintegrates and the texture of the body becomes gelatinous, spreading out on the support on which the specimen is placed (Figure 4C). This reaction is probably due to the stress during fishing operation and/or exposure to light or change in pressure and/or temperature, since fished from waters more than 36 m deep. The ability to lose a piece of dermis from the body wall when in danger has been observed in many holothuroids (Kropp 1982).

The use of formalin, although good for fixation, does not allow for better preservation because the body does not keep its original shape and the ossicles tend to corrode rapidly. Hence, alcohol is recommended although the bright red colour of the ventral surface as well as the dark spots on the dorsal surface (when present) do disappear. The thickness of the body wall can vary from one individual to another since the general texture of the body wall is very soft, thus not rigid enough to maintain the original form.

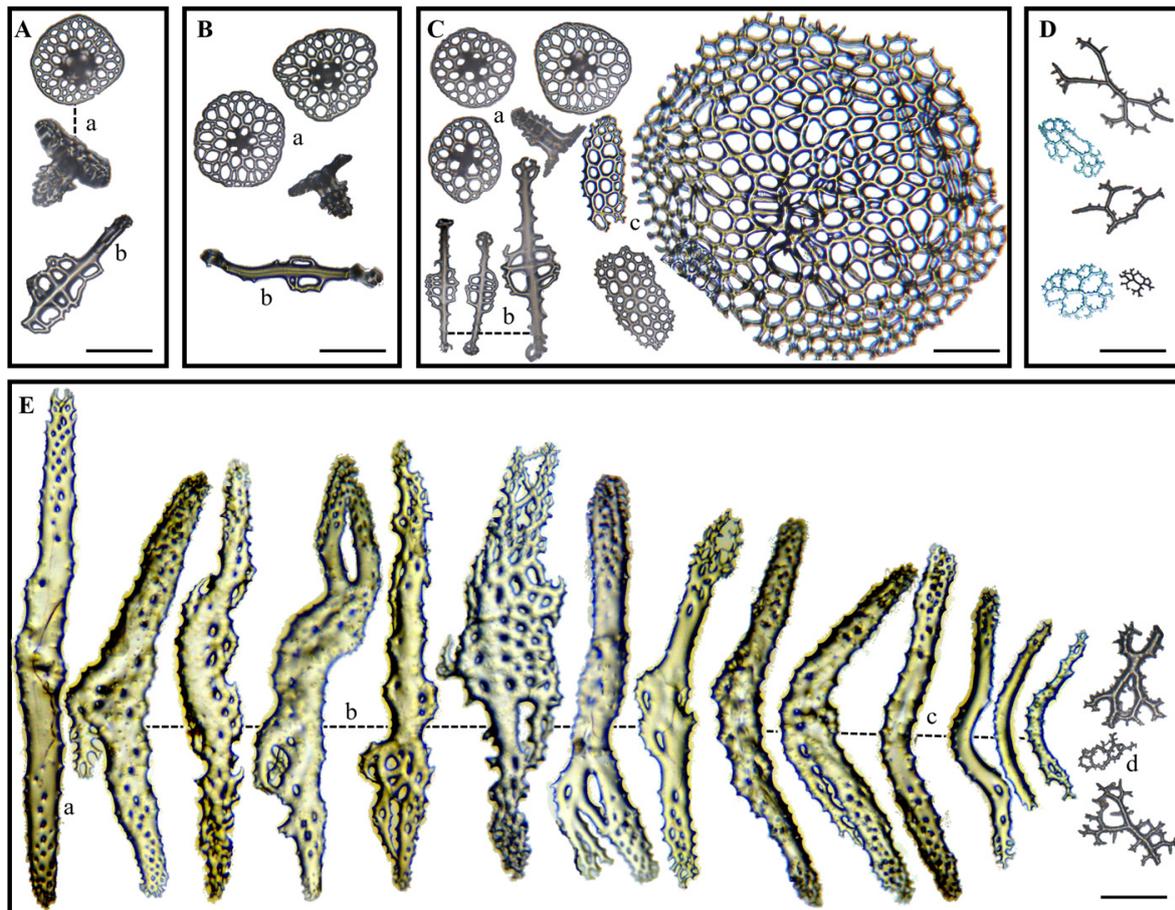


FIGURE 5. Ossicles of *P. regalis* (spotted) from different parts of the body. **A.** Anal region. **a.** Tables. **b.** Rods. **B.** Dorsal surface and papillae. **a.** Tables. **b.** Rods. **C.** Ventral surface and tube feet. **D.** Cloaca. **a.** Tables. **b.** Rods. **c.** End plates. **E.** Tentacles. **a.** Elongated rods. **b.** Branched rods. **c.** Arched rods. **d.** Dichotomously branched rods. Scale bar = 100 μ m.

Statistical analysis

Significant differences were found between individuals [Kruskal-Wallis test ($H = 34.724$, $df = 11$, $p\text{-value} = 2.75 * 10^{-4}$) and ($H = 34.006$, $df = 11$, $p\text{-value} = 3.61 * 10^{-4}$)] for the diameter and the area of the table discs.

Multiple comparisons of the diameter and surface means allowed us to highlight these differences (Figure 6). As far as the diameter of the table discs is concerned, there is a significant difference between the individuals 2019.303 NS/ 2019.308NS/ 2019.305S (first group) and the individuals 2019.307S/ 2019.3010S/ 2019.311S (second group), the latter having a significantly smaller table diameter than the first group. As far as the area of the disc is concerned, a significant difference exists between the same groups except individual 2019.311S for the second one. The other specimens showed no significant differences in diameter and area of the table discs.

Discussion

Parastichopus regalis has been recorded from several localities along the Algerian coast from West to East, the regions where the species was not recorded on the map does not necessarily indicate its absence there, as trawling was not conducted in these areas.

External morphology of *P. regalis* showed the presence of two morphotypes, non-spotted and spotted individuals. The latter differ only in the presence of brown to dark red blotches on the dorsal surface. Comparison of the internal anatomy (including the endoskeleton) showed no differences between the two morphotypes. Both present

the same anatomical characters: a single Polian vesicle, a single stone canal with spherical madreporite, longitudinal muscles thin at anterior extremities where they insert on the anterior part of the radial plates of the calcareous ring (Figure 2F). A statistical analysis (Figure 6) with regard to the diameter and area of the table discs showed no significant differences between the spotted and non-spotted individuals, however, within each group, we can observe significant differences between some individuals which of course are not related to the presence or absence of blotches but perhaps to the size of the specimens.

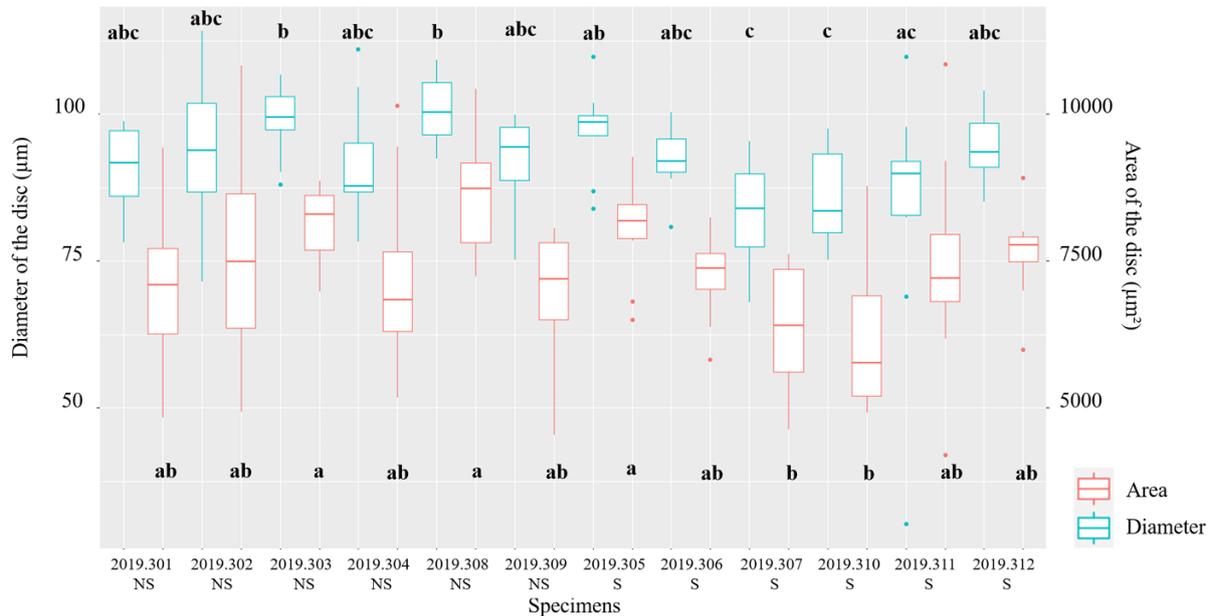


FIGURE 6. Boxplot showing the comparison of the diameter (blue) and the area (red) of the table discs of the two morphotypes of *P. regalis* (S: Spotted and NS: Non-spotted), using the Kruskal-Wallis test with Dunn’s multiple comparison. Different letters represent a significant difference (p -value < 0.05) between individuals, while equal letters mean there is no significant difference.

Examination of the endoskeleton revealed the same types of ossicles in both morphotypes: tables of similar form in body wall; perforated rods of similar form in papillae and pedicels; end plates of various form and size in the pedicels, in cloaca with spiny dichotomous branched deposits; and tentacle rods of different shapes, some with spiny dichotomous branches. Table 2 shows that certain measurements of the various morphological or anatomical (including endoskeletal) characters (e.g. length of tentacle ampullae, width of longitudinal muscles, diameter of calcareous ring, length of body wall plates, diameter of the complete end plates, size of the reduced end plates, length and robustness of some tentacle rods) are greater in spotted individuals. We speculate that these differences, are probably due to their larger size and degree of contraction and perhaps not due to taxonomic differences between the two forms.

According to Zhang *et al.* (2015), body colour may be related to environmental factors. It is probable that the blotches observed in some specimens of *P. regalis* may change or disappear, depending on the light intensity in their habitats or alternatively appear when they move into lower light intensity. Such changes have been reported for *Holothuria (P.) sanctori* (see Mezali 2013). Previous studies on sea cucumbers revealed that they are active nocturnally (Lin *et al.* 2013) and exhibit negative phototaxis (Zhou *et al.* 1999). According to Liu *et al.* (2020), the light-sensitive organs are the tentacles, tube feet and papillae which contract by light stimulation and recover when the stimulation is removed, thus suggesting that these organisms have a photoreceptor system. In the synaptid sea cucumber, *Opheodesoma spectabilis*, pigmented spots on the tentacles base have been shown to be involved in phototactic behavior (Berill 1966) and histologically, the ocellus of this species is composed of sensory cells underlain by numerous bundles of tentacular nerve fibers (Yamamoto & Yoshida 1978). Although these ocelli-like structures were detected in the connective tissue and at the base of tentacles, the mechanism underlying the photoreceptor system has not been elucidated (Zhao *et al.* 2013). Hence, phototactic responses reported for various holothuroids cannot be ruled out for changes in body colouration of the *P. regalis* and would make an interesting future study.

Body colour is a factor affecting the sensitivity of sea cucumbers to light, these animals gradually inhabit the deeper seabed with the development of body colour and thickening of the dermis (Liu *et al.* 2020). In fact, those species which are light-coloured live mainly at shallower depths where the light intensity is high while the dark-coloured forms frequent the deep shadow areas where there is low or no light at all (Lin 2011), thus, the light-coloured individuals are more resistant to high light intensity (Lin 2011). A study carried out on two morphotypes of *Apostichopus japonicus* (albino and normal), showed that the albinos can tolerate longer periods of exposure to intense light (Lin *et al.* 2013). One of the hypotheses that has been made to explain this phenomenon assumes that the body wall of light individuals can reflect more and absorb less light than a dark-coloured body surface (Lin *et al.* 2013). In the case of *P. regalis*, we speculate that the spotted individuals may be found in dark or shaded areas and non-spotted individuals occur at shallower depths and hence exposed to more light, to allow for better reflection of light and hence resistant to high light exposure. However, during our collections we observed that a single fishing haul (same depth and substrate), would bring up individuals of the two morphotypes (spotted and non-spotted). This may debunk the above speculation but can be explained by the fact that this species tends to be covered with sand, thus creating a cover on its dorsal surface, causing the disappearance of the spots in some individuals which are buried deeper, as a single haul covers a long distance varying between 0.926 to 3.704 km.

To confirm our results, we anticipate molecular and histological work to elucidate our conclusions regarding the lack of any significant taxonomic differences between the two morphs here reported on. This will also allow to determine the possible presence of the other non-endemic species *Parastichopus tremulus* which has been reported in the Alboran Sea (Western Mediterranean) (Ordines *et al.* 2019). In addition, we anticipate that, in order to justify our speculation regarding the phototactic responses, to conduct experiment on the two morphs by controlling the intensity and time of light exposure in order to determine if they behave the way we speculate.

Acknowledgement

The first author thanks the administrative officials of the National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (NCRDEA) and the Faculty of National Sciences and Life (University of Mostaganem) for allowing her to embark and participate in sampling specimens of *P. regalis* during the ALDEM 2019 oceanographic campaign aboard the Research Vessel *Grine Belkacem* during summer 2019.

Funding

This research was carried out as part of the collaboration between the Abdelhamid Ibn Badis University of Mostaganem and the National Center for Research and Development of Fisheries and Aquaculture (NCRDFA) and funded by the General Directorate of Scientific Research and Technological Development (DGRSDT), under the authority of the Minister for Scientific Research (MESRS- Algeria). AST is indebted to the University of KwaZulu-Natal and the National Research Foundation (NRF), South Africa for some financial support

References

- Abad, E., Preciado, I., Serrano, A. & Baro, J. (2007) Demersal and epibenthic assemblages of trawlable grounds in the northern Alboran Sea (western Mediterranean). *Scientia Marina*, 71 (3), 513–524.
<https://doi.org/10.3989/scimar.2007.71n3513>
- Al-Rashdi, K.M., Claereboudt, M.R. & Al-busaidi, S.S. (2007) Density and Size Distribution of the Sea Cucumber, *Holothuria scabra* (Jaeger, 1935), at Six Exploited Sites in Mahout Bay, Sultanate of Oman. *Agricultural and Marine Sciences*, 12, 43–51.
<https://doi.org/10.24200/jams.vol12iss0pp43-51>
- Augier, H. (1985) Première contribution à l'étude et à la cartographie des biocénoses marines benthiques de l'île de Madère. *Boletim do Museu Municipal do Funchal*, 37, 86–129.
- Aydin, M. (2008) The commercial sea cucumber fishery in Turkey. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 28, 40–41.
- Aydin, M. (2018) Biometry, density and the biomass of the commercial sea cucumber population of the Aegean Sea. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 19 (6), 463–474.

<https://doi.org/10.4194/1303-2712-v19602>

- Benzait, H., Khodja, I., Soualili, D.L. & Mezali, K. (2020) Note on *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) from the Sidi-Medj-doub area of Mostaganem, Algeria. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 40, 43–45.
- Berrill, M. (1966) The ethology of the Synaptid Holothurian, *Opheodesoma spectabilis*. *Canadian Journal of Zoology*, 44, 457–482.
<https://doi.org/10.1139/z66-046>
- Blondeau, N. (2016) The nutraceutical potential of omega-3 alpha-linolenic acid in reducing the consequences of stroke. *Biochimie*, 120, 49–55.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.06.005>
- Brünnich, M.T. (1768) *Ichthyologia Massiliensis, sistens piscium descriptiones eorumque apud incolas nomina*. Accedunt Spolia Maris Adriatici, Hafniae et Lipsiae, 110 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.5782>
- Byrne, M., Rowe, F. & Uthicke, S. (2010) Molecular taxonomy, phylogeny and evolution in the family Stichopodidae (Aspidochirotrida: Holothuroidea) based on COI and 16S mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 1068–1081.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.013>
- Cattaneo, M. (1981) Contribution à l'étude du plateau continental de la mer Ligure et haute Tyrrhénienne. II. Echinodermata (1). *Cahiers de Biologie Marine*, 22, 11–24.
- Cherbonnier, G. (1965) Holothurides. *Expédition océanographique belge dans les eaux côtières africaines de l'Atlantique Sud (1948–1949): résultats scientifiques*, Brussels, 3 (2), 1–23.
- Clark, H.L. (1922) The holothurians of the genus *Stichopus*. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*, 65 (3), 39–74.
- Cutress, B.M. & Miller, J.E. (1982) *Eostichopus arnesoni* new genus and species (Echinodermata: Holothuroidea) from the Caribbean. *Bulletin of Marine Science*, 32 (3), 715–722.
- Cuvier, G. (1817) *Le règne animal distribué d'après son organisation, pour servir de base à l'histoire naturelle des animaux et d'introduction à l'anatomie comparée. Volume 2. Contenant les Reptiles, les Poissons, les Mollusques et les Annélides*. Deterville, Paris, 528 pp.
- Deichmann, E. (1940) Report on the holothurians, collected by the Harvard-Havana expeditions 1938 and 1939, with a revision of the Molpadonia of the Atlantic Ocean. *Memorias de La Sociedad Cubana de Historia Natural*, 14 (8), 188–240.
- Delle Chiaje, S. (1823) [1824?] Descrizione zoologica ed anatomica di alcune specie di Oloturie. In: Delle Chiaje, S. (Ed.), *Memorie su la storia e notomia degli animali senza vertebre del Regno di Napoli. Vol. 1*. Fratelli Fernandes, Napoli, pp. 77–116.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.10021>
- Delle Chiaje, S. (1828) *Memoire sulla Storia e Notomia degli Animali senza vertebre del Regno di Napoli. Vol. 3*. Fratelli Fernandes, Napoli, 214 pp.
- Delle Chiaje, S. (1841) *Descrizione e notomia degli animali invertebrate della Sicilia citeriore. Osservati vivi negli anni 1822–1830. Tome 4*. C. Batelli, Napoli, 368 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.10031>
- Elakkeri, M., Mezali, K., Khodja, I., Belbachir, N., Benzait, H. & Soualili, D.L. (2021) Gut content analysis of *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) from the west Algerian coast. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 41, 15–18.
- Galimany, E., Baeta, M. & Ramón, M. (2018) Immune response of the sea cucumber *Parastichopus regalis* to different temperatures: implications for aquaculture purposes. *Aquaculture*, 497, 357–363.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.005>
- González-Wangüemert, M., Maggi, C., Valente, S., Martínez-Garrido, J. & Vasco Rodrigues, N. (2014) *Parastichopus regalis*—The main host of *Carapus acus* in temperate waters of the Mediterranean Sea and northeastern Atlantic Ocean. *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 34, 38–42.
- González-Wangüemert, M., Domínguez-Godino, J.A. & Cánovas-García, F. (2018) Problemática de las pesquerías de pepino de mar en Europa y Turquía. *Revista Eubacteria*, 37, 4–8.
- Grube, A.E. (1840) *Actinien, Echinodermen und Wurmer des Adriatischen und Mittelmeers*. Königsberg, 106 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.23025>
- Gunnerus, J.E. (1767) Beskrifning på trenne Norrska Sjö-Kråk, Sjö-Pungar kallade. *kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar*, 28, 114–124.
- Haeckel, E. (1896) *Systematische Phylogenie. Zweiter Theil: Systematische Phylogenie der wirbellosen Thiere (Invertebrata)*. Georg Reimer, Berlin, 720 pp.
- Hernández, J.C., Clemente, S., Tuya, F., Pérez-Ruzafa, A., Sangil, C., Moro-Abad, L. & Bacallado-Aránega, J.J. (2013) Echinoderms of the Canary Islands, Spain. In: Alvarado, J.J., Solís-Marín, F.A. (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg, pp. 471–510.
<https://doi.org/10.1007/978-3-642-20051-9>
- Jaeger, G.F. (1833) *De Holothuriis*. Gessnerianis, Turici, 40 pp.
- Kim, S.W., Kerr, A.M. & Paulay, G. (2013) Colour, confusion, and crossing: Resolution of species problems in *Bohadschia* (Echinodermata: Holothuroidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 168, 81–97.
<https://doi.org/10.1111/zoj.12026>

- Koehler, R. (1921) Faune de France. In: Lechevalier, P. (Ed.), *Echinoderms*. P. Lechevalier, Paris, pp. x–210.
- Kropp, R.K. (1982) Responses of five holothurian species to attacks by a predatory gastropod, *Tonna perdix*. *Pacific Science*, 36 (4), 445–452.
- Leonard, C., Evans, J., Knittweis, L., Aguilar, R., Alvarez, H., Borg, J.A., Garcia, S. & Schembri, P.J. (2020) Diversity, distribution, and habitat associations of deep-water Echinoderms in the Central Mediterranean. *Marine Biodiversity*, 50 (5), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s12526-020-01095-3>
- Lin, C.G. (2011) *Research and comparison of important structural parameters of artificial reefs*. PhD Thesis, Ocean University of China, Qingdao. [unknown pagination]
- Lin, C., Zhang, L., Liu, S., Gao, S., Xu, Q. & Yang, H. (2013) A comparison of the effects of light intensity on movement and growth of albino and normal sea cucumbers (*Apostichopus japonicus* Selenka). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 46 (6), 351–366. <https://doi.org/10.1080/10236244.2013.841350>
- Liu, X., Chenggang, L., Sun, L., Liu, S., Sun, J. & Yang, H. (2020) Behavioural response of different epithelial tissues of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) to light and differential expression of the light-related gene Pax6. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 53 (2), 73–85. <https://doi.org/10.1080/10236244.2020.1767505>
- Madeira, P., Stefanni, S. & Ávila, S.P. (2018) Non-destructive tissue sampling and the use of PCR-RFLPs in two edible sea cucumbers from the North-eastern Atlantic, *Holothuria mammata* Grube, 1840 and *H. sanctori* Delle Chiaje, 1823 (Echinodermata: Holothuroidea). *The European Zoological Journal*, 85 (1), 88–93. <https://doi.org/10.1080/24750263.2018.1438529>
- Maggi, C. & González-Wangüemert, M. (2015) Genetic differentiation among *Parastichopus regalis* populations in the Western Mediterranean Sea: Potential effects from its fishery and current connectivity. *Mediterranean Marine Science*, 16 (3), 489–501. <https://doi.org/10.12681/mms.1020>
- Marenzeller, E. von (1893) Polychaeten des Grundes, gesammelt 1890, 1891 und 1892. *Denkschrift der Königl. Akademie der Wissenschaften Wien, Mathematische und Naturwissenschaftliche Klasse*, 60, 25–48.
- Massaro, M., Scoditti, E., Carluccio, M.A. & De Caterina, R. (2010) Nutraceuticals and prevention of atherosclerosis: Focus on ω -3 polyunsaturated fatty acids and Mediterranean diet polyphenols. *Cardiovascular Therapeutics*, 28 (4), 13–19. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5922.2010.00211.x>
- Mecheta, A., Hanachi, A., Jeandel, C., Arab-Tehrany, E., Bianchi, A., Velot, E., Mezali, K. & Linder, M. (2020) Physicochemical properties and liposomal formulations of hydrolysate fractions of four sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) from the Northwestern Algerian coast. *Molecules*, 25 (2972), 1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25132972>
- Mercier, A. & Hamel, J.-F. (2013) *Parastichopus regalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species*, 2013, e.T180298A1612492. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T180298A1612492.en>
- Mezali, K. (2008) *Phylogénie, systématique, dynamique des populations et nutrition de quelques espèces d'holothuries aspidochirotes (Holothuroidea : Echinodermata) inféodées aux herbiers de Posidonies de la région Algéroise*. Thèse de Doctorat d'état, Université des Sciences et Technologie Houari Boumediene, Algérie, 208 pp.
- Mezali, K. (2011) Some insights on the phylogeny of Algerian shallow-water sea cucumber species (Holothuroidea: Aspidochirotida). *SPC Beche-de-Mer Information Bulletin*, 31, 45–47.
- Mezali, K. & Francour, P. (2012) Les holothuries aspidochirotes de quelques sites des côtes algériennes : révision systématique et relations phylogénétiques. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, 137, 177–192.
- Mezali, K. (2013) Polymorphism in *Holothuria (Platyperona) sanctori* from the Algerian coastal area. *Rapport du Congrès de la Commission Internationale pour l'Exploration Scientifique de la Mer Méditerranée*, 40, 647.
- Michez, N., Dirberg, G., Bellan-Santini, D., Verlaque, M., Bellan, G., Pergent, G., Pergent-Martini, C., Labrune, C., Francour, P. & Sartoretto, S. (2011) *Typologie des biocénoses benthiques de Méditerranée, Liste de référence française et correspondances*. *Rapport SPN 2011-13*. MNHN, Paris, 48 pp.
- Michez, N., Fourt, M., Aish, A., Bellan, G., Bellan-Santini, D., Chevaldonné, P., Fabri, M.-C., Goujard, A., Harmelin, J.-G., Labrune, C., Pergent, G., Sartoretto, S., Vacelet, J. & Verlaque, M. (2014) *Typologie des biocénoses benthiques de Méditerranée Version 2*. *Rapport SPN 2014-33*. MNHN, Paris, 26p.
- Miller, A.K., Kerr, A.M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N.G., Carvajal, J.I. & Rouse, G.W. (2017) Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 110–131. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.02.014>
- Mortensen, T. (1927) *Handbook of the Echinoderms of the British Isles*. Oxford University Press, London, 494 pp. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.6841>
- Ordines, F., Ferriol, P., Moya, F., Farias, C., Rueda J.L. & García-Ruiz, C. (2019) First record of the sea cucumber *Parastichopus tremulus* (Gunnerus, 1767) (Echinodermata: Holothuroidea: Aspidochirotida) in the Mediterranean Sea (Alboran Sea, western Mediterranean). *Cahiers de Biologie Marine*, 60, 111–115. <https://doi.org/10.21411/CBM.A.137C121D>
- Pallas, P.S. (1766) *Elenchus zoophytorum sistens generum adumbrationes generaliores et specierum cognitarum succintas*

- descriptions, cum selectis auctorum synonymis*. Fransiscum Varrentrapp, Haggae, 451 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.6595>
- Peres, J.M. & Picard, J. (1964) Nouveau manuel de bionomie benthique de la Méditerranée. *Receuil des Travaux de la Station Marine d'Endoume*, 31 (47), 1–137.
- Ramón, M., Lleonart, J. & Massutí, E. (2010) Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research*, 105, 21–27.
<https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.02.006>
- Ramón, M., Simarro, G., Galimany, E. & Lleonart, J. (2019) Evaluation of sediment particle size selection during feeding by the holothurian *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817). *Regional Studies in Marine Science*, 31, 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.rsma.2019.100763>
- Roggatz, C.C., González-Wangüemert, M., Pereira, H., Vizetto-Duarte, C., Rodrigues, M.J., Barreira, L., Da Silva, M.M., Varela, J. & Custódio, L. (2018) A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research*, 32, 116–120.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1331224>
- Samyn, Y., Van Denspiegel, D. & Massin, C. (2006) Taxonomie des holothuries des Comores. *ABC Taxa*, 1, 1–130.
- Santos, R., Dias, S., Pinteus, S., Silva, J., Alves, C., Tecelão, C., Pombo, A. & Pedrosa, R. (2015) The Biotechnological and Seafood Potential of *Stichopus regalis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 6, 194–204.
<https://doi.org/10.4236/abb.2015.63019>
- Sars, M. (1859) Bidrag til Kundskaben om Middelhavets Littoral Fauna, Reisebemærkninger fra Italien. (2den Afhandling). *Nyt Magazin for Naturvidenskaberne*, 10 (1), 57–155.
- Selenka, E. (1867) Beiträge zur Anatomie und Systematik der Holothurien. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 17, 291–374.
- Semper, C. (1868) *Holothurien. Reisen im Archipel der Philippinen von Dr. C. Semper in Würzburg. II. Wissenschaftliche Resultate I*. Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig, 288 pp.
<https://doi.org/10.5962/bhl.title.11687>
- Théel, H. (1886) Report on the Holothuroidea dredged by H. M. S. Challenger during the years 1873–76. Part I. Report on the Scientific Results of the Voyage of H. M. S. Challenger During the Years 1873–76. *Zoology*, 14 (39), 1–290.
- Tortonese, E. (1965) *Fauna d'Italia Vol. 6 (VI). Echinodermata*. Edizioni Calderini, Bologna, 419 pp.
- Tursi, A., Mastrototaro, F., Matarrese, A., Maiorano, P. & D'Onghia, G. (2004) Biodiversity of the white coral reefs in the Ionian Sea (central Mediterranean). *Chemistry and Ecology*, 20, 107–116.
<https://doi.org/10.1080/02757540310001629170>
- WoRMS (2020) *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817). Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=149898> (accessed 27 Nov. 2020)
- WoRMS (2021) Stichopodidae Haeckel, 1896. Available from: <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=123184> (accessed 20 June 2021)
- Xing, L., Sun, L., Liu, S., Li, X., Miao, T., Zhang, L. & Yang, H. (2017) Comparison of pigment composition and melanin content among white, light-green, dark-green, and purple morphs of sea cucumber, *Apostichopus japonicus*. *Acta Oceanologica Sinica*, 2017, 1–7.
<https://doi.org/10.1007/s13131-017-1056-5>
- Yamamoto, M. & Yoshida, M. (1978) Fine Structure of the ocelli of a synaptid holothurian, *Opheodesoma spectabilis*, and the effects of light and darkness. *Zoomorphologie*, 90, 1–17.
<https://doi.org/10.1007/BF00993740>
- Zhang, W., Cao, Z., Li, Y., Zhao, H., Huang, J., Liang, Z. & Huang, L. (2015) Taxonomic status of the three color variants in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*): Evidence from mitochondrial phylogenomic analyses. *Mitochondrial DNA*, 1–4.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2015.1022765>
- Zhao, P., Yang, H.S. & Sun, L.N. (2013) Study on the structures and functions of feeding and locomotor organs of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Marine Science Bulletin*, 32 (2), 178–183.
- Zhou, W., Wang, Z.S. & Wang, S.H. (1999) Observation on the behavior of attaching sea cucumber seedlings [J]. *Fisheries Science*, 16 (6), 17–19.

Proximate composition and *in vivo* digestibility of the integument of *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) collected from the Mostaganem area in the western Mediterranean Sea

Ihcene Khodja¹ and Karim Mezali^{1*}

Abstract

The exploitation of sea cucumbers in Algeria began a few years ago but only targets species of the genus *Holothuria*. Another species belonging to the order Synallactida (*Parastichopus regalis*) with important nutritional and economic value is also present along the Algerian coast. This species is caught in depths of over 50 m by professional fishers as bycatch but it is not consumed or sold. Studies devoted to this species are few. The aim of this study was to evaluate the quality of this species' tegument through the evaluation of moisture, lipid and ash contents as well as its digestibility by the gastric enzyme pepsin. Forty-two individuals of *P. regalis* were collected in four stations of the Mostaganem region. The integument of *P. regalis* individuals were freeze-dried to determine the water content, lipid content, ash content and its *in vitro* digestibility by pepsin. The results obtained showed a high-water content (90.98 ± 0.71 %), a low lipid content (1.40 ± 0.57 %), an ash content of 40.45 ± 0.54 % and a good digestibility by pepsin (46.96 ± 3.08 %). These results were compared and discussed with those found in the literature.

Keywords: Sea cucumber, integument, approximate composition pepsin, occidental Algerian basin

Introduction

The depletion of sea cucumbers of the genus *Holothuria* has led to the exploration of new areas in several regions of the world, including Algeria (Mezali and Slimane-Tamacha 2020). But this exploitation has not yet considered species belonging to other genera such as *Parastichopus regalis*, which is the only representative of the order Synallactida recently found along the Algerian coast (Benzait et al. 2020; Khodja et al. 2021). This is probably due to its inaccessibility as this species lives in depths of 50 m or more. Indeed, *P. regalis* is caught incidentally by small-scale fisheries and trawlers that consider it as worthless bycatch (Benzait et al. 2020). On the other hand, in Spain, *P. regalis* is highly valued for its five muscle bands and represents the most expensive seafood product in Catalan markets, reaching a price of EUR 130/kg (Ramón et al. 2010). Several other representatives of this family are exploited worldwide, including *Parastichopus tremulus* and species of the genera *Thelenota* and *Stichopus* (Dissanayake and Stefansson 2010). Sea cucumbers also have important nutritional values and have long been used in traditional medicine in Asian countries (Khotimchenko 2015) because they contain bioactive compounds that reduce the risk of certain chronic diseases, and they improve health by meeting some basic nutritional needs (Pangestuti and Arifin 2018). These bioactive compounds include polyunsaturated fatty acids and triterpene glycosides (saponins) (Caulier et al. 2016; Mecheta et al. 2020). In the Mediterranean, several studies have detailed the composition of holothurian species of the genus *Holothuria* (Wen et

al. 2010; Aydin et al. 2011; Roggatz et al. 2015; Gonzalez-Wangüemert et al. 2018; Mecheta and Mezali 2019; Mecheta et al. 2020). However, few studies have been done on species of the genus *Parastichopus*. As far as we know, the chemical composition of *P. regalis* has been studied only by Santos et al. (2015) in Portugal and by Roggatz et al. (2018) in Spain. Hence, the interest of this study whose purpose is to evaluate the quality of *P. regalis* integument through the study of its moisture, lipid and ash contents as well as its digestibility by the gastric enzyme pepsin.

Methodology

This study was carried out on 42 individuals of *Parastichopus regalis* from four stations in the region of Mostaganem on the western Algerian coast ($36^{\circ}02'36.66''\text{N}$ and $00^{\circ}01'49.38''\text{W}$; $36^{\circ}05'4.62''\text{N}$ and $00^{\circ}00'29.40''\text{E}$; $35^{\circ}59'6.54''\text{N}$ and $00^{\circ}01'5.34''\text{E}$; $36^{\circ}27'58.68''\text{N}$ and $00^{\circ}38'25.86''\text{E}$). Sampling was carried out in June 2020 by small-scale fisheries in the area. In the laboratory, measurements were carried out the contracted body length (CBL) of the individuals (± 0.10 mm), wet weight of the integument (TWW) (± 0.001 g) and thickness of the integument (TT) (± 0.01 mm). After these measurements were recorded, the integument was frozen for biochemical analysis.

Five frozen integuments were selected for biochemical analysis. These integuments were freeze-dried (Christ Alpha 2-4 LD plus) to remove all water without altering their chemical composition by high temperatures, then weighed

¹ Protection and Development of Marine and Coastal Resources and Molecular Systematics Laboratory. Department of Marine Sciences and Aquaculture, Faculty of Natural and Life Sciences, Abdelhamid Ibn Badis University, Mostaganem 27000, PO Box 227, Algeria

* Author for correspondence: karim.mezali@univ-mosta.dz

dry (DTW) to determine the moisture content according to the following formula and the wet/dry weight ratio:

$$\text{Moisture content (\%)} = \frac{\text{Wet weight} - \text{Dry weight}}{\text{Wet weight}} \times 100$$

The *in vitro* digestibility of the integument of *P. regalis* individuals was performed using a digestive enzyme (pepsin 1:10,000). This step was performed in three replicates on three different individuals following the protocol of Escudero et al. (2010) and modified by Wen et al. (2015). For this study, 0.5 g of dry integument was homogenised twice in 2 ml of distilled water for 1 min at 6000 rpm/min. The whole was centrifuged twice for 1 min at 6000 rpm/min, then the pH was adjusted to 2 with HCL (1 M) before adding pepsin 1:10,000 with an amount of 5% based on the dry weight of the integument. The mixture was kept at 37°C for 2 h, then the pH was adjusted to 7 with NaOH (1 M) to inactivate the pepsin. The undigested integument was dried at 60°C for 72 h and then weighed. The digestibility of the integument by pepsin was calculated according to the following formula:

$$\text{DT (\%)} = \left(\frac{\text{Wt} - \text{Wi}}{\text{Wt}} \right) \times 100$$

Where DT = digestibility of the integument by pepsin, Wt = dry weight of the integument before pepsin digestion, and Wi = dry weight of the integument not digested by pepsin.

The extraction of lipids from the integument of *P. regalis* was performed according to the method of Folch et al. (1957) and later modified by Low and Ng (1987) on two individuals. A total of 1 g of freeze-dried integument samples was dissolved in 120 ml of 2:1 (v/v) chloroform/methanol mixture. The mixture was homogenised for 2 h and then filtered through Whatman No 1 filter paper, and 30 ml (v/4) of 0.73% NaCl was added. The solution was left to decant for 2 h then the chloroform was filtered over sodium sulphate and recovered in a previously weighed flask. The methanol was washed with 40 ml of chloroform and 10 ml of 0.58% NaCl and left to decant for 30 min. The chloroform containing the lipids was also filtered over sodium sulphate, recovered and then removed at 53°C. The lipid content was deduced by weight difference.

To determine the ash content of *P. regalis* integument, approximately 1 g of sample was incinerated completely at 600°C for 6 h. The ash content expressed as a percentage is the difference between the weight of the samples before and after incineration. This step was performed on two individuals.

Results and discussion

The contracted length of the 40 *P. regalis* individuals varied between 80 and 230 mm (mean 140.55 ± 45.27 mm). The integument thickness had a mean value of 3.67 ± 1.40 mm and the wet integument weight ranged from 7.22 to

133.86 g (mean 56.25 ± 28.48 g). Dried individuals had an average weight of 6.07 ± 1.35 g.

The ratio between the wet (TWW) and dry (TDW) weights of the integument was 9.27. This value is very close to the standard value (10:1) established for holothurians by Newell and Courtney (1965). This ratio was calculated in other species of the genus *Holothuria* in the central and western Algerian region by Mezali (1998) and Mecheta and Mezali (2019). The ratio obtained for *P. regalis* was higher than that of *Holothuria poli* (6.44 and 7.02 obtained by Mezali 1998) and Mecheta and Mezali (2019), respectively, *H. tubulosa* (6.44 and 8.69 obtained by Mezali 1998) and Mecheta and Mezali (2019), respectively, and *H. forskali* (8.98 obtained by Mezali 1998), close to that of *H. sanctori* (9.39 obtained by Mezali 1998) and lower than that of *H. arguinensis*, which possesses the highest ratio of 15.78 (Mecheta and Mezali 2019). According to Mezali (1998, 2001), the variation in this ratio between species may be related to their physiology and the chemical composition of their integument. In fact, the percentage of water content and the percentage of ossicles in the integument that differ between species can influence dry weights and create considerable variation. Habitat may also play a role in the variation of this ratio. In fact, unlike species of the genus *Holothuria* that inhabit coastal areas and have a rigid integument, *P. regalis* is found on muddy substrates (Elakkermi et al. 2021) and its integument is soft. When this ratio is accurately calculated for commercial species, it can be used to estimate the weight of fresh sea cucumbers from previously processed ones (Ngaluafé and Lee 2013).

Approximate composition

The moisture content (Table 1) in the integument of *P. regalis* was 90.98 ± 0.71%, this value is close to that observed in the same species in Spain (Roggatz et al. 2018). According to Chang-Lee et al. (1989), the moisture content in holothurians is between 82.0 and 92.6%, and is high compared to that of fish and molluscs, although higher or lower values have been observed in some species (Table 1). Such is the case for *Holothuria tubulosa*, *H. poli* and *Stichopus variegatus*, with moisture contents of 81.09 ± 1.97%, 93.53 ± 1.95% and 93.36 ± 0.02%, respectively (Mecheta and Mezali 2019; Ridhowati et al. 2018). The value observed in the species studied remains within the range of rates reported in the literature. Within the same species, fluctuations in the moisture content can be observed depending on the sampling period, such as the case of the species *Isostichopus* sp., where the moisture content varies but not significantly by 3% between the months of January and July (Vergara and Rodríguez 2016). This monthly variation has also been observed in the species *Holothuria scabra* (Özer et al. 2004). In the case of our comparison, all individuals were collected in summer except in the case of *P. regalis* from the Spanish coast and *S. variegatus*, which were collected from fall-winter and winter-summer, respectively (Roggatz et al. 2018; Ridhowati et al. 2018). Thus, the observed interspecific water content variations are simply due to species and genus differences.

Table 1. Approximate composition of the integument of *Parastichopus regalis* compared to other sea cucumber species.

Species	Moisture content (%)	Lipid content (%)	Ash content (%)	References
<i>Parastichopus regalis</i>	90.98 ± 0.71	1.40 ± 0.57	40.45 ± 0.54	Present study
<i>P. regalis</i>	-	3.63 ± 0.11	-	Santos et al. (2015)
<i>P. regalis</i>	91.40	1.27	36.80	Roggatz et al. (2018)
<i>Holothuria arguinensis</i>	88.13 ± 4.16*	2.57 ± 0.28	47.31 ± 0.08	Mecheta et al. (2020)
<i>H. poli</i>	93.53 ± 1.95*	5.53 ± 0.59	41.78 ± 1.82	Mecheta et al. (2020)
<i>H. sanctori</i>	-	3.07 ± 0.50	31.58 ± 0.10	Mecheta et al. (2020)
<i>H. scabra</i>	84.91	-	-	Özer et al. (2004)
<i>H. tubulosa</i>	81.09 ± 1.97*	3.81 ± 0.25	40.77 ± 0.60	Mecheta et al. (2020)
<i>Stichopus herrmanni</i>	-	0.80 ± 0.02	37.90 ± 0.33	Wen et al. (2010)
<i>S. variegatus</i>	93.36 ± 0.02	-	-	Ridhowati et al. (2018)
<i>Thelenota ananas</i>	-	1.90 ± 0.01	25.10 ± 0.30	Wen et al. (2010)

*Mecheta and Mezali (2019)

The lipid level (Table 1) obtained from *P. regalis* was 1.40 ± 0.57%. This value is more or less close to that of *Stichopus herrmanni* and *Thelenota ananas* (0.80 ± 0.02% and 1.9 ± 0.01%, respectively) (Wen et al. 2010). The chemical composition of marine organisms in general can be influenced by several factors such as physiological characteristics, habitat, life cycle and environmental conditions, as well as biological factors such as diet and reproductive cycle (Taboada et al. 2003; Diniz et al. 2012). According to Khotimchenko (2015), the organic and non-organic compositions of fresh holothurians vary with species, season, habitat and probably stage of ontogeny.

Two studies approached the lipid level in the integument of *P. regalis* in the Mediterranean. The level obtained in individuals from Portugal is higher (3.63 ± 0.11%) (Santos et al. 2015) than those obtained in Spain by Roggatz et al. 2018 (1.27%), and those obtained in this study. This variation in lipid levels observed within the same species is explained by several factors but particularly by temperature and availability of food resources due to the selective behaviour of holothurians (Taboada et al. 2003; Neto et al. 2006). Indeed, the three values obtained correspond to samples from different regions and different periods, with the highest lipid level observed in September 2012 (Santos et al. 2015) and the lowest between fall and winter 2011 (Roggatz et al. 2018). The intermediate value was obtained in our study in summer 2020.

The ash content (Table 1) obtained in the integument of *P. regalis* is 40.45 ± 0.54%, which is slightly higher than that obtained by Roggatz et al. (2018) for the same species in Spain (36.80%) as well as those of the other two species of the same family, *Stichopus herrmanni* and *Thelenota ananas* with contents of 37.9 ± 0.33 % and 25.10 ± 0.30%, respectively (Wen et al. 2010). Compared to other species of the genus *Holothuria* from the Algerian west coast, only *H. arguinensis* has a higher ash content than the species studied (47.31 ± 0.08%), *H. tubulosa* and *H. poli* both have almost similar levels (40.77 ± 0.60% and 41.78 ± 1.82%, respectively) and *H. sanctori* has lower values (Mecheta et al. 2020). The results

of the ash content should be taken with caution because the number of ossicles could influence this value.

In general, sea cucumbers are high in protein, low in lipids and contain several minerals and vitamins (Çakli et al. 2004; Mecheta et al. 2020). This chemical composition is influenced by the nutrition of these organisms, their geographical location, the handling procedure of these organisms after they are harvested, and the method by which they are processed into beche-de-mer (Chang-Lee et al. 1989; Özer et al. 2004; Aydin et al. 2011).

In vitro digestibility of the *P. regalis* integument by pepsin

An assessment of the quality of a protein source is usually based on the amino acid composition and digestibility of the protein in the digestive tract (Santé-Lhoutellier et al. 2017). The *in vitro* pepsin digestibility of *P. regalis* integument of 46.96 ± 3.08% is the same as that observed in fish (Wen et al. 2010) and close to that of chicken and beef (44.67% and 42.75%, respectively) (Table 2). Compared to other holothurian species from the Algerian west coast, the integument of *P. regalis* is more digested by pepsin than that of *H. poli* or *H. tubulosa* (34.68 ± 8.66% and 25.96 ± 2.04%, respectively) (Mecheta and Mezali 2019). Despite the fact that *P. regalis* has a low protein content (14.7% according to Roggatz et al. 2018) compared to *H. arguinensis* (66.41% according to Mecheta et al. 2020), their integuments are almost equally digested by pepsin. This digestion may not be related to the protein level but instead to its composition. Indeed, pepsin cleavage is more influenced by the amino acid residue in the P1 position, and when the amino acids His, Lys, Arg or Pro are in this position they prohibit this cleavage (Hamuro et al. 2018). These amino acids represent approximately 19.6%–26.4% of the protein in *H. arguinensis*, *H. tubulosa*, *H. poli* and *P. regalis*, and have low lysine/arginine levels (Roggatz et al. 2015; Gonzalez-Wangüemert et al. 2018; Roggatz et al. 2018).

Table 2. Digestibility of *P. regalis* integument by pepsin compared to other sea cucumber species and to commonly consumed meats.

Species	Digestibility (%)	References
<i>Parastichopus regalis</i>	46.96 ± 3.08	Present study
<i>Holothuria arguinensis</i>	53.56 ± 3.41	Mecheta and Mezali (2019)
<i>H. poli</i>	34.68 ± 8.66	Mecheta and Mezali (2019)
<i>H. tubulosa</i>	25.96 ± 2.04	Mecheta and Mezali (2019)
Pork	47.22	Wen et al. (2015)
Fish	46.98	Wen et al. (2015)
Chicken	44.67	Wen et al. (2015)
Beef	42.75	Wen et al. (2015)

Conclusion

The sea cucumber *Parastichopus regalis* has a high-water content, low lipid content and good digestibility by pepsin. Thus, *P. regalis* from the Algerian coast could constitute a new nutritional and economic source to be exploited. Before that, however, studies on its reproduction must be carried out in order to establish management measures that guarantee the sustainability of the stocks such as the determination of fishing closure periods and minimum commercial sizes, which are not available for any species exploited in Algeria.

References

- Aydin M., Sevgili H., Tufan B., Emre Y. and Köse S. 2011. Proximate composition and fatty acid profile of three different fresh and dried commercial sea cucumbers from Turkey. *International Journal of Food Science and Technology* 46(3):500–508. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02512.x>
- Benzait H., Khodja I., Soualili D.L. and Mezali K. 2020. Note on *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) from the Sidi-Medjdoub area of Mostaganem, Algeria. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 40:43–45. <https://purl.org/spc/digilib/doc/gkca>
- Çakli S., Cadun A. and Kisla D. 2004. Determination of quality characteristics of *Holothuria tubulosa* (Gmelin, 1788) in Turkish Sea (Aegean Region) depending on sun drying process step used in Turkey. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 13(3):69–78. <https://doi.org/10.1300/J030v13n03>
- Caulier G., Mezali K., Soualili D.L., Decroo C., Demeyer M., Eeckhaut I., Gerbaux P. and Flammang P. 2016. Chemical characterization of saponins contained in the body wall and the Cuvierian tubules of the sea cucumber *Holothuria (Platyperona) sanctori* (Delle Chiaje, 1823). *Biochemical Systematics and Ecology* 68:119–127. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.06.005>
- Chang-Lee M. V., Price R. J. and Lampila L. E. 1989. Effect of processing on proximate composition and mineral content of sea cucumbers (*Parastichopus* spp.). *Journal of Food Science* 54(3):567–568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb04653.x>
- Diniz G.S.D., Barbarino E. and Lourenço S.O.L. 2012. On the chemical profile of marine organisms from coastal subtropical environments: Gross composition and nitrogen-to-protein conversion factors. p. 297–320. In: Marcelli, M. (ed). *Oceanography*. InTechOpen. <https://doi.org/10.5772/29294>
- Dissanayake D.C.T. and Stefansson G. 2010. Abundance and distribution of commercial sea cucumber species in the coastal waters of Sri Lanka. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 23:303–313. <https://doi.org/10.1017/S0025315411001019>
- Elakkermi M., Mezali K., Khodja I., Belbachir N.E., Benzait H. and Lila Soualili D. 2021. Gut content analysis of *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) from the west Algerian coast. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 41:15–18. <https://purl.org/spc/digilib/doc/jozdz>
- Escudero E., Sentandreu M. Á. and Toldrá F. 2010. Characterization of peptides released by in vitro digestion of pork meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8):5160–5165. <https://doi.org/10.1021/jf904535m>
- Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226:497–509.
- González-Wangüemert M., Roggatz C.C., Rodrigues M.J., Barreira L., da Silva M.M. and Custódio L. 2018. A new insight into the influence of habitat on the biochemical properties of three commercial sea cucumber species. *International Aquatic Research* 10(4):361–373. <https://doi.org/10.1007/s40071-018-0210-9>

- Hamuro Y., Coales S.J., Molnar K.S., Tuske S.J. and Morrow J.A. 2008. Specificity of immobilized porcine pepsin in H/D exchange compatible conditions. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22:1041–1046. <https://doi.org/10.1002/rcm>
- Khodja I., Mezali K. and Thandar A.S. 2021. Multiple records and polymorphism of *Parastichopus regalis* (Cuvier, 1817) (Echinodermata: Holothuroidea: Stichopodidae) along the Algerian coast. *Zootaxa* 5032(4):549–562. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5032.4.5>
- Khotimchenko Y.S. 2015. The nutritional value of holothurians. *Russian Journal of Marine Biology* 41(6):409–423. <https://doi.org/10.1134/S1063074015060061>
- Low L.K. and Ng C.S. 1987. Analysis of oils: Extraction of lipids (modified Folch's Method). p. 1–2. In Hasegawa H. (eds). *Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products*. Bangkok: Marine Fisheries Research Department, Southeast Asian Fisheries Development Center.
- Mecheta A. and Mezali K. 2019. A biometric study to determine the economic and nutritional value of sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) collected from Algeria's shallow water areas. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 39:65–70. <https://purl.org/spc/digilib/doc/z4m7w>
- Mecheta A., Hanachi A., Jeandel C., Arab-Tehrany E., Bianchi A., Velot E., Mezali K. and Linder M. 2020. Physicochemical properties and liposomal formulations of hydrolysate fractions of four sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata) from the northwestern Algerian coast. *Molecules* 25(2972):1–24. <https://doi.org/10.3390/molecules25132972>
- Mezali K. 1998. Contribution à la systématique, la biologie, l'écologie et la dynamique de cinq espèces d'holothuries aspidochirotés [*Holothuria* (*H.*) *tubulosa*, *H.* (*L.*) *polii*, *H.* (*H.*) *stellati*, *H.* (*P.*) *forskali* et *H.* (*P.*) *sanctori*] de l'herbier à *Posidonia oceanica* (*L.*) Delille de la Presqu'île de Sidi-Fredj. Thèse de Magister. Ecole National des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (Ex- ISMAL), Alger, Algérie. 192 p.
- Mezali K. 2001. Biométrie des holothuries aspidochirotés (Holothuroidea: Echinodermata) de la presqu'île de Sidi-Fredj (Algérie). Communication poster, 36^{ème} Congrès de la CIESM, Monaco, 24–28 septembre 2001.
- Mezali K. and Slimane-Tamacha F. 2020. The status of Algeria's sea cucumbers and their illegal trade. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 40:23–31. <https://purl.org/spc/digilib/doc/2uwhi>
- Neto R.R., Wolff G.A., Billett D.S.M., Mackenzie K.L. and Thompson A. 2006. The influence of changing food supply on the lipid biochemistry of deep-sea holothurians. *Deep-Sea Research Part I* 53(3):516–527. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2005.12.001>
- Newell R. C. and Courtney W.A.M. 1965. Respiratory Movements in *Holothuria forskali* Delle Chiaje. *Journal of Experimental Biology* 42(1):45–57. <https://doi.org/10.1242/jeb.42.1.45>
- Ngaluafé P. and Lee J. 2013. Change in weight of sea cucumbers during processing: Ten common commercial species in Tonga. *SPC Beche-de-mer Information Bulletin* 33:3–8. <https://purl.org/spc/digilib/doc/ezf5w>
- Özer N.P., Mol S. and Varlık C. 2004. Effect of the handling procedures on the chemical composition of sea cucumber. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 4:71–74.
- Pangestuti R. and Arifin Z. 2018. Medicinal and health benefit effects of functional sea cucumbers. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 8:341–351.
- Ramón M., Lleonart J. and Massutí E. 2010. Royal cucumber (*Stichopus regalis*) in the northwestern Mediterranean: Distribution pattern and fishery. *Fisheries Research* 105:21–27. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2010.02.006>
- Ridhowati S., Chasanah E., Syah D. and Zakaria F.R. 2018. Evaluation of the safe consumption of aqueous extract of flour from *Stichopus variegatus*. *Biomedical Research and Therapy* 6(11):3452–3459. <https://doi.org/10.15419/bmrat.v6i11.574>
- Roggatz C.C., González-Wangüemert M., Pereira H., Rodrigues M.J., Da Silva M.M., Barreira L., Varela J. and Custódio L. 2015. First report of the nutritional profile and antioxidant potential of *Holothuria arguiniensis*, a new resource for aquaculture in Europe. *Natural Product Research* 1–7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1107555>
- Roggatz C.C., González-Wangüemert M., Pereira H., Vizetto-Duarte C., Rodrigues M.J., Barreira L., Da Silva M.M., Varela J. and Custódio L. 2018. A first glance into the nutritional properties of the sea cucumber *Parastichopus regalis* from the Mediterranean Sea (SE Spain). *Natural Product Research* 32(1):116–120.
- Santé-Lhoutellier V., Astruc T., Daudin J.D., Kondjoyan A., Scislowski V., Duchène H., Gaudichon C. and Rémond D. 2017. Digestion des protéines des viandes en fonction de la cuisson. *Viandes & Produits Carnés* 33:1–10.

- Santos R., Dias S., Pinteus S., Silva J., Alves C., Tecelão C., Pombo A. and Pedrosa R. 2015. The biotechnological and seafood potential of *Stichopus regalis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 6:194–204. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.63019>
- Taboada M. C., Gonzalez M. and Rodriguez E. 2003. Value and effects on digestive enzymes and serum lipids of the marine invertebrate *Holothuria forskali*. *Nutrition Research* 23:1661–1670. [https://doi.org/10.1016/S0271-5317\(03\)00175-1](https://doi.org/10.1016/S0271-5317(03)00175-1)
- Vergara, W. and Rodríguez A. 2016. Nutritional composition of sea cucumber *Isostichopus* sp. *Natural Resources* 7:130–137. <https://doi.org/10.4236/nr.2016.73013>
- Wen J., Hu C. and Fan S. 2010. Chemical composition and nutritional quality of sea cucumbers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90:2469–2474. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4108>
- Wen S., Zhou G., Song S., Xu X., Voglmeir J., Liu L., Zhao F., Li M., Li L., Yu X., Bai Y. and Li C. 2015. Discrimination of *in vitro* and *in vivo* digestion products of meat proteins from pork, beef, chicken, and fish. *Proteomics* 15(21):3688–3698. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500179>