



**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**

**MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS MOSTAGANEM**

**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE**

**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**

**THESE DE DOCTORAT 3ème Cycle (Doctorat LMD)**

**Domaine : Sciences de la Nature & de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Nutrition et Santé**

**Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques,  
des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS)**

**THEME**

**Evaluation des propriétés biologiques de peptides bioactifs de la moule  
(*Mytilus galloprovincialis*)**

Présentée par :

**Mme OTSMANE EL HAOU Siham**

Soutenue le.....2024 devant le jury d'examen composé de :

Présidente :	Mme Hammadi Kheira	Prof. Univ. Mostaganem
Examineurs :	Mr Boualga Ahmed	Prof. Univ. Oran 1
	Mr Abbouni Bouziane	Prof. Univ. Sidi Bel Abbas
	Mme Zerrouki Kheira	MCA. Univ. Mostaganem
Directeur de thèse :	Mr Riazi Ali	Prof. Univ. Mostaganem

**Année Universitaire : 2023 / 2024**



## **Dédicace**

Je dédie mon travail de thèse à :

À mon cher père et à ma mère après le bon Dieu. C'est grâce à vous que je suis arrivée aujourd'hui à ce niveau d'études. Je ne trouverai jamais les mots pour vous remercier autant pour toute la veille morale et physique sur moi.

A mon cher mari Abd Elrahmen

A mon cher fils Omar El Farouk

A ma belle sœur Manel

A mes chers frères Mohamed, Hichem, Habib et Abed Nacer

Toute la grande famille sans exception !

A mes amis.

A tous ceux que j'aurais oublié de citer .....

Siham

## **AVANT- PROPOS**

La plus grande partie de ce travail de thèse a été réalisée au sein du Laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'université Abdelhamid Ibn Badis à Mostaganem dirigé par le professeur Ali Riazi. Certaines expériences spécifiques comme celles sur l'extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *mytilus galloprovincialis* du port de Mostaganem et l'évaluation de la cytotoxicité ont été réalisées en Corée du Sud au laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine université de Séoul et à l'Institut de recherche en médecine moléculaire et nutrition de Séoul.

Je tiens, tout d'abord, à témoigner ma profonde reconnaissance à mon directeur de recherches, Mr Riazi Ali, Professeur à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem, pour m'avoir acceptée dans son laboratoire, initiée à la recherche depuis le démarrage de mon master jusqu'au doctorat, et pour avoir consacré tout son temps et ses moyens à la bonne conduite de ce travail. Soyez rassuré de ma gratitude et de mon profond respect.

Je tiens à remercier également le Dr Gil-Hong Park (Directeur de recherches de laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine de Séoul, Université de Corée du Sud) pour avoir accepté de m'accueillir dans son équipe, mis à ma disposition les moyens pour réaliser mes manipulations spécifiques.

C'est un grand honneur pour moi d'avoir Mme Hammadi Kheira, professeure à l'Université Abdelhamid Ben Badis de Mostaganem, comme membre du jury de ma thèse. Je la remercie sincèrement d'avoir accepté de présider ce jury.

À Monsieur le professeur Boualga Ahmed de l'université d'Oran 1, j'adresse mes remerciements pour sa participation à l'examen de ce travail.

J'aimerais également remercier le Monsieur le Professeur Abbouni Bouziane de l'université de Sidi Bel Abbes pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant qu'examineur.

Je remercie Mme Zerrouki Kheira, Maître de conférences de classe A à l'université de Mostaganem, pour sa participation à mon jury d'examen.

Je voudrais également remercier tout particulièrement toutes les personnes rencontrées dans le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine de Séoul, Université de Corée du Sud et l'institut de recherche en médecine moléculaire et nutrition, Séoul, Corée du Sud où j'avais séjourné et je pense à Susoma Jannat pour son aide.

Je voudrais également exprimer ma gratitude à Mme Mokhtar Meriem, professeure à l'université de Mostaganem pour toute son aide.

Je salue et remercie chaleureusement mes amis et collègues du LMBAFS pour leurs encouragements, leurs précieux conseils et leur aide morale. J'adresse mes sincères remerciements à Mr Khedim Mostefa et Mme Khedim Kheira pour leur aide, leur gentillesse et leurs encouragements.

## RESUME

En plus de leur valeur nutritionnelle et de leurs effets sur le bien-être, les mollusques en général et en particulier les moules sont une source potentielle en plusieurs composés bioactifs qui ont pris beaucoup plus d'importance au cours de la dernière décennie en raison de leur richesse en protéines et de leurs diverses utilisations à des fins nutraceutiques, pharmaceutiques, thérapeutiques et comme agents alimentaires fonctionnels. Cette étude vise à évaluer l'activité antimicrobienne, antioxydante, anti-inflammatoire et de cytotoxicité de la fraction peptidique extraite de l'hémolymphe de la moule d'Algérie, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). L'activité antimicrobienne de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) contre un panel de bactéries pathogènes Gram-positives et Gram-négatives, de bactéries lactiques (BL) et de souches de champignons a été déterminée par la méthode de diffusion sur puits. L'activité antioxydante du HPF a été déterminée à l'aide des tests DPPH et FRAP, ainsi que sa capacité à éliminer les radicaux hydroxyles (OH). La toxicité du HPF envers plusieurs cellules normales et tumorales a été évaluée avec le test au bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl-2H-tétrazolium (MTT). Le pouvoir anti-inflammatoire de l'HPF a été déterminé à l'aide des tests d'inhibition de la dénaturation de l'albumine, stabilisation des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC) et *in vivo* chez le rat Wistar. La croissance de la plupart des bactéries pathogènes et de *Candida albicans* testées a été inhibée par l'HPF de *M. galloprovincialis* (diamètres des zones d'inhibition allant de 10 à 24 mm), alors que celle des BL n'a pas été affectée. L'activité antioxydante de 3 mg HPF/mL était d'environ  $78.14 \pm 2.59$ ,  $53.86 \pm 1.25$  et  $84.86 \pm 5.68\%$ , respectivement, lorsqu'elle est déterminée avec les tests DPPH, FRAP et OH de L'HPF. L'HPF n'a exercé aucune toxicité contre les lignées cellulaires normales, les kératinocytes de la peau humaine, les lignées cellulaires cancéreuses, le carcinome du poumon humain, l'hépatoblastome du foie humain, le fibrosarcome humain, les cellules épithéliales du poumon de souris exprimant HPV-16 E7 (-MHC classe I). Selon les résultats de la lignée cellulaire de macrophages de souris (préostéoclastes) (RAW264.7), l'HPF avait une légère activité immunosuppressive, tandis que les résultats sur l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS) ont montré une cytotoxicité cancéreuse marginale. L'HPF présente une bonne activité anti-inflammatoire, le pourcentage d'inhibition (PI) de la dénaturation de l'albumine est  $65.21 \pm 0.00\%$  à 3mg/mL. Le PI de l'hémolyse du HPF est de l'ordre de  $48.07 \pm 0.12\%$ ,  $53.13 \pm 0.15\%$ ,  $56.42 \pm 0.16\%$  et  $74.22 \pm 0.19\%$  respectivement pour les concentrations 0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/ml. L'inhibition (%) de l'inflammation induite par la carragénine à 1%, de l'œdème de la patte de rat Wistar obtenue à 30 et 60 mg de HPF/Kg poids vif ont été respectivement de  $28.22 \pm 0.31\%$  et  $42.74 \pm 0.15\%$ . Les concentrations de la CRPr et fibrinogène, enregistrées pour le groupe traité par l'HPF aux deux concentrations 30 et 60 mg/kg sont de l'ordre de 52 et 39 mg/L, et de 6.5 et 4.5 g/L, respectivement.

**Mots clefs:** *Mytilus galloprovincialis*, peptides, antimicrobien, antioxydant, anti inflammatoire, cytotoxicité.

## ABSTRACT

In addition to their nutritional value and their wellness effects, Molluscs in general and specially Mussels are a potential source of several bioactive compounds that have gained much more importance over the last decade due to their protein richness and their various uses as nutraceutical, pharmaceutical, therapeutic and functional food agents. This study aims to assess the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxicity activities of peptide fraction extracted from hemolymph of Algerian blue mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck). Antimicrobial activity of hemolymph peptide fraction (HPF) against a panel of Gram-positive and Gram negative pathogenic bacteria, lactic acid bacteria (LAB) and fungi strains was determined with well diffusion method. Antioxidant activity of HPF was determined using DPPH and FRAP tests, as well as its ability to scavenge hydroxyl radicals (OH). HPF toxicity towards several tumor cells was evaluated with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) test. The anti-inflammatory activity of HPF was determined using the inhibition of albumin denaturation, stabilization of red blood cells against hemolysis (HRBC) and *in vivo* tests in the Wistar rat. The growth of most pathogenic bacteria and *Candida albicans* tested were inhibited by HPF of *M. galloprovincialis* (inhibition zone diameters ranging from 10 to more than 24 mm), whereas that of LAB was not affected. Antioxidant activity of 3 mg HPF/mL was about  $78.14 \pm 2.59$ ,  $53.86 \pm 1.25$  and  $84.86 \pm 5.68\%$ , respectively, when determined with DPPH, FRAP, and OH tests. HPF of *M. galloprovincialis* did not exert any toxicity against any normal cell line, human skin keratinocyte, cancer cell lines, human lung carcinoma, human liver hepatoblastoma, human fibrosarcoma, HPV-16 E7-expressing mouse lung epithelial cell (- MHC class I). According to the results of mouse macrophage cell line (preosteoclast) (RAW264.7), HPF had a slight immunosuppressant activity; while results on human stomach adenocarcinoma (AGS) have shown a marginal cancer cytotoxicity of HPF. HPF presents good anti-inflammatory activity, the percentage of inhibition of albumin denaturation is  $65.21 \pm 0.00\%$  at 3 mg/ml. The PI of HPF hemolysis is of the order of  $48.07 \pm 0.12\%$ ,  $53.13 \pm 0.15\%$ ,  $56.42 \pm 0.16\%$  and  $74.22 \pm 0.19\%$  respectively for concentrations 0.37, 0.73, 1.5 and 3mg/ml. The PI (%) of inflammation induced by carrageenan 1%, of edema of the Wistar rat paw obtained at 30 and 60 mg/Kg of HPF were respectively  $28.22 \pm 0.31\%$  and  $42.74 \pm 0.15\%$ . The concentrations of CRPr and fibrinogen, recorded for the batch treated with HPF at the two concentrations 30 and 60 mg/kg, are about 52 and 39 mg/L, and 6.5 and 4.5 g/L respectively.

**Keywords:** *Mytilus galloprovincialis*, peptides, antimicrobial, antioxidant, antiinflammatory, cytotoxicity.

## ملخص

بالإضافة إلى قيمته الغذائية وتأثيره على الصحة، يعد المحار بشكل عام وبلح البحر بشكل خاص مصدرًا محتملاً للعديد من المركبات النشطة بيولوجيًا التي اكتسبت أهمية أكبر بكثير في العقد الماضي بسبب ثرائه بالبروتينات واستخداماتها المختلفة في مجال التغذية والعوامل الغذائية الصيدلانية والعلاجية والوظيفية. تهدف هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للميكروبات ومضادات الأكسدة والالتهابات والسمية الخلوية لجزء الببتيد المستخرج من الدم لمف في بلح البحر الجزائري. تم تحديد النشاط المضاد للميكروبات لجزء الببتيد من الدم لمف ضد مجموعة من البكتيريا المسببة للأمراض إيجابية الجرام وسالبة الجرام وبكتيريا حمض اللاكتيك والسلالات الفطرية بواسطة طريقة الانتشار الجيد. تم تحديد نشاط مضادات الأكسدة لجزء الببتيد الهيموليمف باستخدام فحوصات ديبيباش، فغاب، بالإضافة إلى قدرته على مسح جذور الهيدروكسيل. تم تقييم سمية جزء الببتيد تجاه العديد من الخلايا الطبيعية والورمية باستخدام اختبار بروميد (3-4,5) ثنائي ميثيل تترازوليوم. تم تحديد القوة المضادة للالتهابات لجزء الببتيد باستخدام اختبارات تثبيط تمسخ الألبومين، وتثبيت خلايا الدم الحمراء فيما يتعلق بانحلال الدم وفي الجسم الحي في فئران ويستار. تم تثبيط نمو معظم البكتيريا المسببة للأمراض والمبيضات البيضاء التي تم اختبارها بواسطة جزء الببتيد من الدم لمف لبلح البحر (أقطار مناطق التثبيط تتراوح من 10 إلى 24 ملم)، في حين لم يتأثر نمو بكتيريا حمض اللاكتيك. كان نشاط مضادات الأكسدة بمقدار 3 ملغم/مل حوالي  $78.14 \pm 2.5$  و  $53.86 \pm 1.2$  و  $84.86 \pm 5.6\%$  على التوالي، عند تحديده باستخدام فحوصات ديباش، فغاب، و مسح جذور الهيدروكسيل. لم يمارس جزء الببتيد أي سمية ضد خطوط الخلايا الطبيعية، والخلايا الكيراتينية للجلد البشري، وخطوط الخلايا السرطانية، وسرطان الرئة البشري، والورم الأرومي الكبدي البشري، والساركوما الليفية البشرية، والخلايا الظهارية الرئوية للفئران. وفقًا لنتائج خط خلايا البلاعم الفأرية (ما قبل العظم)، كان لجزء الببتيد نشاط مثبط خفيف، في حين أظهرت نتائج سرطان المعدة البشري الغدي تسمم الخلايا السرطانية بشكل هامشي. يقدم جزء الببتيد نشاطًا جيدًا مضادًا للالتهابات، وتبلغ نسبة تثبيط تمسخ الألبومين  $65.21 \pm 0.0\%$  عند 3 مجم/مل. وكانت نسبة تثبيط انحلال الدم في حدود  $48.07 \pm 0.12\%$ ،  $53.13 \pm 0.15\%$ ،  $56.42 \pm 0.16\%$  و  $74.22 \pm 0.19\%$  على التوالي للتراكيز 0.37، 0.73، 1.5 و 3 ملغم/مل. كانت النسبة المئوية لتثبيط الالتهاب الناتج عن الكاراجينان بنسبة 1%، من وذمة مخلب فأر ويستار عند 30 و 60 ملغم / كغم من جزء الببتيد،  $28.22 \pm 0.31\%$  و  $42.74 \pm 0.15$  على التوالي. إن تركيزات بروتين سي التفاعلي والفبرينوجين المسجلة للمجموعة المعالجة بجزء الببتيد من الدم لمف عند التركيزين 30 و 60 ملجم / كجم كانت في حدود 39 و 52 ملجم / ل و 4.5 و 6.5 جم / لتر على التوالي.

**الكلمات المفتاحية:** بلح البحر، الببتيدات، نشاط مضاد للميكروبات، أنشطة مضادة للاكسدة، أنشطة مضادة للالتهاب، سمية الخلايا.

### Liste des abréviations

- aa : acide aminé
- ABS<sub>c</sub> : Control absorbance
- ABS<sub>e</sub> : Absorbance de l'échantillon
- AL : Aluminium
- ATCC: American Type Culture Collection.
- Bb12: *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.
- BLBVB : Bouillon lactose bilié au vert brillant
- BSA : Albumine sérique bovine
- CECT : Colección Española de Cultivos Tipos
- CPPs : Cell Penetrating peptides
- Cu : Cuivre
- DMSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
- DO : Densité optique
- DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
- Fe : Fer
- FRAP : Ferric reducing antioxidant power
- HPF : la fraction peptidique de l'hémolymphe
- IC : indice de conditions
- IC<sub>50</sub> : Concentration inhibitrice demi-maximale
- *M. galloprovincialis* : *Mytilus galloprovincialis*
- MGD : *Mytilus galloprovincialis* Defensin
- Mn : Manganèse
- MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
- nm : Nanomètre
- NPP : nombre de germes le plus probable
- OD : Oxygène dissous
- p/v : Poids/volume
- PAMs : peptides antimicrobiens
- pH : potentiel hydrogène
- ppm : parties par million

- S : Salinité
- SPE : Solide phase extraction
- SAA : Spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme
- T : Température
- TCA : Trichloroacetic Acid
- TFA : Trifluoroacetic Acid
- TNTM : technique de numération en tubes multiples
- UFC : Unité formant colonie
- v/v : Volume/Volume
- Zn :Zinc

## **Liste des tableaux et des figures**

### **Liste des tableaux**

#### **Partie bibliographique**

**Tableau 1**: Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens, selon la base de données des peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).....pp15.

**Tableau 2** : Peptides antimicrobiens isolés et caractérisés chez *Mytilus sp.* et *Crassostrea sp.*  
Activités : G+ : anti-Gram+ ; G- : anti-Gram- ; F : antifongique.....pp 18.

#### **Partie expérimentale**

##### **Chapitre II. Matériels et méthodes**

**Tableau 3** : Origine, milieux de culture et température de croissance des souches pathogènes et bénéfiques utilisées.....pp 46.

**Tableau 4**: Méthodes de détermination de l'activité antioxydante in vitro ([Huang et al., 2005](#) ; [Karadag et al., 2009](#))..... pp 47.

##### **Chapitre III. Résultats et discussion**

**Tableau 5**: Paramètres physico-chimiques de l'eau de mer mesurés in situ entre mars 2016 et avril 2017 : pH, température (T en °C), S : la salinité (S en ‰), concentration de l'oxygène dissous (OD en mg/mL) comparés aux valeurs normales de la mer méditerranéenne publiées dans le journal officiel Algérien (JORA N°46, 1993). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM (n = 3).....pp60.

**Tableau 6** : Paramètres biométriques et physiologiques de la moule *M. galloprovincialis* (mars 2016-avril 2017) : longueur (mm), largeur (mm), épaisseur (mm), poids frais du corps mou de la moule (PFCM en g), poids total sans liquide intervallaire (PTLI

en g) et IC: indice de condition. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 60).....pp 62.

**Tableau 7:** Teneurs moyennes en métaux lourds de l'eau de mer du port de Mostaganem (site de prélèvement des moules) avec les valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels dans l'eau selon le Journal officiel de la République Algérienne N°18, 23 mars 2011). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=3) ..... pp 64.

**Tableau 8 :** Profil bactériologique de l'eau de mer du port de Mostaganem (site de prélèvement des moules) comparé aux normes de qualité bactériologique requise des eaux de baignade publiées dans le Journal officiel de la République Algérienne N° 46, 14 juillet 1993, reprise par le décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993).....pp 66.

**Tableau 9:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de souches pathogènes et bénéfiques par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis*..... pp68.

**Tableau 10:** Cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* vis-à-vis des kératinocytes épidermiques humains (HaCaT), de la lignée cellulaire de macrophages de souris (RAW264.7, préostéoclastes), de l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS), ducarcinome du poumon humain (A549), de l'hépatoblastome du foie humain (HepG2), du fibrosarcome humain (HT1080) des cellules épithéliales de poumon de souris exprimant HPV-16 E7 (TC-1 P3, classe MHC). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'HPF. L'effet a été mesuré par un test de viabilité cellulaire MTT (% de survie). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois déterminations.....pp 82.

**Tableau 11 :** Concentration inhibitrice de 50% des cellules (IC<sub>50</sub> en  $\mu$ M) déterminée sur la base du test MTT. .... pp 83.

**Tableau 12 :** Effet anti-inflammatoire in vivo de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) comparé à celui du standard, le diclofénac, sur l'épaisseur de l'œdème

(mm) de la patte de rat Wistar après injection de carragénine 1%..... pp 86.

**Tableau 13:** Pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème de la patte de rat Wistar après injection de carragénine 1% par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) comparé à celui du standard, le diclofénac..... pp 87.

**Tableau 14 :** Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* (30 et 60 mg/Kg d'HPF) comparé à celui du standard, le dichlofenac (20mg/Kg), sur les concentrations (mg/L) en protéine C-réactive et (g/L) en fibrinogène chez des rats Wistar ayant reçu de la carragénine 1%.....pp 92.

### Liste des figures

#### Partie bibliographique

**Figure 1 :** Anatomie interne et externe de la moule *M. galloprovincialis* (Khelil, 2007)....pp 6.

**Figure 2 :** Système respiratoire chez la moule *M. galloprovincialis* (Aquascope, 2000)...pp 8.

**Figure 3 :** les systèmes de défense chez les bivalves (Canesi et al., 2002).....pp 10.

**Figure 4 :** Cycle de vie de la moule *Mytilus spp* (Boukadida, 2017).....pp11.

**Figure 5 :** Distribution mondiale approximative de moules de genre *Mytilus* (Gaitán-Espitia et al., 2016).....pp 12.

**Figure 6 :** Classement des peptides antibactériens en fonction de leur structure secondaire et leur composition en acides aminés (Andres et Dimarcq, 2007).....pp 15

**Figure 7 :** Modèles de perméabilisation des membranes par les peptides antimicrobiens, (A) Les peptides (cylindres rouges) s'associent à la membrane plus ou moins profondément, puis (B) s'y accumulent et commencent à perturber la membrane. Quand une concentration seuil en peptide est atteinte, le peptide perméabilise la

membrane selon (C) le modèle du tonneau, (D) le modèle du pore torique ou (E-F) le modèle du tapis (Sato et Feix, 2008).....pp 21.

## **Partie expérimentale**

**Figure 8** : Position géographique du site d'échantillonnage de *M. galloprovincialis* (Google Maps, 2016 ; photo prise par Otsmane El Haou, 2016)..... pp 26.

**Figure 9** : Mytiliculture de *Mytilus galloprovincialis* dans le port de Mostaganem.....pp 26.

**Figure 10** : Période de stabilisation des moules *M. galloprovincialis* au laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé Mostaganem.....pp 27.

**Figure 11** : Mensuration de la longueur, largeur et épaisseur de la moule *M. galloprovincialis* à l'aide de pied à coulisse..... pp 28.

**Figure 12** : Préparation des dilutions décimales ..... pp 31

**Figure 13** : Recherche et dénombrement des Coliformes totaux Selon la norme NF T90- 413 (test présomptif) .....pp 32.

**Figure 14** : Identification des Coliformes thermo-tolérants (*Escherichia coli*) (test confirmatif).....pp 33

**Figure 15** : Recherche et dénombrement des Streptocoques totaux dans l'eau de mer (test présomptif)..... pp 35.

**Figure 16** : Identification des Streptocoques du groupe sérologique D dans l'eau de mer (test confirmatif) .....pp 36.

**Figure 17** : Schéma montrant le positionnement de la seringue au niveau du muscle adducteur postérieur (Bachelot, 2010) ..... pp 37.

**Figure 18** : Extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de la moule (*M. galloprovincialis*), (a): prélèvement d'hémolymphe, (b): Extraction de la fraction peptidique, (c): centrifugation, (d): sérum obtenu.....pp 39.

- Figure 19** : Diagramme de purification par extraction en phase solide (SPE) des peptides par la méthode de [Bugyi et al. \(2023\)](#) modifiée par [Otsmane El Haou, 2024](#).....pp40.
- Figure 20** : La fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* (HPF) en poudre après lyophilisation..... pp40.
- Figure 21** : Courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine (BSA).....pp42.
- Figure 22**: Spectrophotomètre d'Absorption Atomique ([Benadda, 2016](#)).....pp42.
- Figure 23**: Diagramme de préparation de la fraction peptidique d'hémolymphe de *M. galloprovincialis*.....pp 44
- Figure 24** : Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant ([Molyneux, 2004](#)) .....pp48.
- Figure 25**: Spectrophotomètre à microplaque pour l'évaluation de la cytotoxicité de l'HPF de *M. galloprovincialis*..... pp 53.
- Figure 26**: Rats Wistar adultes mâles utilisés dans l'expérience.....pp 54.
- Figure 27** : Mesure de l'œdème à l'aide d'un pied à coulisse (Caliper Mitutoyo).....pp 56
- Figure 28**: (a): Injection intra-péritonéale de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* et de dichlofenac chez les rats Wistar mâles. (b) : Injection sub-plantaire de la carragénine 1% dans la patte droite des rats..... pp 56.
- Figure 29** : Variations saisonnières des paramètres biométriques (Longueur, largeur et épaisseur) de la coquille des moules *M. galloprovincialis* provenant du port de Mostaganem. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM .....pp 62.
- Figure 30**: Variations saisonnières de l'indice de conditions de vie (IC) des moules *M. galloprovincialis* provenant du port de Mostaganem. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM.....pp 62.
- Figure 31** : Pouvoir antioxydant de la fraction peptidique d'hémolymphe (HPF) de *M.*

*galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). (p<0.001).....pp 73.

**Figure 32:** Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de la fraction peptidique d'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). (p<0.001) .....pp 74

**Figure 33:** Activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la fraction peptidique d'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). (p<0.001).....pp 75.

**Figure 34 :** Effet de la fraction peptidique d'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* sur l'inhibition de la dénaturation protéique. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n = 3).....pp 79.

**Figure 35:** Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *mytilus galloprovincialis* du port de Mostaganem sur d'inhibition de l'hémolyse. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n = 3).....pp 80.

**Figure 36:** Pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème par la fraction protéique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* utilisée à des concentrations de 30 et 60 mg/Kg de poids vif de rats Wistar mâles ayant reçu de la carragénine 1% comparé à celui du dichlofenac (20 mg/Kg) comme anti-inflammatoire standard..... pp 87.

**Figure 37:** Coupes histologiques des pattes de rats enflammées par la carragénine 1% : a- non traitées (témoin négatif), b- traitées par dichlofenac (20 mg/Kg) comme anti-inflammatoire standard (témoin positif), c- traitées par 30 mg EPF/Kg poids vif (échantillon 1), d- traitées par 60 mg EPF/Kg poids vif (échantillon 2) .....pp 93.

## Table des matières

Dédicace	
Avant-propos	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des tableaux et des figures	
Table des matières	
<b>Introduction</b> .....	1
<b>CHAPITRE I. Généralités sur la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> et les peptides antimicrobiens</b>	
I.1. Systématique .....	4
I.2. Ecologie .....	4
I.3. Anatomie de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	5
I.3.1. Coquille .....	5
I.3.2. Le pied et le byssus.....	5
I.3.3. Les branchies.....	5
I.3.4. Le muscle.....	5
I.3.5. La glande digestive .....	6
I.3.6. Lemanteau .....	6
I.3.7. L'hémolymphe.....	7
I.3.8. Les hémocytes .....	7
I.4. Physiologie de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	7
I.4.1. Alimentation.....	7
I.4.2. Le système excréteur .....	7
I.4.3. Le système respiratoire.....	7
I.4.4. Le système circulatoire .....	8
I.4.5. Système nerveux .....	9
I.4.6. Système immunitaire.....	9
I.4.7. Reproduction .....	9
I.5. Répartition géographique de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	12
I.6. Les peptides antimicrobiens.....	13

I.6.1. Présentation générale .....	13
I.6.2. Structure des peptides antimicrobiens.....	14
I.6.3. Les peptides antimicrobiens chez les mollusques marins .....	16
I.6.4. Les activités biologiques des peptides antimicrobiens.....	19
I.6.4.1. L'activité directe des peptides antimicrobiens.....	19
I.6.4.1.1. Activité antimicrobienne.....	19
I.6.4.1.2. Activité anticancéreuse.....	21
I.6.4.1.3. Autres activités.....	22
I.6.4.2. Les peptides antimicrobiens dans l'immunomodulation.....	22
I.6.4.3. Les peptides antimicrobiens dans la régénération nerveuse et Tissulaire.....	23
I.6.4.4. L'expression des peptides antimicrobiens dans les pathologies.....	23
I.6.4.5. Les peptides antimicrobiens dans les médicaments.....	23

## **CHAPITRE II. Matériel et méthodes**

II.1. Site de prélèvement.....	25
II.2. Prélèvement de moules <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	25
II.3. Mesure des paramètres biologiques de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	27
II.3.1. Biométrie.....	27
II.3.2. Indice de conditions.....	28
II.4. Analyse bactériologique de l'eau de mer du site de prélèvement.....	29
II.4.1. Prélèvement de l'eau de mer.....	29
II.4.2. Préparation des dilutions décimales.....	30
II.4.3. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et <i>Escherichia coli</i> .....	30
II.4.3.1. Test présomptif : Recherche et dénombrement des coliformes totaux.....	31
II.4.3.2. Test confirmatif : Identification des Coliformes thermotolérants ( <i>Escherichia coli</i> ) .....	32
II.4.4. Recherche, dénombrement et identification des Streptocoques (Entérocoques)..	33
II.4.4.1. Test présomptif : recherche et dénombrement des Streptocoques.....	33
II.4.4.2. Test confirmatif: Identification des Streptocoques du groupe sérologique D.....	34
II.4.5. Recherche des bactéries pathogènes.....	34
II.4.5.1. Recherche des Salmonelles.....	34

II.4.5.2. Recherche de vibrio cholerae.....	34
II.5. Méthodes de dosages divers.....	36
II.5.1. Prélèvement et analyse de l'hémolymphe de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	36
II.5.1.1. Extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF).....	37
II.5.1.2. Pré-purification de la fraction peptidique de l'hémolymphe : Chromatographie en phase inversée manuelle (SPEC18) .....	38
II.5.1.3. Dosage des protéines totales de l'hémolymphe et de la fraction éluée à 40 % d'acétonitrile.....	41
II.5.2. Dosage des métaux lourds de l'eau de mer.....	41
II.6. Evaluation des propriétés biologiques de la fraction peptidique de l'hémolymphe de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	44
II.6.1. Etude in vitro.....	44
II.6.1.1. Activité antibactérienne de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF).....	44
II.6.1.1.1. Les souches pathogènes utilisées.....	44
II.6.1.1.2. Milieux de cultures utilisés.....	44
II.6.1.1.3. Mise en culture des souches.....	45
II.6.1.1.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	45
II.6.1.2. Détermination de l'activité antioxydante.....	47
II.6.1.2.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•).....	48
II.6.1.2.2. Réduction du Fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power).....	49
II.6.1.2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles.....	50
II.6.1.3. Détermination de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	50
II.6.1.3.1. Par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine.....	50
II.6.1.3.2. Par le test de stabilisation des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC).....	51
II.6.1.4. Evaluation de la cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe de <i>M. galloprovincialis</i> par la méthode MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).....	52
II.6.1.4.1. Cellules ciblées.....	52
II.6.1.4.2. Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide).....	52

II.6.2. Etude in vivo de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de la moule <i>Mytilus galloprovincialis</i> chez le rat Wistar.....	54
II.6.2.1. Conditions d'élevage et mise en lots des rats.....	54
II.6.2.2. Induction de l'inflammation.....	55
II.6.2.3. Opération de sacrifice des rats et prélèvement sanguin.....	56
II.6.2.3.1. Dosage de la protéine C réactive (CRPr).....	57
II.6.2.3.2. Dosage du fibrinogène.....	57
II.6.2.3.3. Examen histologique des pattes enflammées.....	58
II.7. Traitement statistique des résultats.....	58

### **Chapitre III. Résultats et discussion**

III.1. Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer du port de Mostaganem.....	59
III.2. Paramètres biométriques et physiologiques de la moule <i>M. galloprovincialis</i> du port de Mostaganem.....	60
III.3. Résultats d'analyses de l'eau de mer du port de Mostaganem.....	63
III.3.1. Résultats de dosage des métaux lourds.....	63
III.3.2. Résultats d'analyse bactériologique.....	65
III.4. Résultats de dosage des protéines totales de l'hémolymphe et de la fraction éluée à 40 %.....	66
III.5. Résultats d'évaluation des propriétés biologiques de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	67
III.5.1. Etude in vitro.....	67
III.5.1.1. Activité antimicrobienne de la fraction peptidique HPF de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	67
III.5.1.2. Activité antioxydante de la fraction peptidique de l'hémolymphe de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	72
III.5.1.2.1. Activité de piégeage des radicaux DPPH par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF).....	72
III.5.1.2.2. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF).....	73
III.5.1.2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la fraction	

peptidique de l'hémolymphe (HPF).....	74
III.5.1.3. Activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	78
III.5.1.3.1. Effet inhibiteur de la fraction peptidique (HPF) vis-à-vis de la dénaturation protéique.....	78
III.5.1.3.2. Effet stabilisateur de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) vis-à-vis de l'hémolyse des hématies (HRBC).....	79
III.5.1.4. Résultats sur la cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> .....	81
III.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> in vivo chez le rat Wistar : test d'oedème induit par la carragénine.....	84
III.5.2.1. Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) sur l'évolution de l'oedème de la patte de rat Wistar.....	84
III.5.2.2. Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de <i>Mytilus galloprovincialis</i> sur les marqueurs de l'inflammation.....	89
III.5.2.2.1. Effet de l'HPF sur la protéine C-réactive (CRPr).....	89
III.5.2.2.2. Effet de l'HPF sur le fibrinogène.....	91
III.5.2.2.3. Aspect histologique de la patte de rat Wistar.....	91
<b>Conclusion</b> .....	94
<b>Références bibliographiques</b> .....	99
<b>Annexes</b>	

# Introduction générale

## Introduction générale

L'immensité de la biodiversité marine est un atout de richesse en diverses espèces animales et végétales qui constituent une source potentielle de biomolécules actives pouvant contribuer au bien-être humain (Destoumieux-Garzón *et al.*, 2016). Les bivalves sont l'un des groupes d'animaux les plus performants sur terre. Ils jouent un rôle clé dans les écosystèmes marins et ont colonisé l'interface entre la terre et la mer au cours des 500 derniers millions d'années, offrant des avantages écosystémiques tels qu'un habitat pour d'autres organismes et une clarification de l'eau (Guo *et al.*, 1999).

Les moules, qui comprennent diverses espèces de mollusques bivalves *Mytilidea*, constituent le plus grand phylum après les arthropodes (Langdon et Newell, 1990) et représentent 13% de la production aquacole mondiale (FAO, 2014). La classification des mollusques repose sur des critères anatomiques discriminant les principaux axes taxonomiques, auxquels s'ajoute la répartition géographique. Le genre *Mytilus*, de la famille des *Mytilidae* (Pelecypoda) est principalement défini par la forme de la coquille, notamment par son extrémité en position terminale. L'espèce *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819), connue sous le nom de moule méditerranéenne (Lubet, 1959), est un mollusque bivalve dont la biologie est parfaitement connue (Naciri, 1998; Narbonne *et al.*, 2005).

Comme tous les invertébrés, les moules, comme *Mytilus galloprovincialis*, manquent de système immunitaire adaptatif, cependant, elles sont extraordinairement bien adaptées aux conditions environnementales défavorables. La plupart des mollusques bivalves marins sont des filtreurs et absorbent les microalgues, les bactéries et les détritiques de l'eau ou des sédiments environnants. La densité bactérienne des tissus des bivalves est supérieure à celle de l'eau de mer et peut être mortelle si les bactéries accumulées sont pathogènes (Cavallo *et al.*, 2009).

Les bivalves se protègent contre les micro-organismes pathogènes grâce à des mécanismes de défense cellulaire (phagocytose, encapsulation) et des facteurs de défense humoraux (lectines, agglutinines, enzymes lysosomales, peptides antimicrobiens) (Tsankova *et al.*, 2012). Les peptides antimicrobiens (PAMs pour antimicrobial peptides) sont de petits peptides (2 à 6 kDa), généralement chargés positivement, de structure amphipathique largement présents chez les mammifères, les amphibiens, les invertébrés marins et les insectes (Qin *et al.*, 2014; Bulet *et al.*, 2004).

Les peptides antimicrobiens de la moule *Mytilus galloprovincialis* sont considérés comme l'un des éléments clés de la défense immunitaire innée (immunité humorale) (Boman, 2003; Hoffmann *et al.*, 1999 ; Zaiou, 2007). Ces peptides endogènes, également appelés antibiotiques naturels, sont définis par le code génétique des cellules productrices (Bulet *et al.*, 2004), et synthétisés sous forme de précurseurs pour être stockés sous forme mature dans différents types de granules hémocytaires. Ils interviennent dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagocytes (réponse immunitaire locale), et libérés dans l'hémolymphe pour prendre part aux réponses immunitaires systémiques ; ainsi, les PAMs de moule participent à la réponse immunitaire à deux niveaux : local et systémique (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 2000c).

Un total de 10 peptides a été identifié chez *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758) et *M. galloprovincialis* (Hubert *et al.*, 1996). Ces PAMs étaient caractérisés par leurs propriétés hydrophobes et cationiques, et ils avaient une structure amphipathique (hélice  $\alpha$ , feuille  $\beta$  en forme d'épingle à cheveux  $\beta$ , feuille  $\beta$  ou structures mixtes hélice  $\alpha$ /feuille  $\beta$ ) qui était censée être essentielle pour leur action antimicrobienne (Bulet *et al.*, 2004). Ces molécules ont été classées en quatre groupes selon les caractéristiques communes de leur structure primaire : MGD (*Mytilus galloprovincialis* Defensin), mytilines, myticines et mytimycine (Mitta *et al.*, 1999a).

Les peptides bioactifs marins, en tant que source de composés bioactifs uniques, font l'objet de recherches actuelles (Chakraborty et Joy, 2020; Panayotova *et al.*, 2020). Ils exercent diverses activités biologiques telles qu'antimicrobienne (Tsankova *et al.*, 2012), antioxydante (Jung *et al.*, 2007), anticancéreuse (Kim *et al.*, 2013), antihypertensive (Je *et al.*, 2005), anti-inflammatoire (Kim *et al.*, 2016), anticoagulante (Jung et Kim, 2009) et antivirale (Balseiro *et al.*, 2011). Il a été démontré que les PAMs exercent peu ou pas d'effet toxique sur les cellules eucaryotes saines, leur véritable cible étant les procaryotes et les cellules eucaryotes anormales (Venier *et al.*, 2011). Étant donné que les invertébrés marins dépendent uniquement de mécanismes immunitaires innés pour se défendre, ils représentent une source potentiellement riche en peptides antimicrobiens pharmacologiquement utiles (Otero-González *et al.*, 2010).

Dans le présent travail, des échantillons de moules *Mytilus galloprovincialis* de taille moyenne mesurant entre 4 et 6 cm, individus correspondant à des jeunes adultes d'environ 18 à 24 mois (Andral, 2004), période pendant laquelle le métabolisme est stable (Rno, 2006), ont

été collectés dans les eaux du port de Mostaganem à une profondeur de 2 mètres entre mars 2016 et avril 2017. Le choix du site de prélèvement des échantillons de moules s'est basé sur la proximité de sources de pollution et la facilité d'accès et l'abondance d'espèces *Mytilus galloprovincialis*, et ceci afin de pouvoir disposer de suffisamment d'individus du même site pendant toute l'expérimentation.

Cette étude comble le manque d'informations sur les propriétés biologiques des peptides d'hémolymphe de la moule *Mytilus galloprovincialis*, capturée dans l'ouest Algérien, en mettant en évidence l'extraction des peptides antimicrobiens de l'hémolymphe et d'en explorer les propriétés biologiques telles que activités antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire et de cytotoxicité contre plusieurs lignées de cellules tumorales. Des expérimentations in vivo et in vitro ont été réalisées.

Ce manuscrit est structuré en trois chapitres :

- Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur la moule *Mytilus galloprovincialis*, et les peptides antimicrobiens.

- Le deuxième chapitre décrit les techniques expérimentales utilisées au cours de ce travail et qui comportent les analyses des paramètres physicochimiques et bactériologiques de l'eau de mer du port de Mostaganem, les analyses des paramètres biologiques de *Mytilus galloprovincialis*, la méthode d'extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis*, le dosage colorimétrique des protéines de l'hémolymphe, les tests d'activité antioxydante, antimicrobienne, anti-inflammatoire in vivo et in vitro et cytotoxicité.

- Le troisième chapitre est consacré à la présentation et la discussion des résultats.

**Chapitre I :**  
**Généralités sur la moule**  
***Mytilus galloprovincialis***  
**et**  
**les peptides antimicrobiens**

## Chapitre I : Généralités sur la moule *Mytilus galloprovincialis* et les peptides antimicrobiens

### I.1. Systématique

La classification des mollusques repose sur des critères anatomiques discriminant les grands axes taxonomiques, auxquels s'ajoute la distribution géographique. Le genre *Mytilus*, de la famille des *Mytilidés* (Pélécytopodes) est principalement défini par la forme de la coquille, en particulier par son embout en position terminale. L'espèce *Mytilus galloprovincialis*, dite moule méditerranéenne (Lubet, 1959), est un mollusque bivalve, dont la biologie est parfaitement connue (Naciri, 1998; Narbonne *et al.*, 2005). La classification de la moule *Mytilus galloprovincialis* a été établie comme suit (Turgeon *et al.*, 1998):

Règne : Animal;

Sous-règne : Bilateria;

Phylum : Mollusca;

Classe : Bivalvia;

Sous-classe : Ptériomorphia;

Ordre : *Mytiloida*;

Famille : Mytilidae;

Genre : *Mytilus*;

Espèce: *galloprovincialis*.

### I.2. Ecologie

Les moules sont des espèces sessiles qui vivent fixées sur substrats durs dans la zone médiolittorale (zone intertidale), elles résistent aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher. Les moules recouvrent des rochers battus par les vagues, mais peuvent proliférer dans les estuaires où l'eau est moins salée, moins claire et moins agitée (Songy et Avezard, 1963). On les retrouve aussi dans les ports (Lubet et Aloui, 1987). La nutrition est un paramètre important dans la répartition des moules qui prolifèrent généralement dans les zones

riches en phytoplancton, en matières organiques dissoutes ou en suspension et en bactéries (Lubet, 1973).

### **I.3. Anatomie de la moule *Mytilus galloprovincialis***

L'anatomie interne et externe de *Mytilus galloprovincialis* est reportée à la figure 1.

#### **I.3.1. Coquille**

Les moules contiennent deux valves lisses ou coquilles extérieures protectrices, de couleur noire bleuâtre, maintenues ensemble par une petite charnière droite (Barhoumi, 2014), permettant la sauvegarde de la masse viscérale (Kamel, 2014).

#### **I.3.2. Le pied et le byssus**

Le pied est inséré en avant de la bosse viscérale, il est comprimé latéralement et prend l'aspect d'un sac. Les mouvements du pied sont assurés par des muscles protracteurs et rétracteurs, pairs, antérieurs et postérieurs, qui s'insèrent symétriquement sur la face interne des valves de la coquille en avant des muscles adducteurs (Beaumont et Cassier, 2004). À sa base se trouve la glande du byssus qui synthétise des filaments (byssus) responsable de la fixation de la moule à son support (Ginet et Roux, 1989). Une fois qu'ils sont sécrétés, les filaments se solidifient au contact de l'eau de mer (Beaumont et Cassier, 2004).

#### **I.3.3. Les branchies**

Les branchies représentent une caractéristique majeure des lamellibranches. Elles consistent en de grands organes en feuillets opérant deux fonctions : la respiration et la filtration de la nourriture à partir de l'eau. Deux paires de branchies sont localisées sur chaque côté du corps (Kamel, 2014).

#### **I.3.4. Le muscle**

La fermeture générale des valves est assurée par deux muscles adducteurs (antérieur et postérieur). Ces muscles sont antagonistes du ligament, qui grâce à son élasticité assure l'ouverture de la coquille (Kamel, 2014).

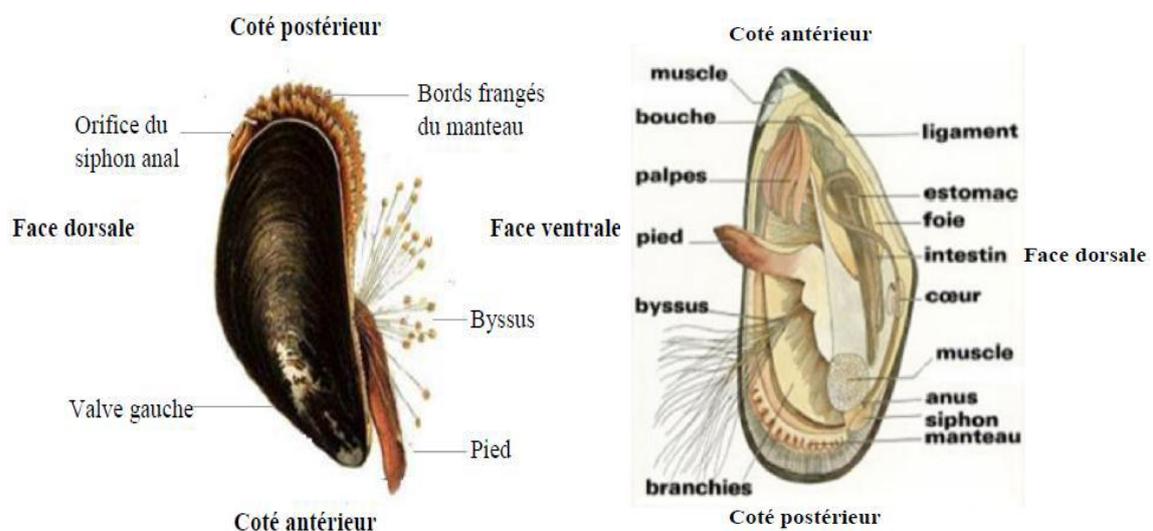
### I.3.5. La glande digestive

Cet organe est encore appelé hépatopancréas car il joue chez cet invertébré un rôle analogue au foie des Vertébrés; il assure la digestion et l'absorption des aliments captés par les branchies (Pagliassoti, 1994).

### I.3.6. Lemanteau

Le manteau enveloppe tous les organes auxquels il est rattaché au niveau du muscle adducteur, de la masse viscérale et des branchies. Il est composé de deux lobes palléaux et remplit plusieurs fonctions (Gagnaire, 2005) :

- Sa fonction première est la sécrétion de la coquille;
- Il assure des fonctions sensorielles tactiles (terminaisons nerveuses) et visuelles (ocelles et osphradies);
- Il intervient dans la nutrition, en participant, au premier tri des particules extérieures;
- Il participe au stockage de matériaux de réserve (lipides, glycogène), à la fonction respiratoire, à la dissémination des gamètes et à la défense par la formation de mucus .Il représente l'une des premières barrières à l'agression par des facteurs externes.



**Figure 1:** Anatomie interne et externe de la moule *Mytilus galloprovincialis* (Khelil 2007).

### **I.3.7. L'hémolymphe**

L'hémolymphe représente l'équivalent du plasma des vertébrés. Chez la moule, ce compartiment correspond essentiellement du point de vue de sa composition saline à l'eau de mer environnante (Lubet, 1969). Il contient aussi quelques protéines et des lipides, circulant sous forme de globules ou de vésicules (Martin *et al.*, 1970).

### **I.3.8. Les hémocytes**

Les hémocytes sont les cellules circulant dans l'hémolymphe et présentant des caractéristiques de certains leucocytes des vertébrés. Ce sont des cellules totipotentes qui interviennent dans les processus de régénération de la coquille et des tissus en cas de blessure et joue un rôle important dans le système immunitaire (immunité non spécifique) en phagocytant de petites particules et des microorganismes (Fisher, 1988).

## **I.4. Physiologie de la moule *Mytilus galloprovincialis***

### **I.4.1. Alimentation**

La moule *Mytilus galloprovincialis* est un animal microphage, cela signifie qu'elle se nourrit de petites particules en suspension dans l'eau de mer. Pour se nourrir, la moule filtre l'eau de mer à travers ses branchies et récupère les particules alimentaires qui y sont retenues. Ce sont les algues microscopiques, le phytoplancton bactéries et débris organiques qui constituent l'essentiel de sa nourriture (Bouchard, 2004).

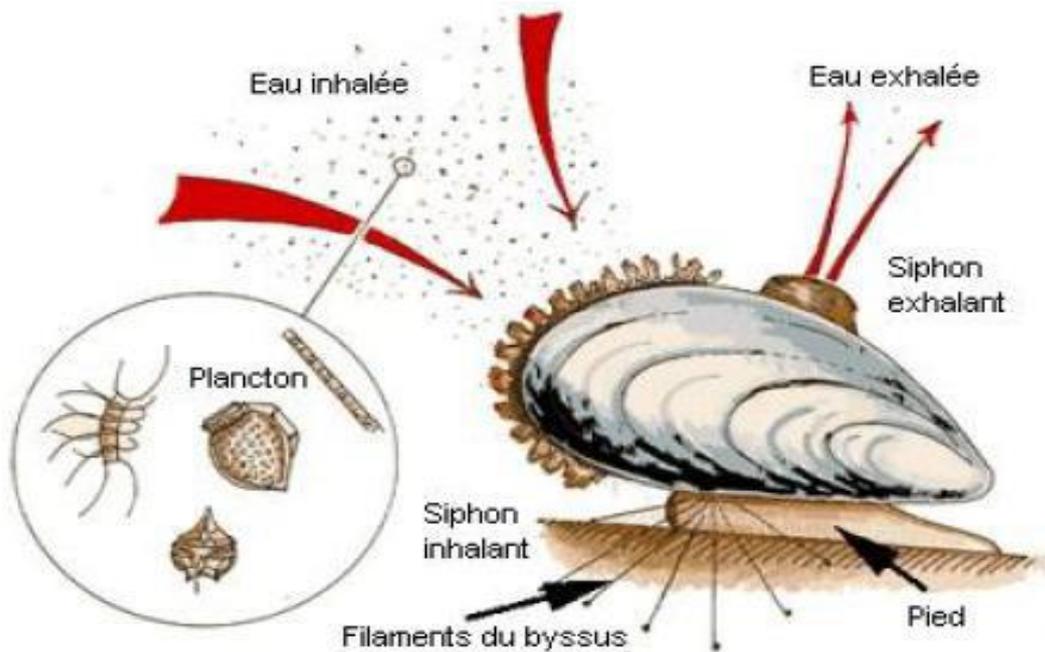
### **I.4.2. Le système excréteur**

Le système excréteur comprend deux reins qui communiquent à la fois avec la cavité péricardique et la cavité palléale. Une partie des déchets vient directement du sang par passage de la paroi du cœur, elle tombe dans la cavité péricardique avec les produits d'excrétion des glandes péricardiques. Le liquide de cette cavité passe ensuite dans les reins qui ajoutent leur propre sécrétion, puis l'évacuent dans la cavité palléale (Bachelot, 2010).

### **I.4.3. Le système respiratoire**

Les échanges d'oxygène se font par l'intermédiaire des branchies. L'eau chargée en oxygène dissous pénètre dans la cavité palléale via le siphon inhalant. Elle est filtrée

par les filaments des deux paires de branchies lamelleuses avant d'être évacuée par le courant exhalant (Fig. 2). L'oxygène ainsi capté pénètre dans l'hémolymphe pour être distribué dans tout l'organisme. Lorsque la moule se retrouve à l'air libre, elle ferme sa coquille et passe à une respiration anaérobie (Cahen, 2006).



**Figure 2:** Système respiratoire chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Aquascope, 2000).

#### I.4.4. Le système circulatoire

L'appareil circulatoire est relativement simple. On y trouve un cœur dorsal (enveloppé par le péricarde) qui comprend deux oreillettes latérales et un ventricule. L'hémolymphe, chassée dans deux aortes, est distribuée aux différentes parties du corps par un réseau de vaisseaux sanguins. L'hémolymphe n'est plus, à ce moment, canalisée en un système de vaisseaux individualisés. Elle gagne ensuite les reins, où elle est purifiée, avant de pénétrer dans les branchies. Dans ces organes, elle s'enrichit alors en oxygène ( $O_2$ ) et se décharge en gaz carbonique ( $CO_2$ ). Une fois oxygénée, l'hémolymphe rejoint les oreillettes du cœur. À ce circuit principal se superpose un circuit accessoire. En effet l'hémolymphe qui circule dans le manteau a la possibilité de suivre une voie de

retour directe au cœur sans passer par les reins ni les branchies. Lors du passage dans le manteau, un échange d'oxygène et de gaz carbonique a lieu également (Gosling, 1992).

#### **I.4.5. Système nerveux**

Le système nerveux des mollusques est composé de troncs pédieux et viscéraux qui s'unissent antérieurement pour former un ganglion cérébral (Jurd, 2000) et a pour principale particularité d'avoir les ganglions pleuraux fusionnés avec les ganglions cérébroïdes (Grasse et Doumenc, 1998). Chez les bivalves, les organes de sens sont absents (Jurd, 2000).

#### **I.4.6. Système immunitaire**

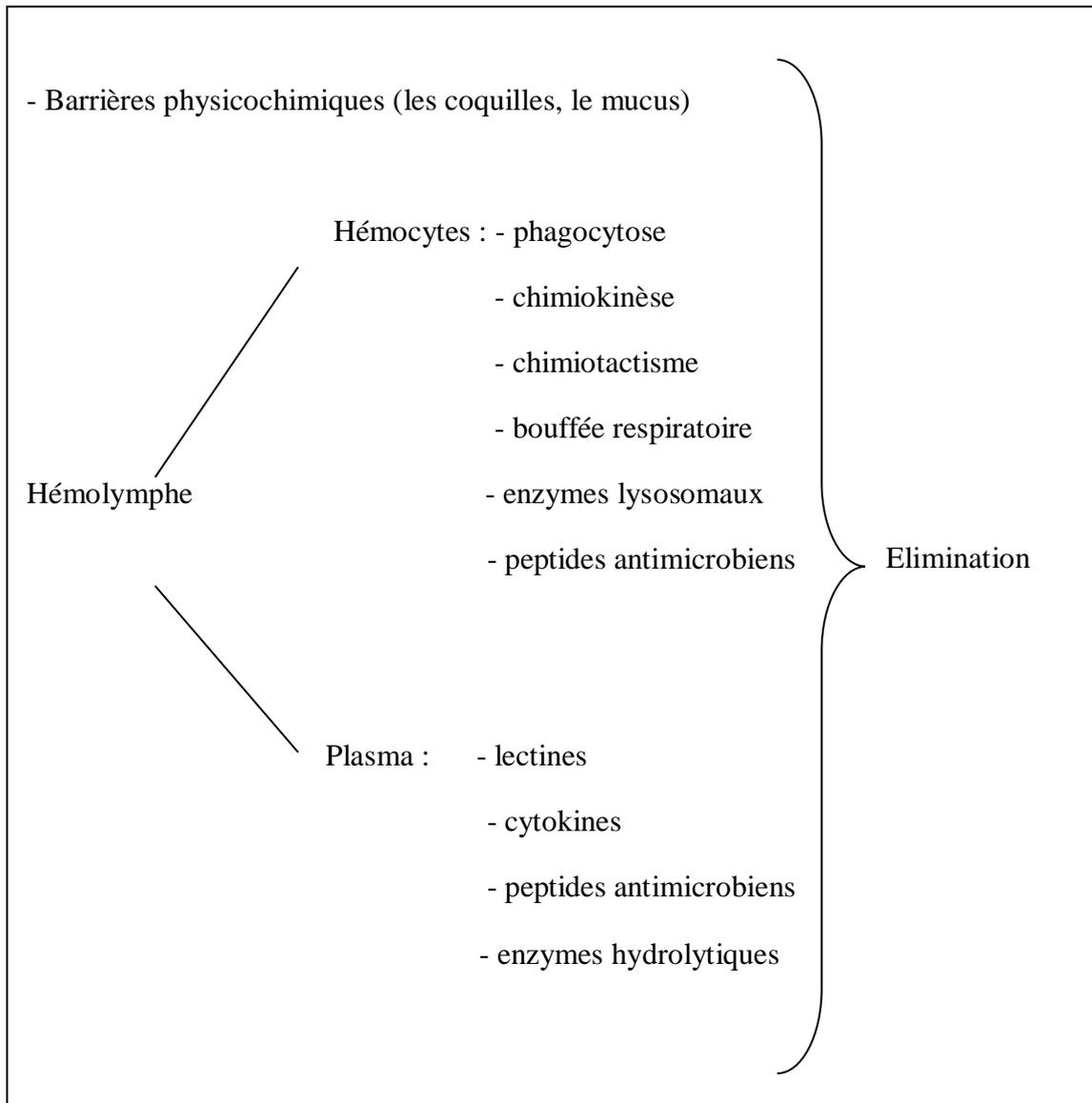
Chez la plupart des mollusques, l'hémolymphe baigne directement les organes internes. L'hémolymphe comme le sang des vertébrés joue un rôle spécifique dans le système de défense (Fisher, 1986; Cheng, 1996; Chu, 2000). Les défenses de l'organisme sont essentiellement non spécifiques et basées sur les activités des hémocytes circulant dans les tissus (Cheng, 1996) et dans les fluides extrapalléaux entre le manteau et la face interne de la coquille (Allam et Paillard, 1998).

Même si les bivalves sont des organismes relativement simples, ils ont un long cycle de vie pendant lequel ils sont constamment exposés à différents microbes potentiellement pathogènes ou invasifs. Comme c'est le cas de tous les autres invertébrés, cette immunité innée est leur seul système immunitaire et comprend deux actions complémentaires : une action impliquant directement les hémocytes (la défense cellulaire) et une action impliquant des molécules libres (la défense humorale) (Canesi *et al.*, 2002) (Fig.3).

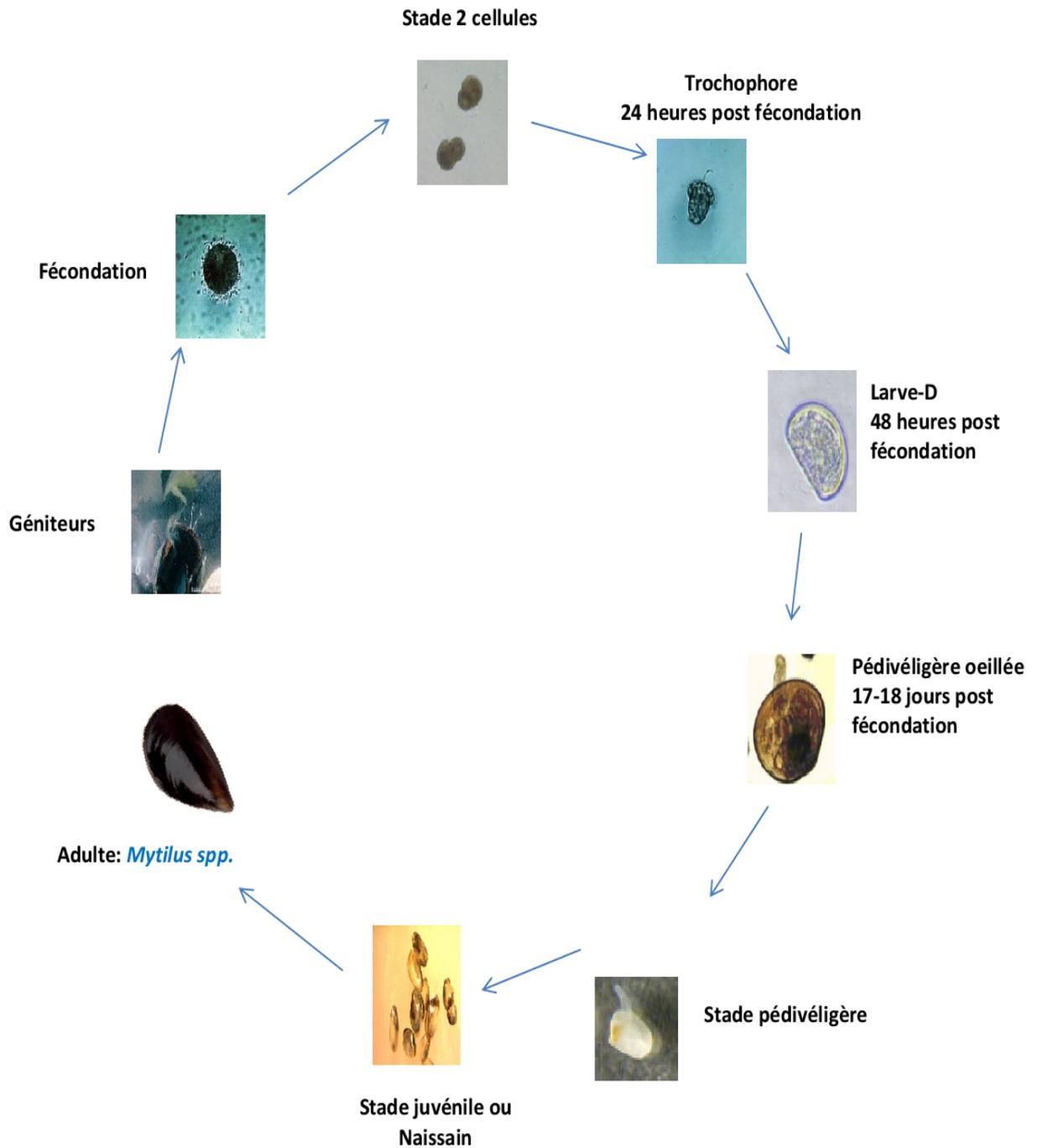
#### **I.4.7. Reproduction**

La moule est sexuellement différenciée. Pendant la période de reproduction, les ovules de la femelle sont libérés dans la cavité palléale où ils sont fécondés par les spermatozoïdes. Ces derniers, déversés dans l'eau par les individus mâles, sont entraînés dans la cavité de la femelle par la circulation d'eau entrante. La fécondation est donc externe. Les œufs très nombreux (environ 500 000) donnent deux stades larvaires successifs: trochophore et véligère. La larve trochophore se transforme en larve véligère

en 24h. Celle-ci se fixe sur un substrat, après 2 à 3 semaines, se métamorphose en jeune moule et devient adulte au bout de 2 ans (Cahen, 2006) (Fig.4).



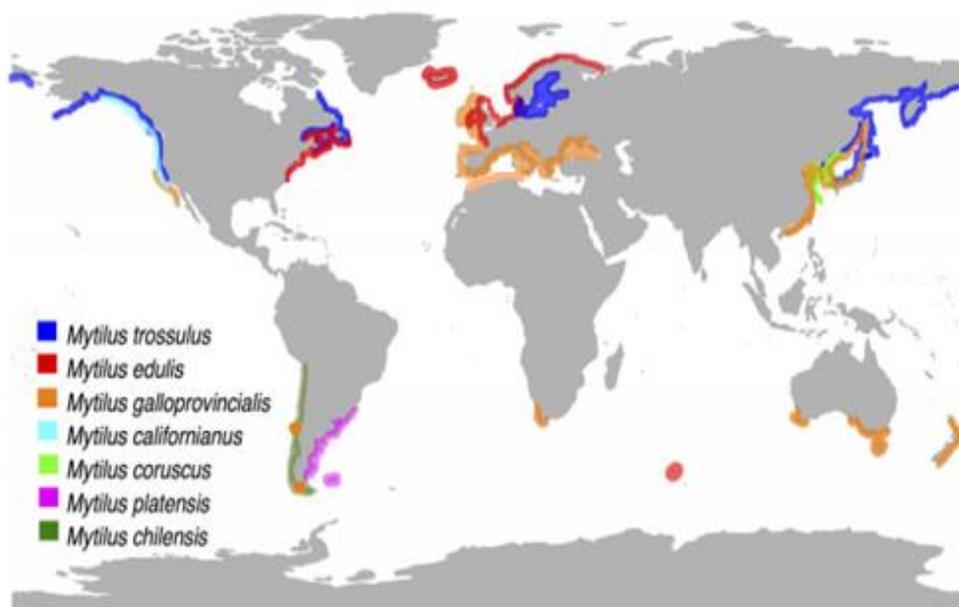
**Figure 3 :** Les système de défense chez les bivalves (Canesi *et al.*, 2002).



**Figure 4:** Cycle de vie de la moule *Mytilus spp* (Boukadida, 2017).

### I.5. Répartition géographique de *Mytilus galloprovincialis*

Les deux espèces les plus représentées sont la moule méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) et la moule bleue *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758). La première est une espèce d'eau chaude et occupe principalement la Méditerranée et se prolonge vers le nord jusqu'à la côte de la France et le Royaume-Uni (Skibinski *et al.*, 1983; McDonald *et al.*, 1991; Gosling, 1992). La seconde est une espèce occupant les régions tempérées et froides le long des côtes atlantiques européennes: de l'Europe du Nord à la frontière française, espagnole dans le golfe de Gascogne (Hilbish *et al.*, 2012). Le chevauchement des zones de répartition de deux espèces sœurs a créé une zone hybride mosaïque, avec une alternance de populations hybrides et de populations parentales pures du Golfe de Gascogne au Nord de l'Écosse (Coustau *et al.*, 1991; Bierne *et al.*, 2003; Hilbish *et al.*, 2012). Cette zone est assez vaste, couvrant plus de 1400 km de côtes, et les populations de moules dans cette zone contiennent des rétro-croisements et d'autres génotypes introgressés qui sont produits par plusieurs générations d'hybridation (Gosling, 1992). Les zones hybrides sont souvent considérées comme des fenêtres sur le processus de spéciation (Harrison, 1990) (Fig. 5).



**Figure 5 :** Distribution mondiale approximative du genre *Mytilus* (Gaitán-Espitia *et al.*, 2016).

## I.6. Les peptides antimicrobiens

### I.6.1. Présentation générale

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des peptides présents chez tous les êtres vivants; ils sont impliqués dans la défense de l'hôte contre les attaques de micro-organismes pathogènes. Les PAMs sont capables de tuer une gamme remarquable de cellules et de microbes, notamment des bactéries, des champignons, des protozoaires, des cellules malignes, des virus enveloppés et des parasites (Dennison *et al.*, 2005; Wiesner et Vilcinskis, 2010).

Les PAMs sont des peptides endogènes synthétisés par l'organisme et définis par le code génétique. Hancock et Chapple (1999) décrivent deux voies de synthèse des PAMs ribosomale et non ribosomale.

Les PAMs synthétisés par voie ribosomale sont dits naturels. Ils sont synthétisés par toutes les espèces vivantes (Devine, 2003; Levy, 2004). Dans les organismes multicellulaires, ces peptides constituent la première ligne de défense de l'organisme contre les agents pathogènes, où ils font partie intégrante du système immunitaire inné (Bulet *et al.*, 2004; Schröder et Harder, 2006; Wiesner et Vilcinskis, 2010).

Dans le cas où ces peptides sont synthétisés par voie métabolique, ils sont stockés et libérés lors d'une attaque de l'organisme par un agent pathogène (Marshall et Arenas, 2003; Brogden *et al.*, 2003). Ils peuvent être également produits par hydrolyse de protéines déjà présentes dans l'organisme inactives à l'origine et dont les peptides générés sont actifs (Lai et Gallo, 2009).

La synthèse non ribosomale des peptides se fait au sein des complexes multi-enzymatiques formés de diverses synthétases. Ces enzymes sont aujourd'hui appelées synthétases de peptides non-ribosomiques, ou Non-Ribosomal Peptide Synthétases (NRPS), qui donnent naissance à des peptides de diverses structures. Ces systèmes sont présents, généralement, chez les bactéries et les champignons (Lipmann *et al.*, 1971).

### **I.6.2. Structure des peptides antimicrobiens**

Plus de 86% des peptides antimicrobiens ont une structure en hélice  $\alpha$  ou en feuillet  $\beta$ , possèdent moins de 50 acides aminés aux propriétés amphiphiles, un caractère cationique (une charge nette comprise entre 0 et +7) et un taux de résidus hydrophobes de 31 à 70% (Wang *et al.*, 2013), et dont le poids moléculaire est compris entre 1 et 5 kDa (Fleury *et al.*, 2008).

Certains peptides ont des structures mixtes en hélice  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$  stabilisées par des ponts disulfures. La perte de ces ponts disulfures, aussi minime soit-elle, entraînerait une perte partielle ou totale de l'activité antimicrobienne (Fazio *et al.*, 2006); alors que d'autres sont des peptides riches en certains acides aminés (aa) tels que l'histidine dans les histatines présentes dans la salive humaine, le tryptophane dans les indolicidines et triterplicitines bovines, la proline et la glycine dans de nombreux peptides d'insectes et la proline et la phénylalanine dans les prophénines (Andres et Dimarcq, 2007) (Fig. 6).

Ces caractéristiques concernent la famille des peptides cationiques, car il existe également des peptides non cationiques comme les peptides anioniques et les peptides dérivés de protéines liées à l'oxygène (Marshall et Arenas, 2003; Brogden *et al.*, 2003). La répartition des peptides antimicrobiens, selon la base de données est reportée au tableau 1.

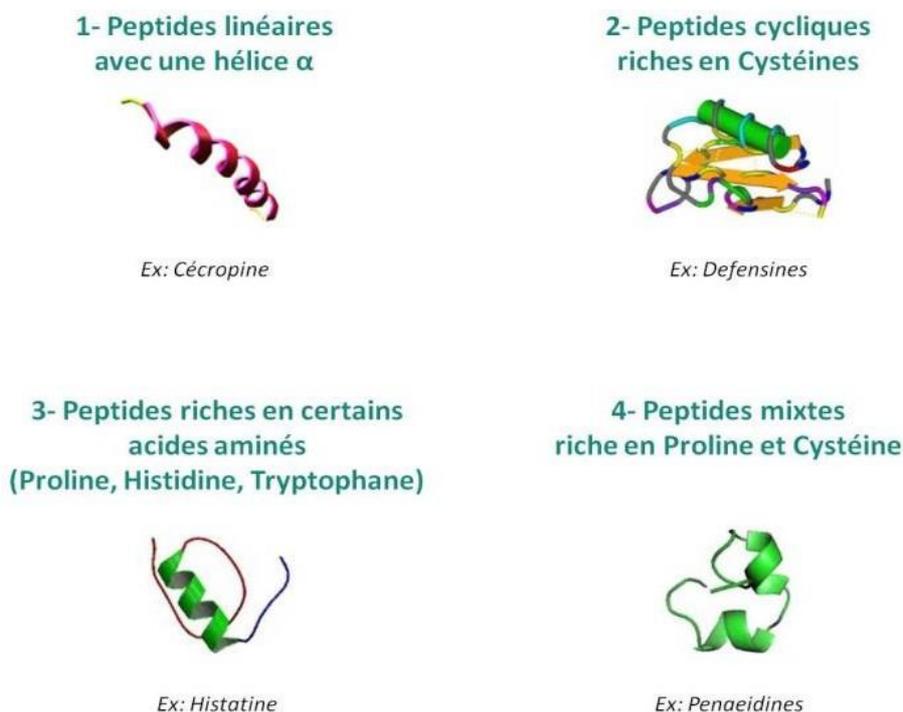
A l'heure actuelle, l'inventaire des peptides antimicrobiens comprend plus de 1000 peptides d'origines différentes, répertoriés dans les bases de données suivantes (Brahmachary *et al.*, 2004):

Antimicrobial Sequence Database (AMSDb):

<http://www.bbcm.univ.trieste.it/tossi/amsdb.html>;

Antimicrobial Peptide Database (APD) : <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>;

Antimic : <http://research.i2r.a-star.edu.sg/Templar/DB/ANTIMIC/>.



**Figure 6 :** Classement des peptides antibactériens en fonction de leur structure secondaire et leur composition en acides aminés (Andres et Dimarcq, 2007).

**Tableau 1 :** Répartition selon la structure des différents peptides antimicrobiens, selon la base de données de peptides antimicrobiens (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>).

Classe structural	Nombre de peptides	Pourcentage
Peptide à structure en hélice $\alpha$	332	14,06
Peptide à structure $\beta$	99	4,19
Peptide à structure mixte $\alpha \beta$	87	3,76
Structure peu commune	9	0,38
Peptide riche en un AA peu commun	82	3,47
Peptide à pont disulfure	385	16,3
Structure inconnue	1352	57,26

### I.6.3. Peptides antimicrobiens chez les mollusques marins

Les premiers peptides antimicrobiens isolés chez les mollusques marins ont été caractérisés chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996). Différentes familles de peptides ont été identifiées. Des défensines (défensines A et B) ont été caractérisées chez la moule *M. edulis* (Charlet *et al.*, 1996; Hubert *et al.*, 1996). Chez *M. galloprovincialis*, des défensines 1 et 2 (MGD1 et MGD2) (Hubert *et al.*, 1996; Mitta *et al.*, 1999b), des mytilines A, B, C, D et G1 chez *M. edulis* (Mitta *et al.*, 1999b), des myticines A et B et une mytimicine chez *M. edulis* ont été purifiées à partir des hémocytes (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 1999b) (Tableau 2).

Ces peptides antimicrobiens sont synthétisés sous forme de précurseurs et stockés sous forme mature dans différents types de granules hémocytaires. Ils interviennent dans la destruction des bactéries à l'intérieur des phagocytes, et sont libérés dans l'hémolymphe pour prendre part aux réponses immunitaires systémiques. Ils sont caractérisés par la présence de 6 à 8 cystéines dans leur séquence primaire, à l'exception de la mytimicine partiellement caractérisée, renfermant 12 cystéines. Les peptides de moules montrent des caractéristiques communes, c'est-à-dire un peptide signal cationique, suivi du peptide mature et d'une extension C-terminale anionique (Mitta *et al.*, 1999a).

La structure tridimensionnelle de la défensine MGD révèle la présence d'un motif cystéine stabilisé CS- $\alpha$ - $\beta$ , caractéristique des défensines d'arthropodes, bien que chez la moule un pont disulfure supplémentaire soit observé dans la séquence (Yang *et al.*, 2001).

Chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis*, plusieurs isoformes de défensines et de mytilines ont été caractérisées et révèlent des activités antimicrobiennes différentes et parfois complémentaires. Cette diversité des peptides antimicrobiens exprimés chez la moule pourrait contribuer à élargir le spectre d'activité vis-à-vis des microorganismes pathogènes au cours de la réponse immunitaire (Mitta *et al.*, 1999a). La localisation et la régulation de l'expression des peptides antimicrobiens ont été étudiées en détail chez la moule *M. galloprovincialis*. Ces travaux ont permis de mettre en évidence des similitudes entre la réaction anti-infectieuse modulée par les peptides antimicrobiens chez ce mollusque et les mammifères.

Les peptides antimicrobiens de moule participent à la réponse immunitaire à deux niveaux : local et systémique (Mitta *et al.*, 1999a; Mitta *et al.*, 2000c). En effet, il a été montré qu'en réponse à une stimulation bactérienne, les hémocytes de moule sont capables de migrer au site d'infection où des phénomènes de phagocytose interviennent. Les bactéries internalisées dans les hémocytes se retrouvent alors en contact avec les peptides antimicrobiens au niveau des phagosomes comme décrits chez les neutrophiles de vertébrés.

À cette réaction locale peut s'en suivre une réaction systémique caractérisée par la libération, par exocytose dirigée, de peptides antimicrobiens et une augmentation notable de leur concentration plasmatique (Mitta *et al.*, 1999b). Le premier peptide antibactérien de ce type, riche en proline, a été identifié chez un mollusque selon Gueguen *et al.* (2009).

**Tableau 2 :** Peptides antimicrobiens isolés et caractérisés chez *Mytilus* sp. et *Crassostrea* sp.  
Activités : G<sup>+</sup> : anti-Gram<sup>+</sup> ; G<sup>-</sup> : anti-Gram<sup>-</sup> ; F : antifongique

	Origine	Organisme source	Peptide (Masse en Da)	Isolé à partir de	Séquences										Activité				
					1	5	10	15	20	25	30	35	40						
Invertébrés Mollusques bivalves	moules	<i>M. edulis</i> (Plasma) (Charlet <i>et al.</i> , 1996)	Défensine A (4314,3)	Plasma	GFGCPNDYPC	CHRHCKS	IPGRXGGYCGGXHRLR	CTCYR										G <sup>+</sup>	
			Défensine B (4392,4)	Plasma	GFGCPNDYPC	CHRHCKS	IPGRYGGYCGGXHRLR	CTC											G <sup>+</sup>
		<i>M. galloprovincialis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 1999b)	MGD-1 (4415,0)	Plasma / hémocytes	GFGCPNNYQC	CHRHCKS	IPGRCGGYCGGWHLR	LRCTCYRCG											G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>
			MGD-2 (inconnue)	Librairies à ADNc	GFGCPNNYAC	HQHCKS	IRGYCGGYCAGWFLR	LRCTCYRCG											G <sup>+</sup> , F
		<i>M. edulis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996)	Mytiline A (3773,7)	Plasma	GCASRCKAKC	AGRRCKGWASASFR	GRCYCKCFRC												G <sup>+</sup> , F
		<i>M. edulis</i> & <i>M. galloprovincialis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 2000a)	Mytiline B (3974,3)	Plasma / Hémocytes	SCASRCKGHCR	RARRCGYVSVLYR	GRCYCKCLRC												G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>
			<i>M. galloprovincialis</i> (Mitta <i>et al.</i> , 2000b)	Mytiline C (4287,05)	Hémocytes	SCASRCKSR	CRARRCRYVSVRYGGFC	YCRC											
	Mytiline D (3868,65)	Hémocytes		GCASRCKAKC	AGRRCKGWASASFR	RRCYCKCFRC												G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>	
	Mytiline G1 (4118,03)	Hémocytes		VVTGSLCKA	HCTFRKCGYFMSVLYH	GRCYCRLLC												G <sup>+</sup>	
	<i>M. galloprovincialis</i> (Mitta <i>et al.</i> , 1999a)	Myticine A (4437,45)	Hémocytes / Plasma	HSHACTSYWC	GKFCGTASCTHYL	CRVLHPGKMCACVH	CSR											G <sup>+</sup>	
		Myticine B (4563,45)	Hémocytes	HPHVCTSYC	SKFCGTAGCTRYG	CRNLHRGKLCFCLH	CSR											G <sup>+</sup>	
	<i>M. edulis</i> (Charlet <i>et al.</i> , 1996; Mitta <i>et al.</i> , 1999a; Mitta <i>et al.</i> , 1999b))	Mytimycine (6233,5)	Plasma	DCCRKPF	RRHCWDCTAGTPYYGYSTRNIFGCTC	---												F	
	huîtres	<i>Crassostrea virginica</i> (Seo <i>et al.</i> , 2005) <i>Crassostrea gigas</i> (Gueguen <i>et al.</i> , 2006) (Gonzalez <i>et al.</i> , 2007) (Gueguen <i>et al.</i> , 2009)	AOD (4271,0)	Branchies	GFGCPWNR	YQCHSHCRS	IGRLGGYCACSLRLTCT	CTYRS										G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>	
Cg-Def (4634,0)			Manteau	GFGCPGNQLK	CNNHCKS	ISCRAGYCDAA	TWLRCTCTD	CNGKK										G <sup>+</sup>	
Cg-Defh-1 (4834,5)			Librairies à ADNc	GFGCPRDQYK	CNSHCQS	IGCRAGYCDAVTL	WLRCTCTD	CNGKK										G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>	
Cg-Defh-2 (4748,4)			Librairies à ADNc	GFGCPGDQYEC	NRHCRS	IGCRAGYCDAVTL	WLRCTCTG	CSGKK											G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>
Cg-PrP (4240,0)			Librairies à ADNc	ILENLLARST	NEDREGS	IFDTGPIRRPKPRPR	PEG												G <sup>+</sup> & G <sup>-</sup>

## **I.6.4. Les activités biologiques des peptides antimicrobiens**

Les PAMs peuvent agir directement sur les bactéries, les virus, les champignons, les cellules tumorales, afin de les éliminer ou moduler la réponse en recrutant et en activant les cellules immunitaires (Hancock et Sahl, 2006). Ils interviennent également dans diverses pathologies. C'est le cas par exemple du peptide LL-37 qui est surexprimé ou inhibé dans différents cas. Leur spectre d'action est si vaste qu'un nouveau terme se développe, celui de HDP, Host Defense Peptides, pour remplacer le terme plus restrictif de PAMs car ils sont impliqués dans plusieurs mécanismes de défense de l'hôte (Yu *et al.*, 2007).

### **I.6.4.1. L'activité directe des peptides antimicrobiens**

#### **I.6.4.1.1. Activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne est la mieux étudiée pour les PAMs. Cette activité résulte principalement de l'interaction des peptides avec la membrane des pathogènes (Diamond *et al.*, 2009). Pour exercer leur activité antimicrobienne, les PAMs agissent directement sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles et provoquent un phénomène d'osmose conduisant à la lyse de la cellule. Ils peuvent également agir par inhibition de la synthèse protéique, de la synthèse d'ADN, des activités enzymatiques ou par perturbation dans la fonction de la paroi.

Les PAMs qui sont généralement cationiques interagissent avec la bicouche lipidique des membranes cytoplasmiques qui contient des phospholipides amphiphiles : tête hydrophile extérieure et chaîne alkyle hydrophobe à l'intérieur. Notons que la membrane des cellules eucaryotes possède une charge neutre tandis que celle des bactéries Gram négatives et des Gram positives possède des phospholipides hydroxylés, dû à la présence de lipopolysaccharides pour les Gram négatives et d'acide lipotéichoïques pour les bactéries Gram positives, qui ancrent la paroi cellulaire.

Les cellules fongiques possèdent également des phospholipides chargés négativement dans leur paroi par la présence de phosphatidylinositol ou de (1,3)-b-D-glucanes polymérisés. L'interaction entre les PAMs et la membrane cellulaire est alors assurée par la charge nette externe des phospholipides de la membrane et la distribution des charges des peptides (Defer

*et al.*, 2009). Par ailleurs, des interactions ligand-récepteur avec les peptides peuvent avoir lieu pour la reconnaissance des PAMs. C'est le cas par exemple de la nisine (Daffre *et al.*, 2008).

Le mécanisme d'action des PAMs se déroule en 3 étapes : La fixation initiale qui dépend de la concentration du peptide et sa capacité de s'auto-structurer, l'intégration dans la membrane et l'aboutissement à la mort cellulaire (Daffre *et al.*, 2008). On distingue 4 modes d'action différents (Jenssen *et al.*, 2006):

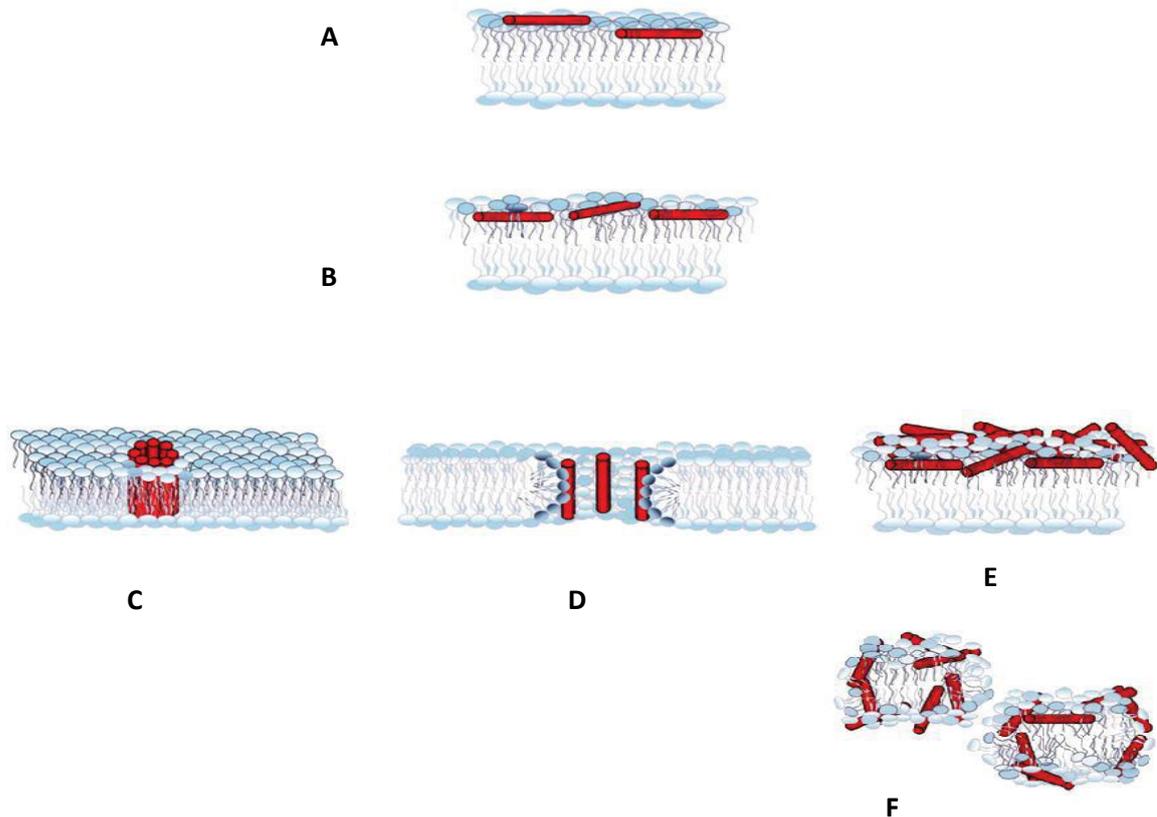
- Le mode d'action en tapis (carpet-like model) qui consiste au recouvrement de la membrane par les peptides d'une façon parallèle, les résidus hydrophobes face à la membrane; ce qui conduit à la réorientation des résidus hydrophiles des phospholipides membranaires, puis à une dépolarisation membranaire et une rupture de la membrane provoquant la formation de pores et fuites des métabolites cytoplasmiques, ou rupture totale de la membrane et mort cellulaire (Fig. 6 E, F).

- Le mode d'action des pores en douves de tonneau (barrel stave model) concerne les peptides amphipathiques en hélice  $\alpha$ . Les surfaces hydrophobes se lient à la partie lipidique de la membrane et les surfaces hydrophiles se retournent et pénètrent vers l'intérieur pour former un pore aqueux. Les canaux transmembranaires ainsi formés détruisent les équilibres osmotiques, conduisant à la lyse cellulaire (Fig. 6 C).

- Le mode d'action par formation de pores toroïdaux (wormhole model) consiste à l'enfouissement des parties hydrophobes des peptides, provoquant le déplacement des têtes hydrophiles des phospholipides et la courbure de la membrane. Lorsqu'un certain ratio peptide/lipide est atteint, la tension engendrée provoque le basculement des peptides perpendiculairement à la membrane, entraînant la naissance de pores mixtes : phospholipides et peptides amphiphiles. La présence de têtes hydrophiles des phospholipides chargés négativement à l'intérieur des pores contribue à les stabiliser en limitant les phénomènes de répulsion électrostatique (Fig. 6D).

- Le mode d'action par formation d'agrégats (aggregate channel model) se traduit par le regroupement des peptides sans orientation particulière, conduisant à la formation d'agrégats

de type micellaires associés aux phospholipides. Ces complexes peptides/lipides sont capables de traverser la bicouche lipidique et de conduire le peptide à l'intérieur de la cellule. Ce mode d'action est utilisé pour des cibles cytoplasmiques.



**Figure 7:** Modèles de perméabilisation des membranes par les peptides antimicrobiens, (A) : les peptides (cylindres rouges) s'associent à la membrane plus ou moins profondément, puis (B) s'y accumulent et commencent à perturber la membrane. Quand une concentration seuil en peptide est atteinte, le peptide perméabilise la membrane selon (C) le modèle du tonneau, (D) le modèle du pore torique ou (E-F) le modèle du tapis (Sato et Feix, 2008).

#### I.6.4.1.2. Activité anticancéreuse

Certains PAMs interviennent sur les cellules tumorales de deux manières : soit en agissant sur les cellules cancéreuses, soit en agissant sur les cellules normales et les cellules cancéreuses à la fois. La toxicité sélective des PAMs pour les cellules cancéreuses peut s'expliquer par le fait que celles-ci sont chargées négativement à cause de la présence

de molécules anioniques comme la phosphatidylsérine (Dobrzynska *et al.*, 2005) ou de mucines O-glycosylées riches en saccharides chargés négativement (Burdick *et al.*, 1997 ; Yoon *et al.*, 1996). Les cellules cancéreuses ont une surface plus grande que les cellules normales; ce qui leur permet d'interagir avec une quantité plus importante de peptides que les cellules normales (Chan *et al.*, 1998).

#### **I.6.4.1.3. Autres activités**

Les peptides à activité antifongique agissent le plus souvent en perméabilisant la membrane des champignons (Jenssen *et al.*, 2006). Les peptides antiviraux agissent par inhibition de l'entrée virale, interaction avec l'héparane sulfate, interaction avec les récepteurs cellulaires ou les glycoprotéines virales, par interaction avec l'enveloppe virale ou encore blocage de la propagation des virus dans les cellules avoisinantes (Sinha *et al.*, 2013; Jenssen *et al.*, 2006).

#### **I.6.4.2. Les peptides antimicrobiens dans l'immunomodulation**

Les PAMs sont immunomodulateurs car ils sont étroitement impliqués dans l'immunité innée et adaptative. Ils favorisent le recrutement de cellules effectrices comme les neutrophiles, les cellules dendritiques immatures, les mastocytes et les cellules T vers le site de l'infection.

Les PAMs sont capables d'améliorer de manière sélective la réponse pro-inflammatoire ou anti-inflammatoire en induisant le chimiotactisme des leucocytes, l'induction de chimiokines et de cytokines comme la LL-37 humaine, la libération des hormones par dégranulation des phagocytes dans les sites d'infection.

Par exemple, l'LL-37 attire les neutrophiles, les monocytes, les lymphocytes T, les mastocytes en utilisant les récepteurs couplés aux protéines G (De Yang *et al.*, 2000) ou encore la catestatine, une molécule chimiotactique, qui provoque le recrutement des PMNs (Poly Morpho Nucléaire) au site d'inflammation (Shooshtarizadeh *et al.*, 2010).

Les PAMs participent aussi à l'homéostasie de l'organisme en régulant les réponses inflammatoires excessives. À titre d'exemple, les propriétés anti-endotoxines de la LL-37 et de l'indolicidine peuvent être citées (Bowdish et Hancock, 2004 ; Mookherjee *et al.*, 2020).

En effet, lors de la défense de l'organisme, la lyse des cellules bactériennes libère des endotoxines. Celles-ci engendrent des réponses inflammatoires excessives. Ces peptides interviennent pour réduire ces réactions inflammatoires et inhibent également l'expression des gènes inflammatoires induite par l'endotoxine et la sécrétion des médiateurs inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) (Atindehou, 2012).

#### **I.6.4.3. Les peptides antimicrobiens dans la régénération nerveuse et tissulaire**

Les PAMs sont également impliqués dans l'angiogenèse et la cicatrisation des plaies. C'est le cas de la LL-37 qui active les cellules épidermiques et les fibroblastes pour former un tissu de granulation ayant un effet chimiotactique sur les macrophages et les fibroblastes dans la cicatrisation (Steinstraesser *et al.*, 2008). La LL-37 stimule l'expression de facteurs de croissance et des cytokines telles que l'interleukine IL-18 dans les cellules épithéliales et les kératinocytes, provoquant ainsi la guérison des plaies et joue un rôle important dans l'angiogenèse et l'arthériogenèse (Koczulla *et al.*, 2003).

Diverses études ont également montré son rôle protecteur dans les infections invasives bactériennes cutanées causées par *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et les streptocoques du groupe A (Braff *et al.*, 2005). Les PAMs sont également impliqués dans la régénération nerveuse (Schikorski *et al.*, 2008).

#### **I.6.4.4.L'expression des peptides antimicrobiens dans les pathologies**

L'expression des certains PAMs peut être modifiée dans certaines maladies inflammatoires humaines telles que la maladie de Crohn, le psoriasis et les maladies cardiovasculaires. Les peptides antimicrobiens peuvent également servir de marqueur pour le diagnostic des pathologies à l'exemple de la LL-37 qui est surexprimée chez les patients atteints de tuberculose (Yamshchikov *et al.*, 2010).

#### **I.6.4.5. Les peptides antimicrobiens dans les médicaments**

Les PAMs peuvent être considérés comme des médicaments ou des adjuvants. En effet, l'implication des PAMs dans le traitement des sepsis a été auparavant rapportée par certains auteurs (Brandenburg *et al.*, 2011 ; Bradshaw, 2003). Plusieurs PAMs sont en phase

clinique d'expérimentation et sont prometteurs. De plus, pour pallier à certains de leurs inconvénients, tels que le coût de leur synthèse, leur stabilité et leur biodisponibilité, un nouveau concept a vu le jour; il s'agit des peptides nommés "drug designed" qui sont des peptides modifiés pour améliorer leurs potentialités.

Les PAMs interviennent aussi en tant que Peptides Pénétrant les Cellules (PPCs) ou Cell Penetrating peptides (CPPs) pour faciliter l'interaction avec les cellules des pathogènes et permettre la pénétration de certaines drogues dans leur cible sans perméabilisation préalable ou en tant que transporteur (Zhang *et al.*, 2011). Ils peuvent aussi être utilisés comme adjuvant à certaines drogues ou vaccins (Tani *et al.*, 2000). Cette propriété de CPPs a été retrouvée pour la catestatine et la chromofungine (Zhang *et al.*, 2009).

# Chapitre II :

**Matériels**

**et**

**Méthodes**

## Chapitre II : Matériels et méthodes

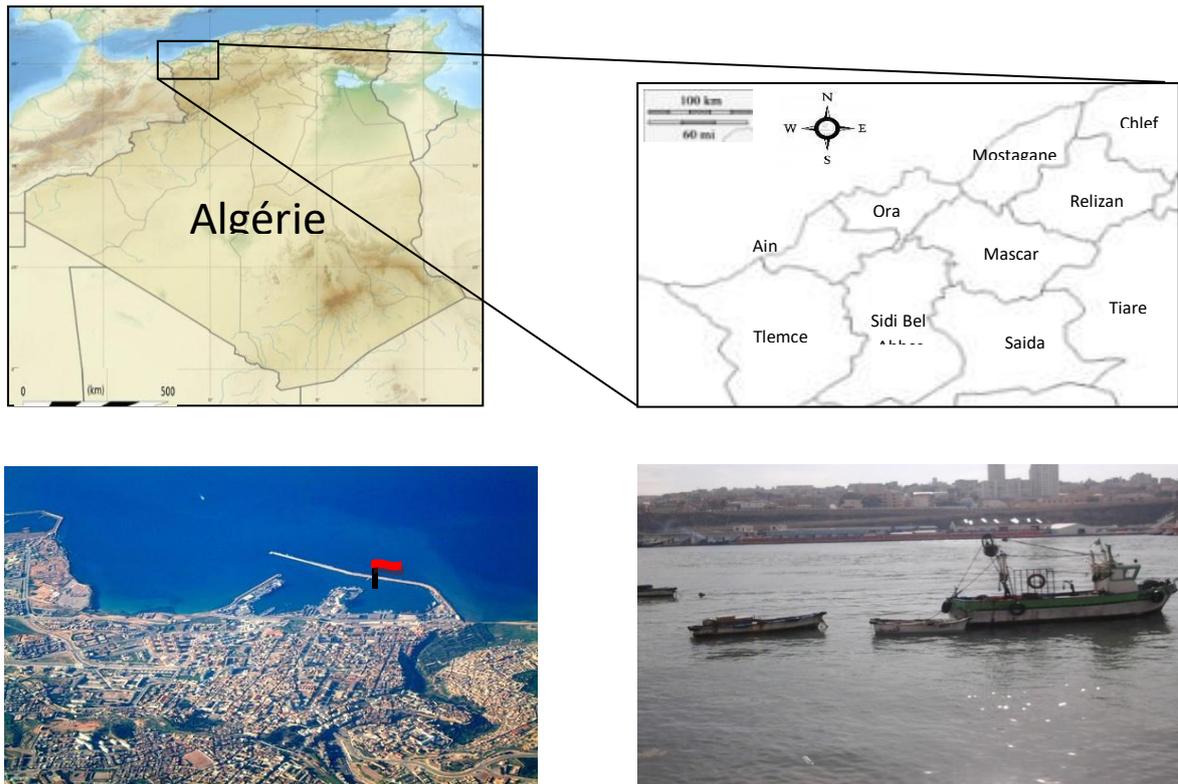
### II.1. Site de prélèvement

Les moules *Mytilus galloprovincialis* ont été prélevées des eaux du port de la ville de Mostaganem qui est cadré entre la pointe de Salamandre à l'Ouest et l'embouchure de l'Oued Ain Séfra à l'Est (35° 56.00' N, 0°4.45'E) avec un linéaire de quai de 2 Km et une superficie de 98 ha abritant 2 bassins. La protection de ce port est attribuée à une immense jetée fortement bétonnée, longue de 1830 m et renforcée, sur toute sa longueur, par des blocs de pierres (Fig. 8).

### II.2. Prélèvement des moules *Mytilus galloprovincialis*

Des échantillons de moules *Mytilus galloprovincialis* de taille moyenne mesurant entre 4 et 6 cm, individus correspondant à des jeunes adultes d'environ 18 à 24 mois (Andral, 2004), période pendant laquelle le métabolisme est stable (Rno, 2006), ont été collectés à un profond de 2 m entre mars 2016 et avril 2017, en utilisant un couteau stérile pour couper le byssus qui lui sert d'organe d'ancrage sur les rochers. Un élevage de moules a été réalisé dans le port pour assurer la présence de moules tout au long de l'année d'étude (Fig. 9).

Les moules prélevées sont lavées à l'eau de mer et débarrassées des byssus et des *épizoaires* présents sur leurs coquilles, puis transportées dans une glacière étanche et hermétique remplie d'eau de mer. Une fois au laboratoire, elles sont rapidement transférées dans un aquarium rempli de cette même eau de mer, pour une phase de stabilisation, l'oxygénation de l'eau de mer est un élément essentiel dans l'aquarium (Fig. 10). Les moules sont laissées s'acclimater aux conditions du laboratoire pendant au moins une semaine afin de réduire l'effet du stress dû au prélèvement et au transport. L'eau de mer de l'aquarium, seule source de nourriture, est renouvelée tous les quatre jours. Les individus morts sont éliminés chaque jour.



**Figure 8:** Position géographique du site d'échantillonnage de *M. galloprovincialis* (Google Maps, 2016 ; photo prise par Otsmane El Haou, 2016).



**Figure 9:** Mytiliculture de *Mytilus galloprovincialis* dans le port de Mostaganem.



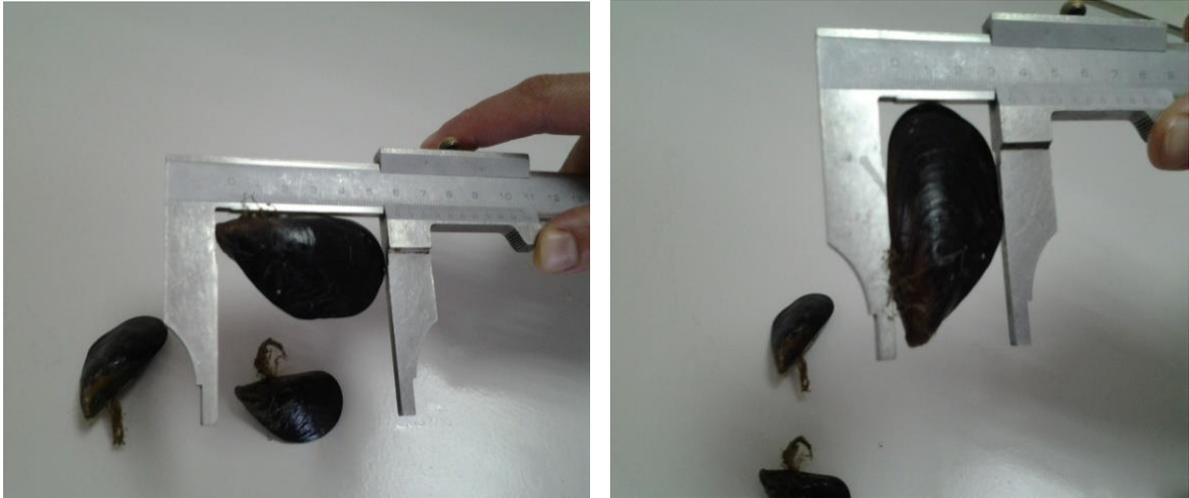
**Figure 10 :** Période de stabilisation des moules *M. galloprovincialis* au laboratoire des microorganismes bénéfiques, des aliments fonctionnels et de la santé Mostaganem.

### II.3. Mesure des paramètres biologiques de la moule *Mytilus galloprovincialis*

#### II.3.1. Biométrie

Les bivalves sont triés, nettoyés et débarrassés de leurs épibiontes, avant de prendre les différentes mesures de la coquille réalisée à l'aide d'un pied à coulisse de précision 1/20 mm (FACOM 816, France). Cette opération est réalisée rapidement afin d'éviter tout stress. Ensuite, on procède à la mesure de l'indice de conditions comme le montrent [Beninger et al. \(1984\)](#). Les paramètres linéaires (en mm) retenus sont indiqués à la figure 11.

- La longueur totale (L : prise suivant l'axe antéro -postérieur);
- La hauteur (h : distance maximale suivant l'axe dorsa-ventral);
- L'épaisseur (l: est la largeur maximale de la convexité des 2 valves réunies).



**Figure 11:** Mensuration de la longueur et largeur de la moule *M. galloprovincialis* à l'aide de pied à coulisse.

### II.3.2. Indice de conditions

Le suivi des variations de l'indice de conditions (IC) permet d'évaluer l'état de santé des organismes et les fluctuations de leurs réserves énergétiques, qu'il s'agisse d'engraissement ou d'amaigrissement. Il correspond au rapport entre le poids frais du corps mou de l'individu et le poids corporel total avec la coquille et la masse molle sans liquide intra-intervallaire. La pesée a été effectuée à l'aide d'une balance de précision (D-72336, KERN-KB 6000-1, Allemagne). L'IC des moules a été calculé selon la formule recommandée par [Afnor \(1984\)](#):

$$IC = \frac{\text{Poids frais du corps mou (g)}}{\text{Poids total sans liquide intra-intervallaire (g)}} \times 100$$

- Poids total de la coquille sans liquide intra-intervallaire = poids de la coquille avec la masse molle et sans le liquide intra-intervallaire ;
- Poids frais total: poids de la masse molle humide totale de l'animal vivant.

## **II.4. Analyse bactériologique de l'eau de mer du site de prélèvement**

Dans cette étude, les bactéries indicatrices de pollution (Coliformes, Streptocoques) et les bactéries pathogènes (Salmonelles, vibrions cholerae) sont recherchées par une méthode colorimétrique simple utilisant une technique de numération en tubes multiples (TNTM) avec détermination du nombre le plus probable de germes (NPP) à partir de la table de Mac Grady (annexe 1) issue de la norme NF T90-413, préconisée par l'unité de coordination du PAM (Plan d'Action pour la Méditerranée) (Anonyme, 1987). C'est l'examen le plus important et le plus pratiqué dans l'analyse des eaux ou des fruits de mer, répondant à des préoccupations sanitaires (Rodier, 1978).

### **II.4.1. Prélèvement de l'eau de mer**

Des flacons en verre de 250 mL rigoureusement nettoyés au préalable (double rinçage à l'eau distillée), séchés, bouchés, puis stérilisés à l'autoclave (13245, AVX 90 E, GETINGF, France) à une température de 121°C pendant 15min ((O.M.S, 1983 ; Rodier, 2005). Les flacons stériles sont plongés à une profondeur d'environ 50 cm de la surface de l'eau puis ouverts à contre courant. Une fois remplis, ils sont refermés sous l'eau pour éviter la formation de bulles d'air et tout risque de contamination lors du transport. Une fois les prélèvements effectués, les flacons sont étiquetés et placés dans une glacière à l'abri de la lumière et à une température de 4°C pour éviter que la teneur en germes des eaux ne risque de subir des modifications dans les flacons après le prélèvement.

La norme NF T 90-420 de février 1987 indique que les échantillons doivent être maintenus à une température comprise entre 1 et 4°C dès leur prélèvement. Ils doivent être analysés le jour même, il est donc admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas excéder 24h. C'est pourquoi il est préférable de le raccourcir lorsque l'eau est présumée être très polluée (Rodier, 2005).

En ce qui concerne, la surveillance des eaux côtières, l'analyse au laboratoire débute dans un délai maximum de 8 heures après le prélèvement de l'échantillon selon les recommandations de Rodier (1984). Tout prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignements sur laquelle on note (annexe 2) :

- Date, heure et lieu de prélèvement ;
- L'état de la mer, la direction et la vitesse du vent ;
- La température et le pH de l'eau de mer ;
- La salinité mesurée avec un conductimètre-salinomètre (SSM-21P/DKK-TOA , France);
- La concentration en oxygène mesurée dissous avec un oxymètre (HI 9146, France).

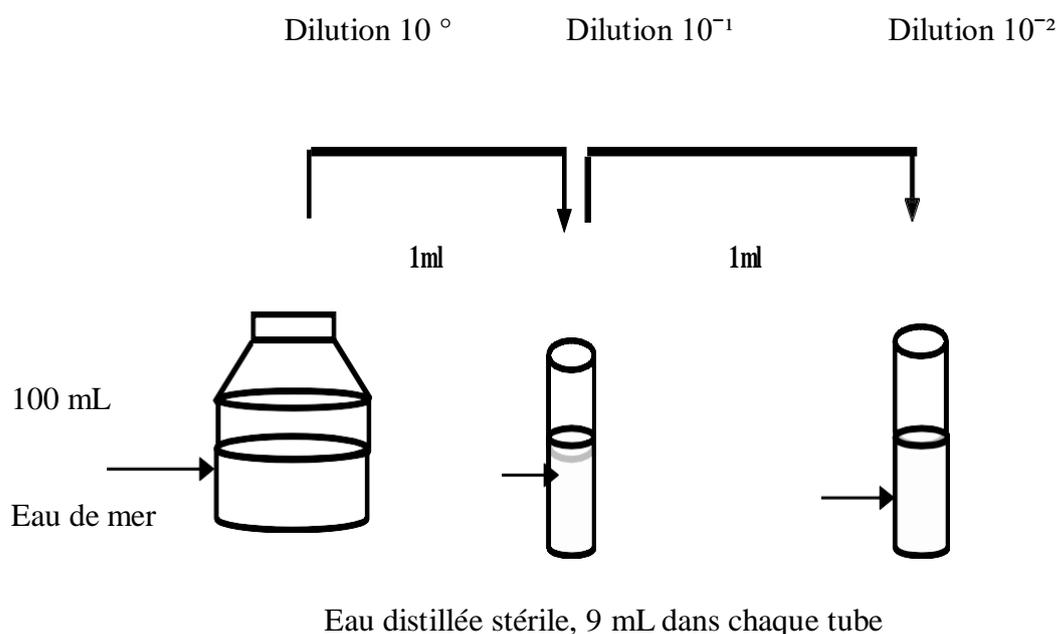
#### **II.4.2. Préparation des dilutions décimales**

Conformément aux normes AFNOR NF VO8-010 et ISO 6887-1, on effectue des dilutions décimales pour l'eau de mer à l'aide d'eau distillée stérile, ou tampon phosphate. Elles doivent être effectuées dans des conditions stériles. Les dilutions suivent des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométrique (Fig. 12):

- Dilution  $10^0$  : consiste à la prise directe de la solution mère (100 mL d'eau de mer) ;
- Dilution  $10^{-1}$  dans un tube à essai contenant 9 mL d'eau distillée stérile, on ajoute 1 mL d'eau à analyser ( $10^0$ ) ;
- Dilution  $10^{-2}$  dans un deuxième tube à essai, on ajoute 1 mL de la dilution  $10^{-1}$  à 9 mL d'eau distillée stérile. L'agitation du contenu avec vortex (R800003684 Stuart, RPC) est nécessaire avant de préparer chaque dilution.

#### **II.4.3. Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'*Escherichia coli***

Selon la norme NF T90- 413, la recherche des coliformes consiste à utiliser des milieux liquides de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB), dans des tubes équipés de cloches de Durham. La présence des coliformes recherchés se traduit par un changement de couleur du milieu et dégagement de gaz dans les cloches. La colimétrie implique deux tests : un test présomptif qui recherche et dénombre les coliformes totaux et un test confirmatif qui identifie les coliformes thermotolérants (*E. coli*).

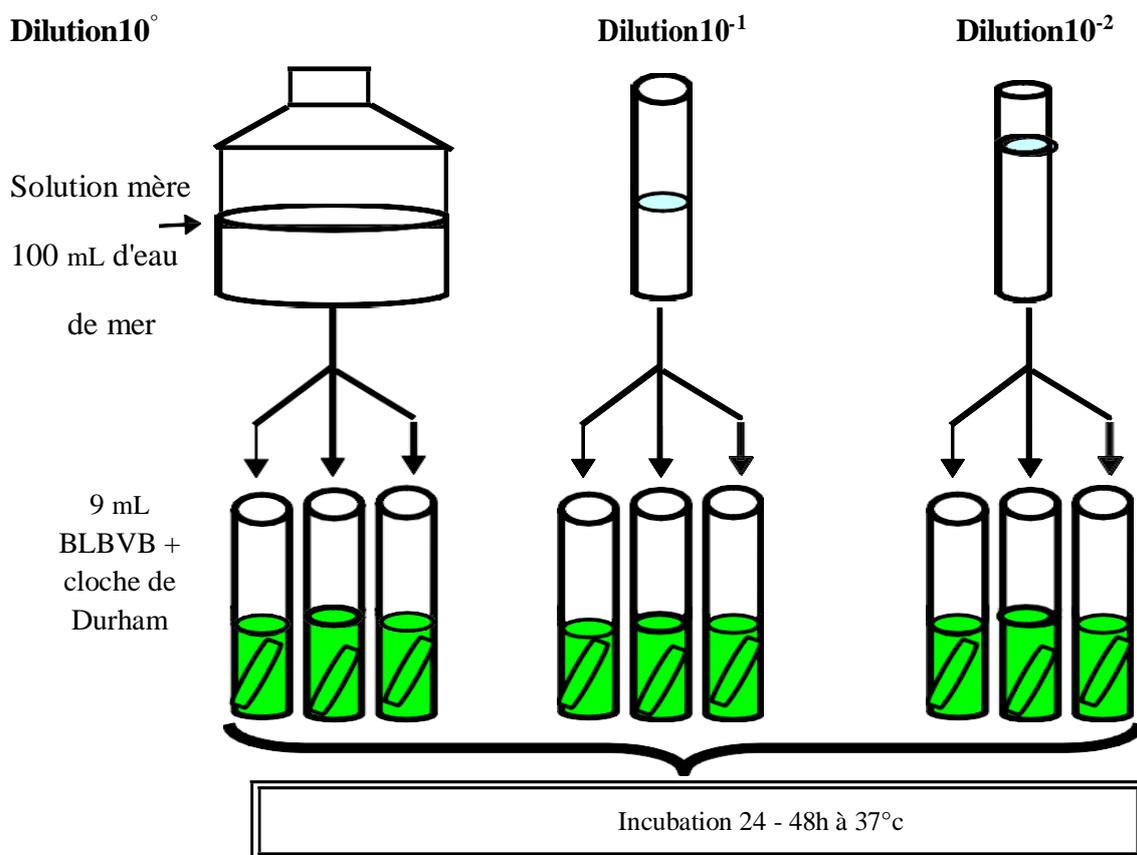


**Figure 12 :** Préparation des dilutions décimales.

#### II.4.3.1. Test présomptif: Recherche et dénombrement des coliformes totaux

On prépare 3 séries de 3 tubes chacune contenant 9 mL BLBVB simple concentration (S/C), munis de cloches de Durham. Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 mL de la solution mère  $10^0$  (l'eau de mer du port de Mostaganem). Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 mL de la dilution  $10^{-1}$  et 1 mL de la dilution  $10^{-2}$ . Ces préparations sont homogénéisées par agitation au vortex sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham.

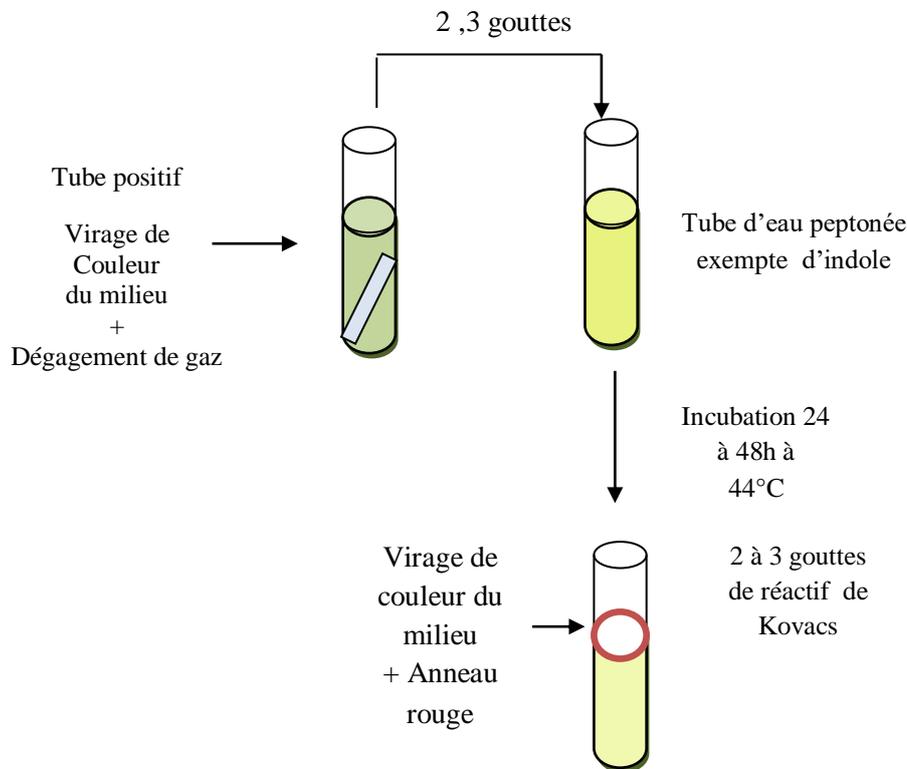
L'ensemble des tubes sont ensuite incubés à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 à 48h (HRDP-150AB, Chine). Le dénombrement est effectué selon la méthode du nombre le plus probable (NPP) de la table de Mac Grady (annexe 1) (Fig. 13). Cette phase de colimétrie repose sur la propriété commune des coliformes de fermenter le lactose tout en produisant du gaz, cela permet seulement de supposer la présence de coliformes dans l'eau à analyser. L'application du test de confirmation est donc essentielle.



**Figure13:** Recherche et dénombrement des Coliformes totaux selon la norme NF T90- 413 (test présomptif)

#### II.4.3.2. Test confirmatif : Identification des Coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*)

Les tubes positifs BLBVB présentent un virage de couleur ainsi qu'un dégagement de gaz dans la cloche de Durham sont réensemencés (2 à 3 gouttes) dans des tubes d'eau peptonée exempte d'indole et incubés à 44°C pendant 24 à 48h (HRDP-150AB, Chine) (Kadri Skander, 2015) (Fig.14). La formation d'un anneau rouge à la surface des tubes d'eau peptonée après l'ajoute de 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs indique la production d'indole par *Escherichia coli*, suite à la dégradation du tryptophane grâce à la tryptophanase. Le nombre de germes est déterminé selon la table de Mac Grady (annexe 1) dans 100 mL d'échantillon d'eau de mer.



**Figure 14:** Identification des Coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) (test confirmatif).

#### II.4.4. Recherche, dénombrement et identification des Streptocoques (Entérocoques)

La recherche des streptocoques (entérocoques) est associée à celle des Coliformes d'où la nécessité de les combiner ensemble (Rodier, 1978). Conformément à la norme NF T 90-411, le principe se résume à la recherche et au dénombrement des streptocoques du groupe D en milieu liquide.

##### II.4.4.1. Test présomptif : recherche et dénombrement des streptocoques

Trois séries de 3 tubes contenant chacun 9 mL de milieu Rothe simple concentration sont préparées. Dans la première série de tubes nous rajoutons 1 mL de la solution mère ( $10^0$ ) (l'eau de mer). On réalise la même opération avec les 2 autres séries en ajoutant aux 3 premiers 1 mL de la dilution  $10^{-1}$  et aux 3 autres 1 mL de la dilution  $10^{-2}$ . L'ensemble des tubes ainsi

préparés sont incubés à 37°C pendant 24 à 48h (HRDP-150AB, Chine). Les tubes présentant un trouble bactérien sont considérés comme positifs (Fig. 15).

#### **II.4.4.2. Test confirmatif : Identification des streptocoques du groupe sérologique D**

L'ensemencement de 2 à 3 gouttes de chaque tube positif présentant un trouble bactérien dans des tubes contenant 9 mL de milieu Litsky. Par la suite, les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 à 48h (HRDP-150AB, Chine). Nous considérons comme positifs les tubes dans les quels il y a apparition d'un trouble bactérien qui confirme la présence des streptocoques fécaux; parfois, la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette de signification identique à celle du trouble bactérien (Rodier, 1975) (Fig. 16).

### **II.4.5. Recherche des bactéries pathogènes**

#### **II.4.5.1. Recherche des Salmonelles**

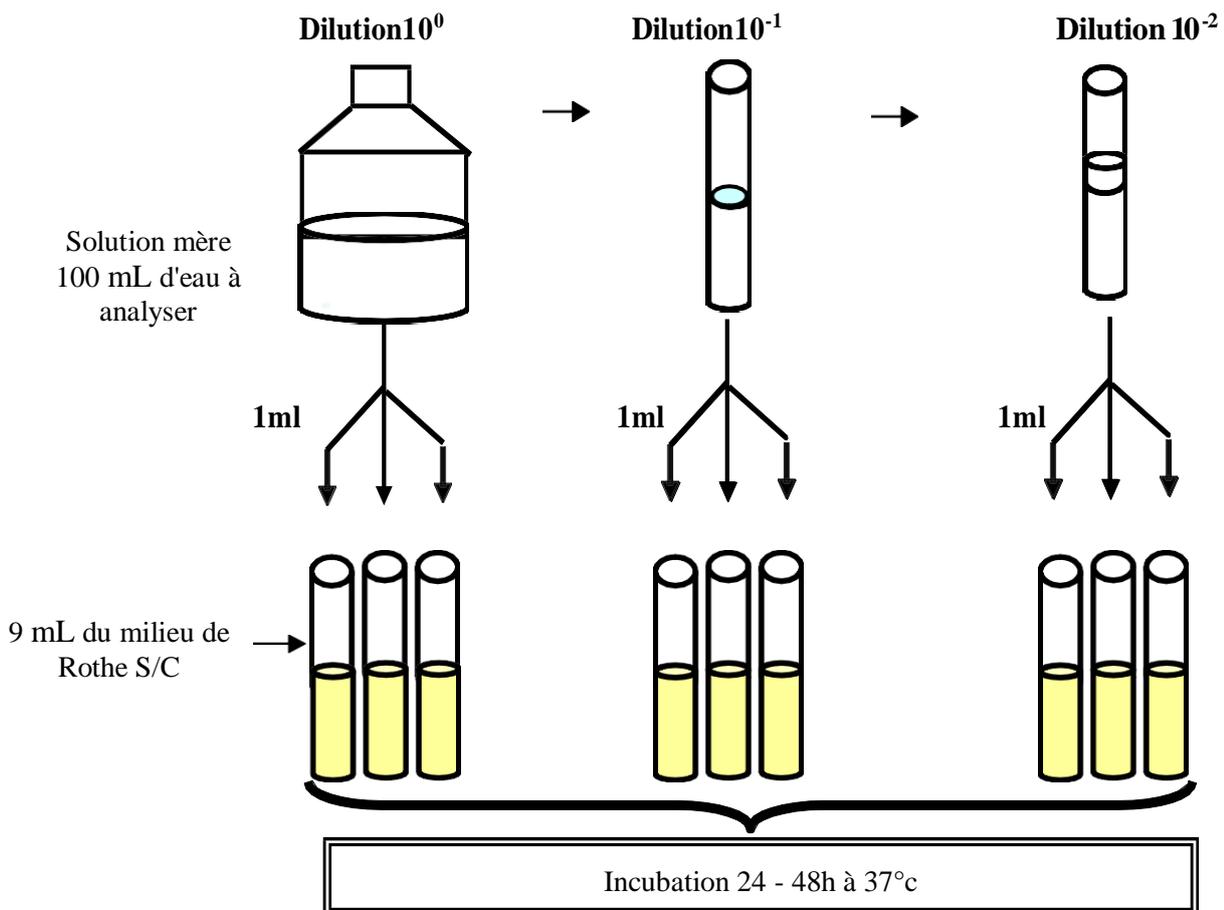
La recherche des salmonelles se fait en 3 étapes successives selon Rodier et al. (1996):

- Préenrichissement : l'ensemencement de 100 mL d'eau de mer dans 100 mL d'eau peptonée tamponée, puis l'incubation a 37°C pendant 16h (HRDP-150AB, Chine) au moins et 20h au plus.
- Enrichissement : cette étape consiste à l'ensemencement de 3 à 5 gouttes de bouillon de préenrichissement dans un milieu sélectif SFB (bouillon sélénite-fèces) avec l'additif SFB, puis incubation a 37°C pendant 48h.
- Isolement : l'ensemencement en surface de 0.1 mL de bouillon d'enrichissement positif dans un milieu sélectif solide Héктоen (colonies vertes ou bleues vertes à centre noir) ou la gélose Salmonella Shigella (colonies incolores transparentes à centre noir), après l'incubation à 37 pendant 48h.

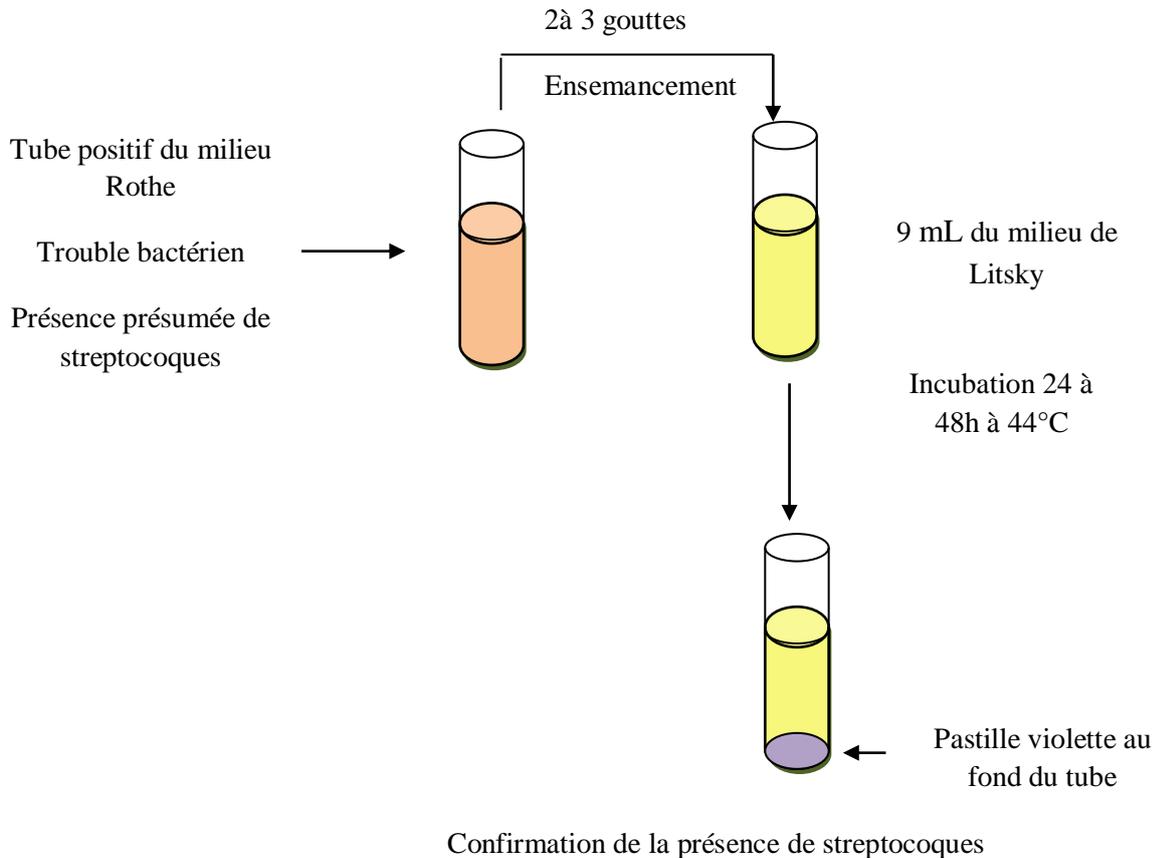
#### **II.4.5.2. Recherche de vibrio cholerae**

Le protocole d'isolement de vibrio cholerae adopté est celui décrit par Lesne et al. (1991).

- Enrichissement : on procède à l'ensemencement de 450 mL d'eau de mer dans 50 mL d'eau peptonée alcaline 10 fois concentrée (EPA 10×C). Après 6h d'incubation à 37°C (HRDP-150AB, Chine), un voile apparaît à la surface du flacon. Sans agiter, on prélève 1 mL à la surface du flacon et on l'ajoute au tube de deuxième enrichissement effectué dans 20 mL d'eau peptonée alcaline simple, puis incubation à 37°C pendant 6h. Le prélèvement s'est fait à partir du voile à la surface car les vibrions ont tendance à se développer dans la partie supérieure du milieu (Eddabra, 2011).
- Isolement: Un isolement sur milieu sélectif consiste à ensemencer le milieu Gélose Nutritive Alcaline Biliée (GNAB) à partir du bouillon de deuxième enrichissement puis une incubation à 37°C pendant 24 à 48h. Les colonies grisâtres transparentes représentent le germe vibrio cholerae.



**Figure 15:** Recherche et dénombrement des Streptocoques totaux dans l'eau de mer (test présomptif).



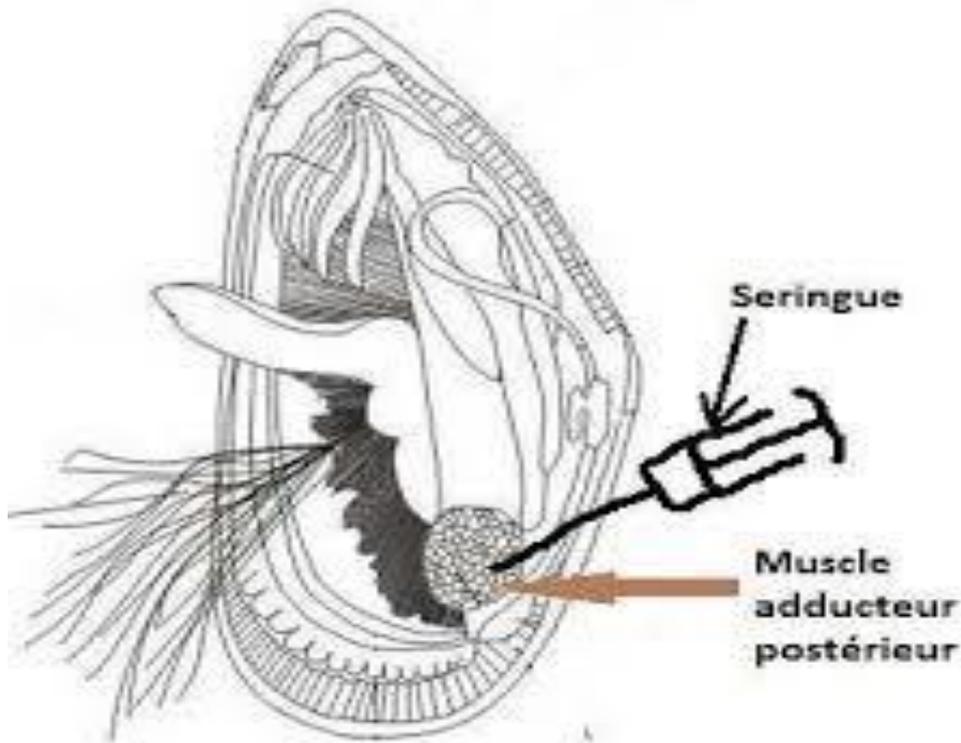
**Figure 16 :** Identification des Streptocoques du groupe sérologique D dans l'eau de mer (test confirmatif).

## II.5. Méthodes de dosages divers

### II.5.1. Prélèvement et analyse de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis*

L'hémolymphe (approximativement 0,1 mL/animal) est prélevée à partir du muscle adducteur postérieur à l'aide d'une seringue stérile de 1 mL avec une aiguille de 30 G×1/2 (0,30×12,7 mm) (Fig. 17; 18a), puis immédiatement homogénéisée avec un volume égal de tampon anti-agrégant MAS (Modified Alsevier Solution : 27 mM Na-citrate, 336 mM NaCl, 115 mM glucose, 9 mM EDTA, pH 7.0) (Gonzalez *et al.*, 2007). Les échantillons d'hémolymphe ont été conservés dans la glace pour réduire l'agglutination des hémocytes, puis immédiatement centrifugés à 800xg pendant 15 min à 4°C (Sigma labozentrifugen

GmbH, Germany) (Tasiemski *et al.*, 2007; Mitta *et al.*, 1999). Le plasma (hémolymphe acellulaire) a été conservé à -20°C jusqu'à l'utilisation.



**Figure 17:** Schéma montrant le positionnement de la seringue au niveau du muscle adducteur postérieur (Bachelot, 2010).

#### II.5.1.1. Extractions de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis*

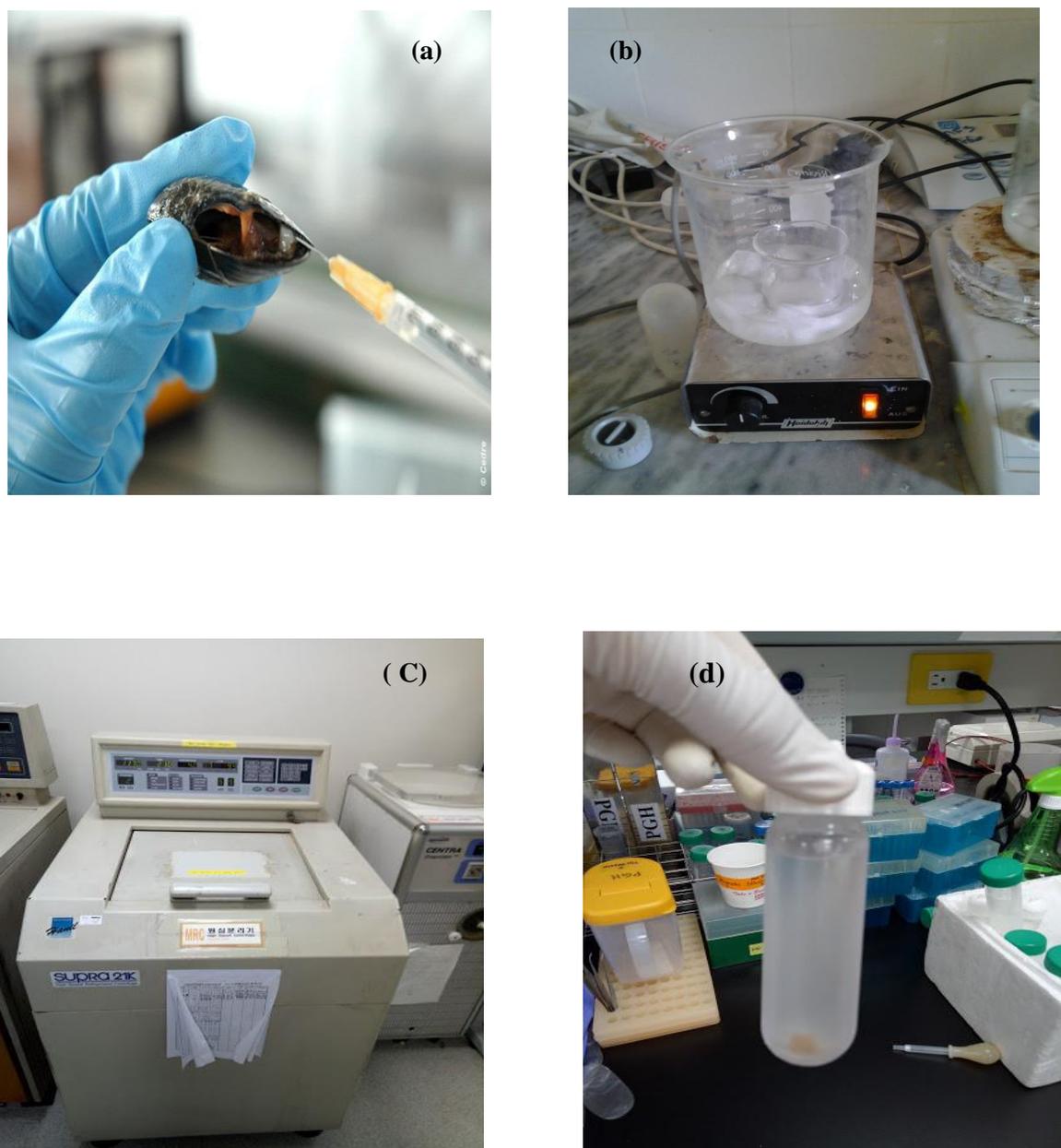
Le plasma est dilué (1:1 v/v) dans l'eau ultra pure (stérilisée par ultrafiltration MilliQ) contenant 0.1% d'acide trichloracétique. Le pH est amené à 3,9 par HCl 1 M (Bulet *et al.*, 1991), sous agitation dans un bain-marie glacé pendant 30 min (Fig. 18b). Après centrifugation à 10000×g pendant 20 min à 4°C (Sigma labozentrifugen GmbH, Germany) (Fig. 18c), le surnageant est recueilli et maintenu à 4°C jusqu'à utilisation (Mitta *et al.*, 1999) (Fig. 18d).

### **II.5.1.2. Pré-purification de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF): Chromatographie en phase inversée manuelle (SPEC18)**

L'absorption liquide/solide ou la chromatographie en phase solide est une alternative à l'extraction liquide/liquide. Analogue à la chromatographie d'élution, la technique d'extraction en phase solide (SPE) repose sur l'utilisation de supports d'extraction permettant la concentration ainsi que la purification de traces de molécules dans des matrices aqueuses. La phase stationnaire est à base de silice greffée C18. De nature apolaire, il retient les molécules par interactions de type Van Der Waals. La phase mobile est polaire. La séparation s'effectue ainsi par rupture des interactions hydrophobes entre les molécules à séparer et la phase stationnaire. Ainsi, plus un composé est apolaire, plus il sera retenu au niveau de la phase solide stationnaire et vice versa.

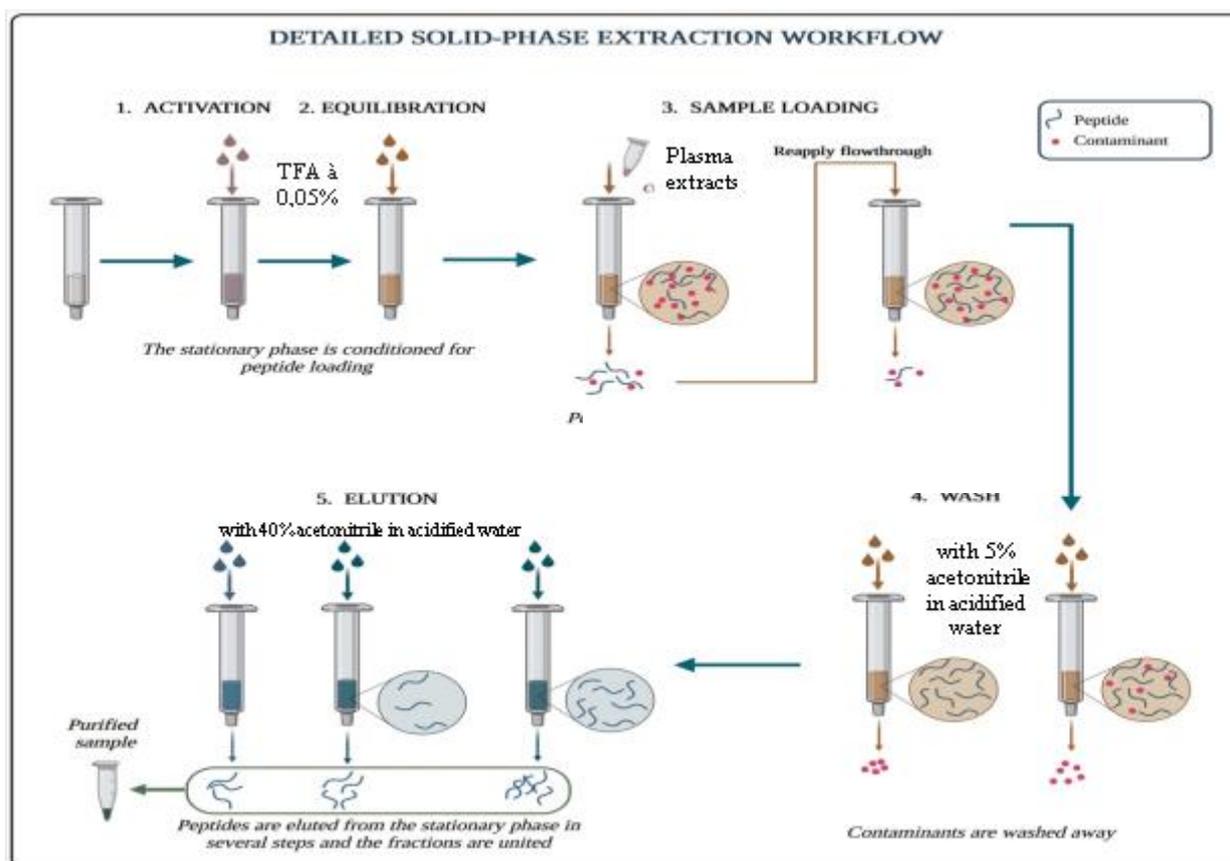
La phase mobile est constituée d'un mélange eau-acétonitrile en proportions variables. Une augmentation de la concentration en acétonitrile (ACN) entraîne une diminution de la polarité de la phase mobile. La phase mobile est complétée par 0.1% d'acide trifluoroacétique (TFA), afin d'éviter les interactions ioniques entre la phase stationnaire et les molécules en neutralisant les charges de ces dernières. Ainsi la présence de TFA dans le solvant permet d'augmenter l'hydrophobicité des molécules.

Le surnageant de la moule *Mytilus galloprovincialis* obtenu après la centrifugation de l'hémolymphe (Fig. 18d) a été chargé sur des cartouches Sep Pak C18 (Waters Associates, Switzerland) préalablement lavées et équilibrées avec l'eau acidifiée avec du TFA à 0,05% dans l'eau ultra pure. Ensuite, deux éluions successives ont été réalisées avec 5 et 40% d'acétonitrile dans l'eau acidifiée (v/v) (Fig. 19). La fraction éluee à 5% (v/v) a été rejetée, tandis que celle à 40% (v/v) a été lyophilisée et conservé à 4 °C jusqu'à son utilisation (Mitta *et al.*, 1999) (Fig. 20).



**Figure 18:** Extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de la moule (*M. galloprovincialis*), (a): prélèvement de l'hémolymphe, (b): Extraction de la fraction peptidique, (c): centrifugation, (d): le surnageant obtenu.

Les étapes d'extraction et de lyophilisation de la fraction peptidique (HPF) ont été réalisées au laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine de Séoul, Université de Corée, Corée du Sud. Institut de recherche en médecine moléculaire et nutrition, Séoul, Corée du Sud.



**Figure 19:** Diagramme de purification par extraction en phase solide (SPE) des peptides par la méthode de Bugyi *et al.* (2023) (modifiée par Otsmane El Haou, 2024).



**Figure 20 :** La fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* (HPF) en poudre après lyophilisation.

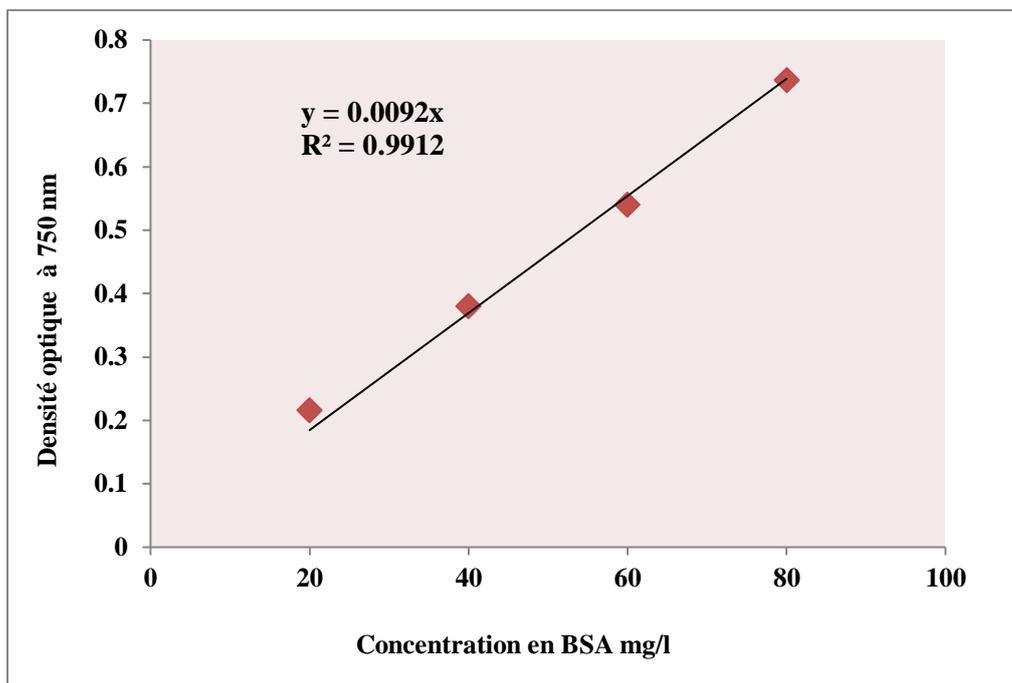
### **II.5.1.3. Dosage des protéines totales de l'hémolymphe et de la fraction éluée à 40% d'acétonitrile**

Le dosage des protéines totales de l'hémolymphe a été effectué selon la méthode de [Lowry et al. \(1951\)](#) qui combine la réaction au biuret et le réactif Folin-Ciocalteu. Le réactif Folin-Ciocalteu réagit avec les groupements tyrosine et tryptophane pour donner une coloration bleue qui s'ajoute à celle de biuret dont l'absorbance maximale est à 750 nm et qui est proportionnelle à la quantité de protéines de l'échantillon. La grande sensibilité de cette méthode (5 à 10 µg) est sa principale qualité.

Dans des tubes, 500 µL d'échantillon ont été mélangés à 700 µL de solution de Lowry (annexe 3) et incubés pendant 20 min à l'obscurité à température ambiante. Ensuite, 100 µL de réactif de Folin Ciocalteu ont été ajoutés et après agitation, le mélange est incubé pendant 30 min à l'obscurité à température ambiante. L'absorbance a été mesurée à 750 nm (JENWAY-7305, Royaume-Uni) ([Brian Jaisson, 2014](#)). La gamme d'étalonnage a été établie à l'aide d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) (fig.21). La concentration des protéines est déterminée par extrapolation.

### **II.5.2. Dosage des métaux lourds de l'eau de mer**

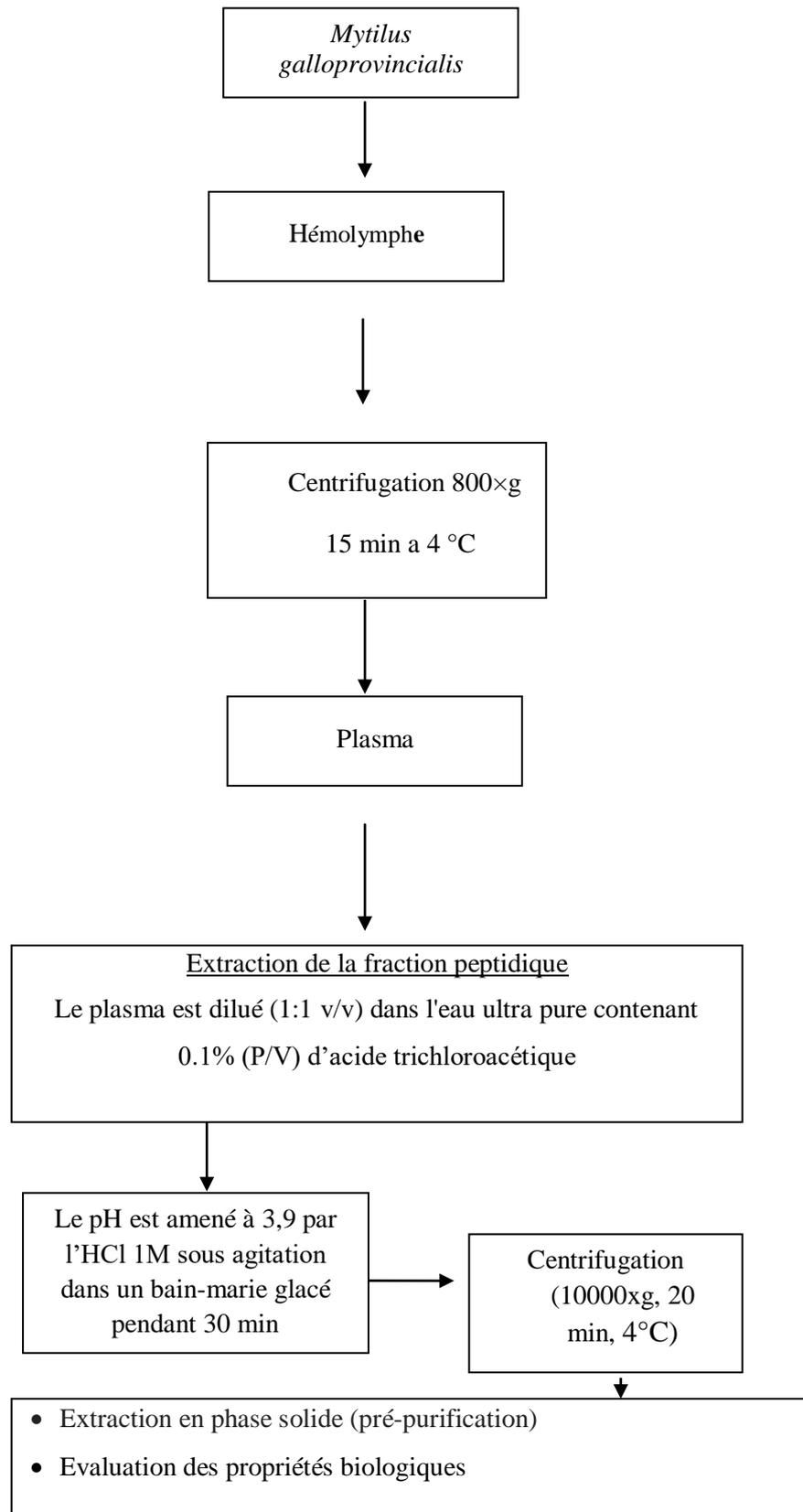
Le dosage des métaux lourds de l'eau de mer du port de Mostaganem est réalisé par la spectrophotométrie d'absorption atomique à flamme (SAA) (thermo fisher scientific, France) (Fig. 22) dans le laboratoire de la filiale « Fertial » de la société Sonatrach à Arzew. Cette méthode est appliquée pour les sédiments et pour le matériel biologique ([Pinta et al, 1979](#)). Une solution contenant l'élément métallique à doser est injectée dans une flamme dans laquelle les éléments tendent à rester à l'état fondamental. Une radiation de longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser provenant d'une lampe à cathode creuse est émise à travers la flamme. En absorbant cette énergie, les atomes passent à l'état excité. La baisse de l'intensité de la radiation due à l'absorption d'énergie est mesurée par un spectrophotomètre, et elle est fonction du nombre d'atomes présents sur le chemin de la radiation à tout moment ([Delval, 1984](#)). L'intensité de l'absorption dépend directement du nombre de particules absorbant la lumière selon la loi de [Beer Lambert \(1852\)](#) selon laquelle l'absorbance est proportionnelle au coefficient d'absorption spécifique  $a$ , au trajet optique  $b$  et à la concentration  $c$  :  $A = abc$ .



**Figure 21:** Courbe d'étalonnage de l'albumine sérique bovine (BSA).



**Figure 22:** Spectrophotomètre d'Absorption Atomique (Benadda, 2016).



**Figure 23:** Diagramme de préparation de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis*.

## **II.6. Evaluation des propriétés biologiques de la fraction peptidique de l'hémolymphe de la moule *Mytilus galloprovincialis***

### **II.6.1. Etude in vitro**

#### **II.6.1.1. Activité antibactérienne de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)**

##### **II.6.1.1.1. Les souches pathogènes utilisées**

Pour notre étude, nous avons testé la sensibilité de 15 souches microbiennes de référence. Il s'agit de 11 souches bactériennes pathogènes (Gram négatives et Gram positive) et deux souches fongiques connues pour être responsables d'infections nosocomiales, et 2 souches bénéfiques. Les souches bactériennes et fongiques proviennent du Laboratoire des microorganismes bénéfiques des aliments fonctionnels et de la santé du département de Biologie (Université de Mostaganem), laboratoire de microbiologie du département des sciences pharmaceutiques et produits de santé de l'université de Messine (Italie), laboratoire vétérinaire de Mostaganem (Tableau 3).

##### **II.6.1.1.2. Milieux de cultures utilisés**

Suivant la méthode employée et selon les souches étudiées, nous avons utilisé les milieux de cultures solides et semi solides et les bouillons suivants (annexe 4):

Pour les bactéries:

- Bouillon Cœur-cerveille (BHIB) : (Réf: Cat.14000, Laboratoire Conda S.A, Spain) pour la réactivation des souches pathogènes avant chaque essai, et utilisé aussi comme un diluant des bactéries pathogènes.
- Mueller-Hinton solide (Réf: Cat.105800, Laboratoire Conda S.A, Spain) utilisé pour la purification et la réactivation des souches pathogènes.
- Mueller-Hinton semi-solide (Réf: Cat.105800, Laboratoire Conda S.A, Spain) utilisé pour tester la sensibilité des germes.
- MRS solide et liquide (MRS (Réf: Thermo Scientific <sup>TM</sup> CM0361B, France) utilisé pour la réactivation des bactéries lactiques.

Pour les moisissures :

- Potatoes Dextrose Agar (PDA): (Réf: Thermo Scientific™ R454314, France) Pour la réactivation des champignons.
- Sabouraud liquide et solide : (Réf: Thermo Scientific™ CM0041B, France) Pour l'réactivation des levures et pour l'activité antifongique.

#### **II.6.1.1.3. Mise en culture des souches**

Une préculture des souches microbiennes est préparée afin d'obtenir une phase exponentielle de croissance. La turbidité est ajustée avec un spectrophotomètre à 600 nm (JENWAY-7305, Royaume-Uni), ce qui correspond à  $10^8$  UFC/mL pour les bactéries,  $10^6$  UFC/mL pour les levures (Haddouchi *et al.*, 2009), et  $10^6$  UFC/ml pour les champignons (Braga *et al.*, 2007).

#### **II.6.1.1.4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne**

L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion en puits. Cette méthode est reconnue comme fiable et reproductible; elle est surtout utilisée en étape préliminaire à des investigations plus approfondies, car elle permet d'accéder à des résultats essentiellement qualitatifs. Les souches bactériennes et les souches fongiques ont été cultivées sur milieu Muller Hinton semi solide et sur milieu Sabouraud, respectivement. Des portions de 100  $\mu$ L d'HPF (3 mg/mL) ont été pipetées dans chaque puits (6 mm de diamètre), l'eau stérile a été utilisée comme témoin négatif. Les boîtes de Pétri sont incubées à +4°C pendant 2 à 4h pour permettre la bonne diffusion de la substance antibactérienne (prédiffusion) (Doumandji *et al.*, 2010), et ensuite à 37°C pendant 18-24h pour les souches bactériennes, à 30°C pendant 24-48h pour les souches de levures et 7 jours pour les souches fongiques. La zone d'inhibition a été mesurée en mm. L'expérience a été répétée 3 fois pour chaque souche microbienne.

**Tableau 3 :** Origine, milieux de culture et température de croissance des souches pathogènes et bénéfiques utilisées.

Souches	Milieu de culture et température de croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	BHI (Réf. Cat14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	BHI (Réf. Cat14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	BHI (Réf. Cat.14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10541	BHI (Réf. Cat1.4000, Laboratoire Conda S.A, Spain) 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	BHI (Réf. Cat.14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Shigella dysenteriae</i> CECT 457	BHI (Réf. Cat.14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 13315	BHI (Réf. Cat.14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Serratia marcescens</i> DSM 30121	BHI (Réf. Cat.14000, Laboratoire Conda S.A, Spain) 37°C
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	BHI (Réf. Cat.14000, LaboratoireConda S.A, Spain) 37°C
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9884	BHI (Réf. Cat.14000, Laboratoire Conda S.A, Spain) 37°C
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10420	BHI (Réf. Cat.14000, Laboratoire Conda S.A, Spain) 37°C
<i>Bb V2 (Bifidobacterium sp)</i>	MRS (Réf. Thermo Scientific™ CM0361B, France) 37°C
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 748	MRS (Réf. Thermo Scientific™ CM0361B, France) 37°C
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Sabouraud (Réf. Thermo Scientific™ CM0041B, France) 30°C
<i>Aspergillus fumigates</i> ATCC 106404	Potatoes Dextrose Agar (PDA) (Réf. Thermo Scientific™ R454314, France) 30°C

ATCC : American type culture collection ;

CECT : Colección Española de Cultivos Tipos;

DMSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

### II.6.1.2. Détermination du pouvoir antioxydant

L'activité antioxydante des molécules peut être évaluée soit de façon *in vivo*, sur des organismes vivants, soit de manière *in vitro*, en utilisant des tests qui miment le phénomène physiologique. Pour évaluer l'activité antioxydante *in vitro* d'extraits naturels, différentes méthodes ont été développées (Tableau 4). Ces méthodes impliquent le mélange d'espèces oxydantes, tels que les radicaux libres ou les complexes métalliques oxydés, avec un échantillon qui contient des antioxydants capables d'inhiber la génération de radicaux. Ces antioxydants peuvent agir selon deux mécanismes majeurs : soit par transfert d'atome d'hydrogène, soit par transfert d'électron (Prior *et al.*, 2005).

**Tableau 4 :** Méthodes de détermination de l'activité antioxydante *in vitro* (Huang *et al.*, 2005 ; Karadag *et al.*, 2009)

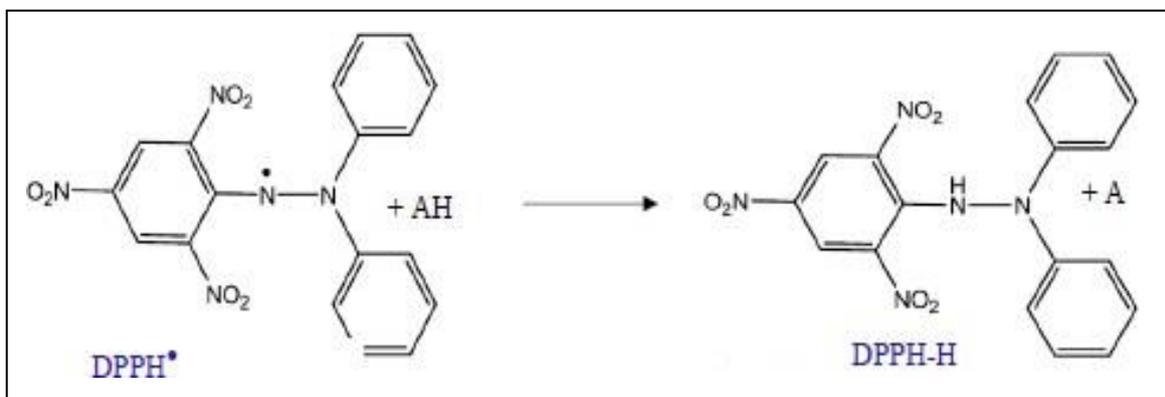
Classe de methods	Equation du mécanisme spécifique	Exemples
<b>Transfert d'atome d'hydrogène</b>	$AH + X\bullet \rightarrow XH + A\bullet$ <p>AH : antioxydant (donneur d'atome d'hydrogène) X• : radical libre (accepteur d'atome d'hydrogène) XH : radical libre inhibé A• : antioxydant stable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacité d'absorption desradicaux libres (test ORAC);</li> <li>- Capacité de piégeage desradicaux libres (test TRAP) ;</li> <li>- Inhibition de l'oxydation del'acidelinoléique</li> </ul>
<b>Transfert d'électron</b>	$M(III) + AH \rightarrow AH\bullet + M(II)$ <p>M (III) : antioxydant (donneur d'un électron) AH : radical libre (accepteur d'un électron) AH• : radical libre inhibé M (II): antioxydant stable</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pouvoir réducteur de l'ion ferrique (test FRAP) ;</li> <li>- Analyse des phénolstotaux (test auFolin-Ciocalteu)</li> </ul>
<b>Analyses basées sur les deux mécanismes</b>	<p>Les réactions semblent plus complexes et suivent un des deux mécanismes selon la structure des antioxydants ou la nature du milieu réactionnel</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Piégeage du radicalDPPH•</li> <li>- Réduction du radical-cation ABTS<sup>•+</sup> ou détermination de la capacité antioxydante en équivalents trolox(TEAC)</li> </ul>

Les méthodes basées sur le transfert d'atome d'hydrogène mesurent la capacité globale d'un antioxydant à réprimer les radicaux libres par donation d'un atome d'hydrogène, alors que les méthodes basées sur le transfert d'électrons mesurent la capacité d'un antioxydant à

transférer un électron qui réduira n'importe quel composé, incluant les métaux, les carbonyles et les radicaux. Selon la complexité des processus d'oxydation, il n'existe pas de méthode unique qui permettrait de refléter le profil antioxydant d'un échantillon. Il faut donc combiner les réponses obtenues à l'aide de tests différents et complémentaires. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur l'utilisation de 3 tests chimiques, à savoir : le piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•), le pouvoir réducteur de l'ion ferrique (FRAP), et le piégeage du peroxyde d'hydrogène. Le principe de ceux-ci repose sur un changement de couleur qui a été suivi par la lecture de l'absorbance à des longueurs d'ondes spécifiques.

### II.6.1.2.1. Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH•)

Le composé chimique (DPPH•) est un radical organique stable de couleur violette, qui absorbe à 517 nm. Sa stabilité est due au fait qu'il possède un électron non apparié sur un atome du pont d'azote. En présence d'agents antioxydants donneurs d'hydrogène (AH), le composé est réduit en une forme non radicalaire DPPH-H (2,2-diphényl-1-picrylhydrazine) et vire au jaune, ce qui entraîne une diminution de son absorbance (Brand-Williams *et al.*, 1995; Maataoui *et al.*, 2006). La réaction peut être représentée par l'équation suivante (Fig. 24).



**Figure 24:** Mécanisme de réduction du radical libre DPPH par un antioxydant (Molyneux, 2004).

L'activité de piégeage des radicaux libres DPPH de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) a été déterminée en utilisant la méthode originale de Blois (1958). Dans des tubes, on introduit 1 mL d'extraits de différentes concentrations d'HPF (3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL) et 0.5 mL de la solution méthanolique de DPPH (0.16 mM dans 95% méthanol).

Ces mélanges sont fortement agités pendant 15 sec et incubés à 27 °C à l'obscurité pendant 30 min. L'absorbance de l'échantillon a été mesurée à 517 nm (JENWAY-7305, Royaume-Uni) par rapport à un contrôle négatif (solution méthanolique) et comparée à un contrôle positif avec les mêmes concentrations d'acide ascorbique dans les mêmes conditions opératoires. Le pourcentage d'activité anti-radicalaire a été calculé à l'aide de la formule suivante (1) (Yamaguchi *et al.*, 1998):

$$\% \text{ d'inhibition des radicaux libres} = [\text{Abs}_{\text{Contrôle}} - \text{Abs}_{\text{Échantillon}}] / \text{Abs}_{\text{Contrôle}} \times 100 \quad (1)$$

- $A_{\text{échantillon}}$  = Absorbance à 517 nm du mélange de 1 mL d'extraits ou d'acide ascorbique a différentes concentrations + 0.5 mL de la solution méthanolique au DPPH (0.16 mM in 95% methanol).
- $A_{\text{contrôle}}$  = Absorbance à 517 nm du 1mL de la solution méthanolique au DPPH (0.16 mM in 95% methanol).

Les résultats ont été exprimés par la moyenne de trois mesures indépendantes  $\pm$  écart-type. L'IC<sub>50</sub>, a été déterminée graphiquement à partir de la relation :

$$\% \text{ d'activité de piégeage du DPPH} = f(\text{concentrations de HPF})$$

#### II.6.1.2.2. Réduction du Fer : FRAP (Ferric Reducing Antioxydant Power)

Cette méthode est basée sur l'aptitude d'un antioxydant donné à réduire le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) présent dans le complexe ferrocyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) en fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ). La réaction est révélée par le virement de la couleur jaune du fer ferrique à la couleur bleu-vert du fer ferreux. L'intensité de cette coloration est mesurée par spectrophotométrie à 700 nm (Karagözler *et al.*, 2008).

Le FRAP a été déterminé selon la méthode décrite par Benzie et Strain (1996). Pour ce faire, 2.5 mL de différentes concentrations d'HPF (3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL) ont été mélangés avec 2.5 mL de tampon phosphate 0.2 M/pH 7.4 et 2.5 mL de ferricyanure de potassium à 1% (p/v) ( $\text{K}_3\text{FeC}_6\text{N}_6$ ). Ce mélange a été incubé 30 min à 50 °C, puis une solution de 2.5 mL d'acide trichloroacétique (TCA) à 10% (p/v), 2.5 mL d'eau distillée et 0.5 mL de  $\text{FeCl}_3$  à 0.1% (p/v) a été ajoutée. L'absorbance a été mesurée à 700 nm (spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible) et comparée aux mêmes concentrations d'acide ascorbique qu'un

contrôle positif dans les mêmes conditions opératoires. Le pourcentage d'inhibition du FRAP a été calculé en utilisant la formule précédente (1).

### **II.6.1.2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)**

La capacité de la fraction peptidique à piéger le radical hydroxyle a été évaluée par la méthode au désoxyribose de Chung et al. (1997). Des solutions de différentes concentration d'HPF (3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL) ont été préparées. 1 mL de chacune de ces solutions d'HPF a été mélangé avec 0,8 mL de FeSO<sub>4</sub> (10 mM-7 H<sub>2</sub>O), 1 mL d'EDTA (10 mM) et 2 mL de tampon phosphate (0.2 M, pH 7.4). Ensuite, 0.2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) a été ajouté au mélange réactionnel et incubé à 37 °C pendant 4h. Après incubation, 1 mL de TCA à 2.5% (P/V) a été ajouté, et le tout agité au vortex (R800003684, Stuart, RPC) avant d'être chauffé au bain-marie à 100°C pendant 15 min (D3165, KOTTERMANN, Allemagne). Après refroidissement, l'absorbance a été mesurée à 532 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV (spectrophotomètre JENWAY 7305 UV-Visible). L'expérience a été réalisée en triple. Le pourcentage d'inhibition du radical hydroxyle a été calculé en utilisant la formule précédente (1).

### **II.6.1.3. Détermination de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe de la moule *Mytilus galloprovincialis***

#### **II.6.1.3.1. Par le test d'inhibition de la dénaturation de l'albumine**

Le modèle de la dénaturation de l'albumine a été choisi pour évaluer la propriété anti-inflammatoire in-vitro de la fraction peptidique. Le principe de cette technique est basé sur la capacité des différents extraits à empêcher la dénaturation thermique de l'albumine humaine sérique. La dénaturation de l'albumine sous l'effet de la chaleur aboutit à un mime de l'expression d'antigènes associés à une hypersensibilité de Type III, réaction impliquée dans des maladies telles que les maladies sériques, la glomérulonéphrite etc (Adarsh verma et al., 2011).

Le test d'inhibition de la dénaturation d'albumine in vitro est réalisé selon la méthode de Mizushima et Kobayashi (1968). Le mélange réactionnel est constitué de l'échantillon d'HPF à différente concentration et une solution de l'albumine bovine à 5% (P/V) dans un

rapport égal à 1, le pH du mélange réactionnel est ajusté à 6.3 avec de l'HCl 1N. Les échantillons sont incubés à 37°C pendant 20 min et ensuite chauffé à 51°C pendant 20 min. Après refroidissement, la turbidité a été mesurée par spectrophotométrie à 660 nm (JENWAY-7305, Royaume-Uni). L'expérience est réalisée en triplet. Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé selon la formule (2) suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = [(ABS_c - ABS_e) / ABS_c] \times 100 \quad (2)$$

ABS<sub>c</sub> est l'absorbance contrôle;

ABS<sub>e</sub> est l'absorbance en présence d'échantillon ou du standard (diclofénac) à différentes concentrations 3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL).

#### **II.6.1.3.2. Par le test de stabilisation des globules rouges vis-à-vis de l'hémolyse (HRBC)**

L'effet d'HPF sur l'hémolyse de HRBC a été évalué en utilisant la méthode de [Yoganandam et al. \(2010\)](#). Le sang a été prélevé sur des humains volontaires sains n'ayant reçu aucun médicament anti-inflammatoire et mélangé à un volume égal de solution d'Alsever stérilisée (2% de dextrose, 0.8% de citrate de sodium, 0.05% d'acide citrique et 0.42% de chlorure de sodium dans l'eau). Le mélange a été centrifugé à 3000 trs/min pendant 10 min et les cellules ont été directement utilisées.

Le principe en jeu est la stabilisation de la lyse membranaire HRBC induite par l'hypotonie. Le mélange de dosage de l'hémoglobine contenant 0.5 mL de la fraction peptidique HPF ou du standard, le dichlofénac à différentes concentrations 3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL), 1 mL de tampon phosphate (0.15 M, pH 7.4), 2 mL d'hyposaline (0.36% : P/V), 0.5 mL de HRBC, a été incubé à 37 °C pendant 30 min et centrifugés pendant 20 min à 3000 trs/min. La teneur en hémoglobine de la suspension a été estimée à l'aide d'un spectrophotomètre à 560 nm (JENWAY-7305, Royaume-Uni). L'expérience a été réalisée en triple. Le pourcentage d'hémolyse produit en présence d'eau distillée a été pris à 100%. Selon [Sakat et al. \(2010\)](#) le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse a été calculé selon la formule (2) suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = [(ABS_c - ABS_e) / ABS_c] \times 100 \quad (2)$$

ABS<sub>c</sub> est l'absorbance du contrôle ;

ABS<sub>e</sub> est l'absorbance en présence d'échantillon ou du standard (diclofénac) à différentes concentrations 3, 1.5, 0.75 et 0.37 mg/mL.

#### **II.6.1.4. Evaluation de la cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* par la méthode MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)**

##### **II.6.1.4.1. Cellules ciblées**

Sept types de cellules ont été utilisées dans le test de cytotoxicité. Il s'agit de deux cellules normales: Human epidermal keratinocyte (HaCaT) et Mouse macrophage cell line (preosteoclast: RAW264.7), et de cinq cellules cancéreuses : Human stomach adenocarcinoma (AGS), Human lung carcinoma (A549), Human liver hepatoblastoma (HepG2), Human fibrosarcoma (HT1080) et HPV-16 E7-expressing mouse lung epithelial cell (- MHC class I : TC-1 P3). Les cellules nous ont été aimablement fournies par le laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire, Faculté de médecine de Séoul, Université de Corée, Corée du Sud et cette manipulation a été faite à l'institut de recherche en médecine moléculaire et nutrition, Séoul, Corée du Sud.

Les cellules ont été cultivées en monocouche dans des flasques de culture cellulaire. Les milieux de culture étaient renouvelés une première fois le lendemain de ces mises en culture, et ensuite toutes les 48h. Les flasques de culture étaient maintenus dans un incubateur humide à 37°C sous atmosphère à 5% de CO<sub>2</sub> jusqu'à confluence des cellules (quand les cellules occupent plus de 80% de la surface du flasque). Le milieu de culture était alors éliminé et une solution de trypsine (0.05% P/V) était introduite dans les flasques de culture pour les rincer (deux fois) et permettre de détacher les cellules de leur support.

##### **II.6.1.4.2. Le test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)**

Le test MTT a été utilisé pour déterminer la cytotoxicité in vitro de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) envers les cellules citées ci-dessus. La culture de chaque

cellule ( $5.10^4$  cellules/100 $\mu$ L/) a été placée dans un puits d'une plaque de 96 puits et incubée pendant 4h. Ensuite, les cellules ont été traitées avec 100  $\mu$ L de milieu RPMI (milieu du Roswell Park Memorial Institute) contenant trois concentrations différentes d'HPF (10, 100 et 1000  $\mu$ M) et incubées de nouveau pendant 72h. Après quoi, 25  $\mu$ L de solution de MTT (5 mg/mL) ont été ajoutés à chaque puits et la plaque a été réincubée pendant 4h. Enfin, le milieu a été retiré et 100  $\mu$ L de DMSO ont été ajoutés pour dissoudre le cristal de formazan. Le taux de survie cellulaire a été calculé en mesurant l'absorbance à 492 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à microplaque (Meerloo *et al.*, 2011) (Fig. 27). La viabilité cellulaire relative en pourcentage a été calculée selon la formule (3) suivante (Zheng *et al.*, 2023) :

$$\text{Viabilité cellulaire en \%} = (\text{Abs}_s \text{ d'échantillon traité} / \text{Abs}_c \text{ d'échantillon non traité}) \times 100 \quad (3)$$

ABSc : absorbance du contrôle (milieu de culture sans HPF)

ABS<sub>s</sub>: absorbance de l'échantillon (milieu de culture contenant différentes concentrations d'HPF).



**Figure 25 :** Spectrophotomètre à microplaque utilisé pour l'évaluation de la cytotoxicité de l'HPF de *Mytilus galloprovincialis*.

## II.6.2. Etude in vivo de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* chez le rat Wistar

L'activité anti-inflammatoire a été évaluée en mesurant l'œdème des rats induit par l'injection de 0.1 mL de carragénine à 1% (P/V) sous l'aponévrose plantaire de la patte postérieure gauche du rat (Khabbal *et al.*, 2006), le dosage de la protéine C réactive (CRPr), le dosage de fibrinogène et l'examen histologique des pattes enflammées.

### II.6.2.1. Conditions d'élevage et mise en lots des rats

Des rats Wistar mâles adultes pesant entre 100 et 150 g (n = 20) provenant de l'Institut Pasteur d'Alger (Fig. 26) ont été utilisés pour le test anti-inflammatoire in vivo. Des lots ou groupes de 5 rats par cage ont été constitués et placés dans une pièce convenablement aérée, à température contrôlée ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) sous un cycle d'alternance lumière/obscurité de 12h. Les cages sont en plastique, transparentes et de dimensions normalisées : d'une longueur de 55 cm, d'une largeur de 33 cm et d'une hauteur de 19 cm. Tous les rats ont été nourris à libitum avec un régime standard sous forme de granulés bâtonnets, et un accès libre à l'eau potable. Les rats ont été acclimatés à l'environnement du laboratoire pendant une durée de deux semaines avant l'expérimentation. Ils ont été privés de nourriture une nuit avant le début de l'expérimentation.



**Figure 26:** Rats Wistar adultes mâles utilisés dans l'expérience.

### II.6.2.2. Induction de l'inflammation

L'induction de l'inflammation chez les rats a été effectuée selon la méthode décrite par Solanki et al. (2015) et Rateesh et al. (2009). L'épaisseur de la patte (mm) a été mesurée à l'aide d'un pied à coulisse digital (Caliper Mitutoyo) avant injection ( $V_0$ ) et toutes les 60 min pendant 6h après induction de l'inflammation (Vasudevan et al., 2006).

Les différents lots ou groupes :

- Groupe 1 : témoin négatif, les rats reçoivent une injection intra-péritonéale de 100  $\mu$ L d'une solution saline (NaCL 0.9% : P/V), et 1h après une injection sous cutanée de 100  $\mu$ L de carragénine 1% (P/V) dans l'eau physiologique au niveau de l'aponévrose plantaire de la patte droite de l'extrémité vers l'articulation sans dépasser celle-ci.
- Groupe 2 : témoin positif (standard), les rats reçoivent une injection intra-péritonéale de 100  $\mu$ L de diclofénac 20 mg/kg comme un médicament de référence, et 1h après une injection sous plantaire de la patte droite de 100  $\mu$ L de carragénine à 1% dans l'eau physiologique.
- Groupes 3 et 4 : rats traités par la fraction peptidique de l'hémolymphe (lots d'essai ou expérimentaux). Ils reçoivent respectivement une injection intra-péritonéale de 100  $\mu$ L des doses de 30 et 60 mg d'HPF/kg de poids vif, et 1h après, une injection sous plantaire de la patte droite de 100  $\mu$ L de carragénine à 1% dans l'eau physiologique.

Le pourcentage d'inhibition de l'œdème a été calculé selon la formule (4) suivante (Lanthers et al., 1992) :

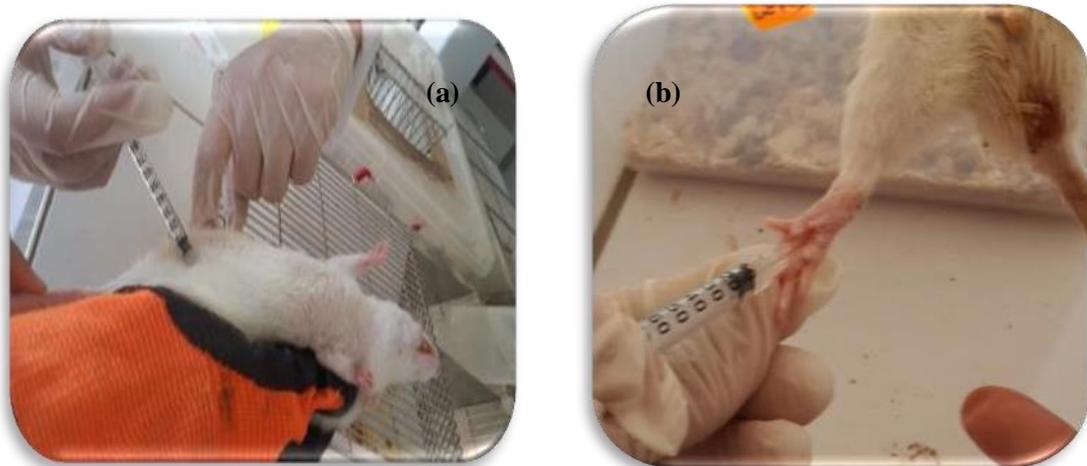
$$\text{Pourcentage d'inhibition} = [(V_t - V_0) \text{ témoin} - (V_t - V_0) \text{ traité}] \times 100 / (V_t - V_0) \text{ témoin} \quad (4)$$

$V_0$ : Volume de la patte avant injection de la carragénine;

$V_t$  : Volume de la patte à un intervalle de temps déterminé après injection de la carragénine.



**Figure 27:** Mesure de l'œdème à l'aide d'un pied à coulisse (Caliper Mitutoyo).



**Figure 28:**(a): Injection intra-péritonéale de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* et du dichlofenac chez les rats Wistar mâles. (b): Injection sub-plantaire de la carragénine 1% dans la patte droite des rats.

### II.6.2.3. Opération de sacrifice des rats et prélèvement sanguin

À la fin de l'expérimentation (après 6h), les rats sont anesthésiés à l'éther dans une cloche en verre. Le sang est prélevé par ponction dans l'aorte jugulaire. L'avantage de cette technique est la possibilité de collecter du sang stérile et la capacité à réaliser une

exsanguination complète (Weiss *et al.*, 2000; Elkadi *et al.*, 2014). Le sang obtenu est transféré avant 48h au laboratoire central CHU Mostaganem, pour analyser les paramètres inflammatoires (CRP et fibrinogène).

#### **II.6.2.3.1. Dosage de la protéine C réactive (CRPr)**

La protéine C-réactive est une protéine de la phase aigue qui apparait dans le sang lors des processus inflammatoires. Les modifications du taux de protéines de la réponse inflammatoire peuvent être dosées en immuno-néphélométrie et l'évaluation dans le temps des taux sériques peut avoir une grande valeur indicative. La CRP est une protéine à variation élevée jusqu'à 1000 fois la norme, ayant une demie-vie courte (un jour) et dont le délai de réponse est court (6 à 12h). Le dosage de la CRP a été réalisé selon la technique immuno-turbidimétrique (Marrack et Richards, 1971; Ritchie, 1967).

Pour le dosage de la protéine C réactive, le sang est centrifugé à 2500 trs/min à une température de 4°C pendant 15 min. 60 µL de sérum sont additionnés de 1 mL de tampon R1 (phosphate NaCL pH 7.43, Polyéthylène glycol 40 g/L et Azide de sodium 0.95 g/L) et l'absorbance est lue à 340 nm contre un blanc contenant du NaCL 0.9% (P/V) + 1 mL de tampon. Les absorbances sont lues avant et après addition dans les tubes de 100 µL d'antisérum anti-CRP R2 (phosphate pH 7.43, anti CRP humain polyclonal, azide de sodium 0,95 g/L). La différence d'absorbance est évaluée en utilisant la courbe d'étalonnage réalisée avec cinq concentrations de CRP selon un kit de calibration prêt à l'emploi. Les réactifs R1 et R2 sont fournis par BIOLABO dans le kit. (Biolabo, Maizy-France).

#### **II.6.2.3.2. Dosage du fibrinogène**

Le fibrinogène est une glycoprotéine de haut poids moléculaire, synthétisée par le foie et représente la protéine de la phase finale de la cascade de la coagulation. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine. C'est la protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Une augmentation du taux sanguin de fibrinogène reflète un état inflammatoire (Fuller, 1982).

Le sang est collecté dans des tubes citratés, centrifugés rapidement à 4000 trs/min pendant 15 min (Biomnis, 2012). Le dosage est basé sur l'évaluation chromométrique du fibrinogène selon la méthode de Clauss (1957). En présence d'un excès de thrombine, le

temps de coagulation du plasma préalablement dilué est proportionnel à la quantité de fibrinogène plasmatique (Koenig, 2003). Le test doit être effectué dans un délai n'excédant pas 4h après le prélèvement. Pour cela, nous utilisons un kit dont le protocole est fixé par le fabricant (Biolabo, Maizy-France). 200 µL de plasma de rat ou témoin dilué au 1/10 avec la solution tampon (HEPES (4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) 0.02 M pH 3.75, anticoagulant (citrate), inhibiteur de fibrinogène) sont introduits dans un tube d'hémolyse incubé à 37°C. Cette dilution permet habituellement d'obtenir un temps de coagulation compris entre 8 et 25 secondes. Le chronomètre est simultanément démarré en ajoutant 200 µL de thrombine (100NIH/ml) préalablement incubée à 37°C et le temps de coagulation est noté dès l'apparition d'un mince filament de fibrine. Un tableau de conversion est utilisé pour déterminer la concentration de fibrinogène correspondant au temps de coagulation obtenu (Biomis, 2012).

#### **II.6.2.3.2. Examen histologique des pattes enflammées**

Les pattes droites de chaque groupe de rats sont prélevées et fixées par immersion dans une solution de formaldéhyde à 10% (V/V) pendant 72h ; ensuite les tissus fixés ont été incorporés dans de la paraffine pour réaliser des coupes de 3 et 5 µm avec un microtome. Ces coupes ont été montées sur des lames de verre et colorées avec de l'hématoxyline et de l'éosine pour une analyse en microscopie optique. L'ensemble de la manipulation a été réalisée au laboratoire central CHU, Mostaganem.

#### **II.7. Traitement statistique des résultats**

Chaque expérience a été indépendamment réalisée en 3 exemplaires et répétée trois fois dans un dispositif en randomisation totale et les résultats obtenus ont été soumis à l'analyse de variance (ANNOVA) en utilisant le logiciel Stat Box, Grimmer Soft, version 6.4, France (1999). La comparaison de moyennes a été réalisée par le test de Student- Newman-Keuls au seuil de 5% pour comparaison multiple.

# Chapitre III :

## Résultats

### et

## Discussion

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III.1. Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer du port de Mostaganem

Dans le but de caractériser la qualité physico-chimique de l'eau de mer du port de Mostaganem, un suivi mensuel des paramètres physico-chimiques a été réalisé sur la période mars 2016 - avril 2017. La détermination de la variation mensuelle de quatre paramètres a été mesurée in situ, notamment la température (°C), le pH, la salinité (‰) et la concentration de l'oxygène dissous (mg/l).

Les données obtenues montrent que l'eau de mer du port de Mostaganem présente des valeurs moyennes de  $8.23 \pm 0.32$  pour le pH et  $37.02 \pm 0.02\text{‰}$  pour la salinité. Les valeurs moyennes de température suivent un cycle saisonnier avec  $15.9^{\circ}\text{C}$  en hiver,  $16.8^{\circ}\text{C}$  au printemps,  $21.4^{\circ}\text{C}$  en automne et  $23.2^{\circ}\text{C}$  en été. L'oxygène dissous est relativement stable durant toutes les saisons à  $7.27 \pm 0.15$  mg/L à l'exception de la période automnale qui enregistre une importante baisse avec  $4.59 \pm 0.31$  mg/L. Les données recueillies sont reportées dans le tableau 5.

Selon [Rouane Hacene \(2013\)](#) la diminution de la concentration en O<sub>2</sub> dissous particulièrement en automne, est en relation avec le métabolisme bactérien, qui utilise cet élément pour dégrader la matière organique abondante au niveau de ce site. Cette forte teneur en matière organique s'explique par la charge polluante.

Les teneurs moyennes des eaux de la méditerranée en oxygène sont comprises entre 7 et 9 g/m<sup>3</sup> ([Copin- Montégut, 1996](#)). Cette oxygénation importante des eaux est due en premier lieu à l'aération et à moindre degré à la présence d'un couvert végétal constitué par des *Caulerpa prolifera*, des *Gracilaria verrucosa*, des *Cystoseira compressa*, des *Cymodocea nodosa*, des *Ruppia cirrhosa* et *Zostera noltii* ([Maerh, 2003](#)).

La salinité de l'eau de mer est voisine de  $35 \pm 2 \text{‰}$  ([Barnabé et Barnabé-Quet, 1997](#)) et pourrait atteindre 38-39‰ dans les eaux de la mer méditerranée selon [Aminot et Kérrouel \(2004\)](#). Le choix du site de prélèvement des échantillons de *Mytilus galloprovincialis* repose, d'une part, sur la qualité du site en fonction de l'éloignement et la proximité de sources de pollution et, d'autre part, sur la facilité d'accès et l'abondance de l'espèce *galloprovincialis*, et

afin de pouvoir disposer d'un lot de moules suffisant en provenance du même site pendant toute la durée de ce travail sans risque d'épuiser la ressource.

**Tableau 5:** Paramètres physico-chimiques de l'eau de mer mesurés in situ entre mars 2016 et avril 2017 : pH, température (T en °C), S : la salinité (S en ‰), concentration de l'oxygène dissous (OD en mg/L) comparés aux valeurs normales de la mer méditerranée et le journal officiel Algérien (JORA N°46, 1993). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 4).

Site	T °C	pH	S (‰)	OD (mg/l)
Port de Mostaganem	15.9-23.2	8.23 $\pm$ 0.32	37.02 $\pm$ 0.02	7.27 $\pm$ 0.15
Normes (mer méditerranée)	30	6-8	33-39	7.30

### III.2. Paramètres biométriques et physiologiques de la moule *Mytilus galloprovincialis* du port de Mostaganem

L'indice de condition (IC), qui est très souvent utilisé pour qualifier l'état physiologique des bivalves, est considéré comme l'un des meilleurs indicateurs de l'état général des organismes pour les études environnementales (Hyotylanen *et al.*, 2002).

Les résultats de l'indice de condition des moules étudiées est de l'ordre de  $30.89 \pm 1.80$  (Moyenne de quatre saisons  $\pm$  écart-type). Les moyennes des mesures de paramètres biométriques et physiologiques de la moule *M. galloprovincialis* (Longueur, largeur et épaisseur en mm ; le poids frais du corps mou en g, le poids total sans liquide intervallaire en g et l'indice de condition en nombre pur) sont reportées dans le tableau 6. Dans le présent travail, la plus grande taille des individus récoltés au niveau du port de Mostaganem est de 6 cm (Fig. 29). La valeur de l'IC ( $30.89 \pm 1.80$ ) des moules *Mytilus galloprovincialis* déterminé est de l'ordre de  $30.89 \pm 1.80$  (Fig. 30) ; elle est plus proche des IC déterminés par Rouane-Hacene (2013) dans trois sites différents:

- Site 1: Le port d'Oran (35°42'31.07''N, 0° 38'26.76''W) qui est un grand port mixte

(commerce, pêche et plaisance), est également caractérisé par la présence des deux plus grands émissaires d'eaux usées de la ville, avec un IC de l'ordre de  $33.88 \pm 0.55$ .

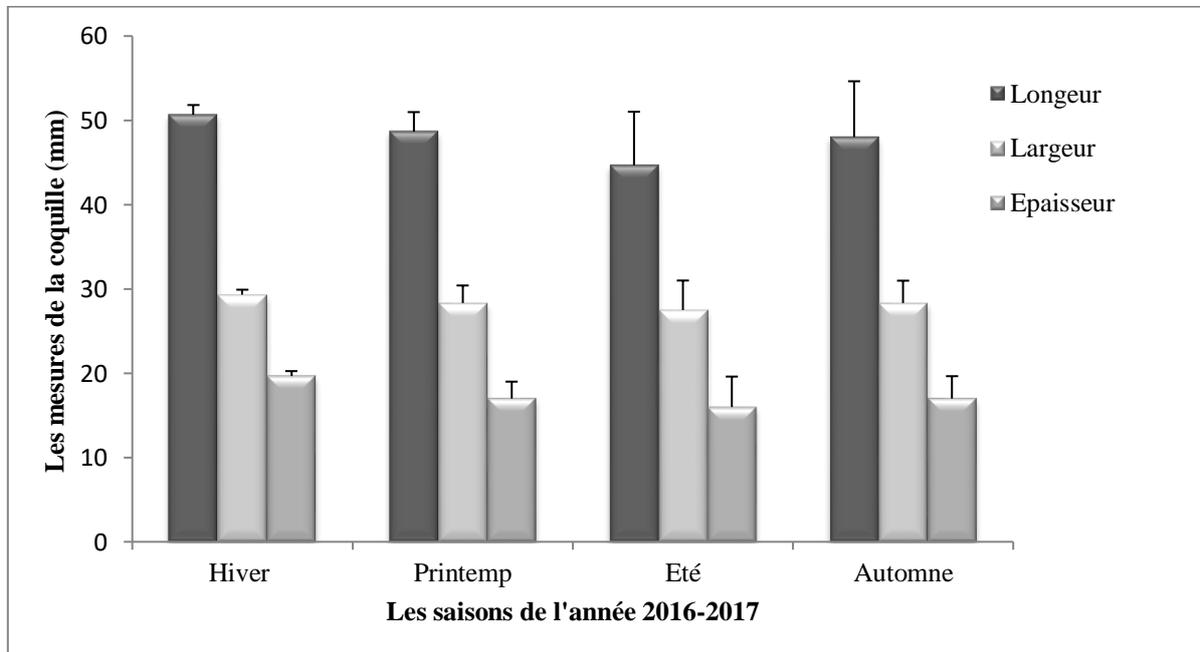
- Site2: Hadjaj ( $36^{\circ}06'09.59''N$ ,  $0^{\circ}19'11.48''E$ ), qui est considéré comme station de référence, est éloigné de toute activité anthropique (industries, activités urbaines) avec un IC de l'ordre de  $31.01 \pm 0.61$ .
- Site 3: Ain Defla ( $S2:35^{\circ}49'03.66''N$ ,  $0^{\circ}28'55.89''W$ ), se situe au voisinage d'un petit port de pêche et reçoit les rejets domestiques du village) avec un IC de l'ordre de  $28.29 \pm 0.48$ .

La différence entre les conditions du milieu est à l'origine de cette variabilité entre les indices de condition. La température, l'oxygène dissous et le statut trophique ont un grand impact sur l'indice de condition (Abada-Boudjema et Mouëza, 1981). Un certain nombre d'auteurs ont observé que différentes espèces de bivalves exposées à la pollution environnementale pouvaient présenter une croissance lente (Stromgren, 1982 ; Salazar et de Salazar, 1991 ; Soto *et al.*, 2000, Peteiro *et al.*, 2003).

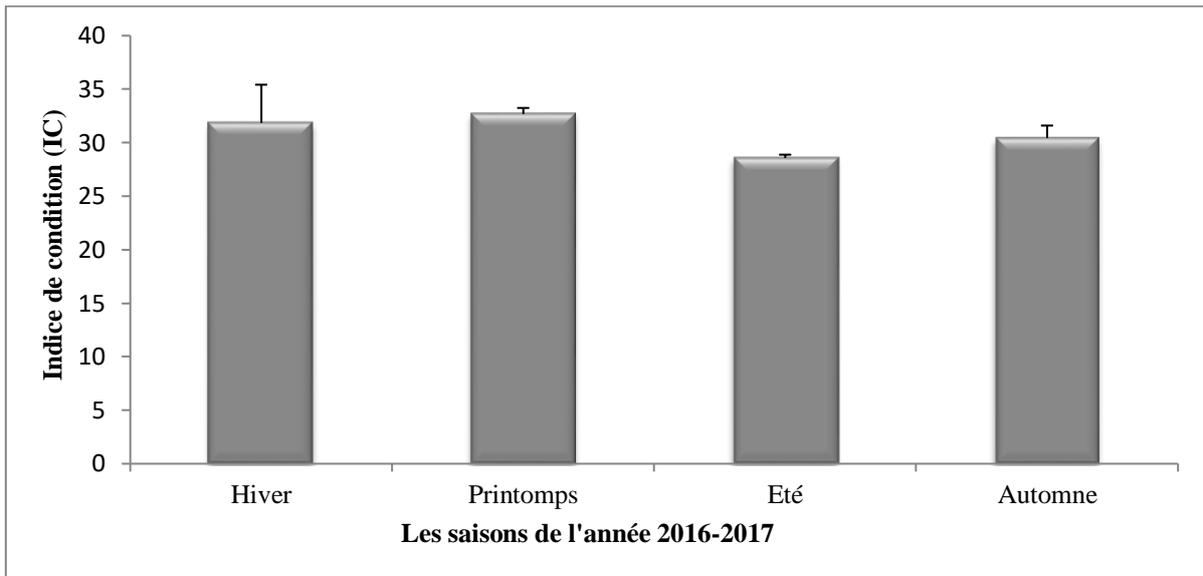
De plus, bien que la variabilité de l'IC soit généralement attribuée à des modifications de la disponibilité alimentaire ou du cycle de la gamétogenèse (Hummel *et al.*, 1996; Amiard *et al.*, 2004; Pampanin *et al.*, 2005), elle peut également être associée à des épisodes de stress chimique entraînant une perte de poids des tissus de l'organisme, liée à une mobilisation des réserves énergétiques pour leur détoxification (Bayne, 1985 ; Dame, 1996 ; Modassir et Ansari, 2000).

**Tableau 6:** Paramètres biométriques et physiologiques de la moule *M. galloprovincialis* (mars 2016-avril 2017) : longueur (mm), largeur (mm), épaisseur (mm), Poids frais du corps mou de la moule (PFCM en g), Poids total sans liquide intervallaire (PTLI en g) et IC: indice de condition. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 60).

Paramètres Saisons	Paramètres biométriques et physiologiques					
	Longueur (mm)	Largeur (mm)	Epaisseur (mm)	poids FCM (g)	poids T (g)	IC
Hiver	50.67 $\pm$ 1.15	29.33 $\pm$ 0.58	19.67 $\pm$ 0.58	2.67 $\pm$ 0,42	9 $\pm$ 0.56	31.85 $\pm$ 3.57
Printemps	48.67 $\pm$ 2.31	28.33 $\pm$ 2.08	17 $\pm$ 2	2.33 $\pm$ 0.15	7.87 $\pm$ 1.36	32.68 $\pm$ 0.57
Eté	44.67 $\pm$ 6.35	27.5 $\pm$ 3.5	16 $\pm$ 3.6	2.13 $\pm$ 1.44	7.67 $\pm$ 5.05	28.57 $\pm$ 0.31
Automne	48.03 $\pm$ 6.61	28.33 $\pm$ 2.65	17 $\pm$ 2.65	2.3 $\pm$ 0.5	7.53 $\pm$ 1.21	30.44 $\pm$ 1.16



**Figure 29:** Variations saisonnières des paramètres biométriques (Longueur, largeur et épaisseur) de la coquille des moules *M. galloprovincialis* provenant du port de Mostaganem. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 60).



**Figure 30:** Variations saisonnières de l'indice de conditions de vie (IC) des moules *M. galloprovincialis* provenant du port de Mostaganem. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n = 60).

### III.3. Résultats d'analyses de l'eau de mer du port de Mostaganem

#### III.3.1. Résultats de dosage des métaux lourds

La contamination des océans et des mers, qui couvrent les deux tiers de notre planète bleue, est un réel problème et notamment le littoral qui est en contact permanent avec de nombreuses activités (transports, effluents urbains, industriels, agriculture...); il est donc particulièrement exposé à la contamination en raison de l'activité humaine génératrice de déchets rejetés dans la mer où sont disséminées une multitude de molécules susceptibles de perturber l'équilibre des moules et stimuler leur système immunitaire pour synthétiser des peptides défensifs.

Tous les polluants métalliques recherchés : aluminium (AL), cuivre (Cu), fer (Fe), manganèse (Mn), zinc (Zn), sont présents dans l'eau de mer du port de Mostaganem à faibles concentrations ne dépassant pas la valeur référence. Ces concentrations (exprimées en ppm) sont respectivement, de  $0.004 \pm 0.02$ ,  $0.009 \pm 0.001$ ,  $0.098 \pm 0.003$ ,  $0.002 \pm 0.0001$  et  $0.007 \pm 0.003$  (Tableau 7). Par contre, [Benadda \(2019\)](#), a enregistré des teneurs respectives de Cu, Zn et Fe de l'ordre de 0.07, 0.05 et 0.21 ppm dans l'eau de mer du site salamandre à Mostaganem.

A l'exception du bore (B) présent une teneur de  $4.704 \pm 0.036$  mg/L. Selon les résultats d'analyse de Zouag et Belhadj (2017) le bore présent avec une valeur de 5mg/L dans l'eau de mer de la région de Tlemcen. Le bore (B) est initialement présent dans l'eau de mer à des concentrations relativement élevées, de l'ordre de 4 à 6 mg/L (OMS, 2009). Le bore est une substance nutritive essentielle pour les humains, les animaux et les plantes. Cependant, il peut devenir toxique à des teneurs légèrement plus élevées (Nielsen, 2014).

Selon Andral et al. (2007), l'IC peut être en lien avec le niveau de bioaccumulation des contaminants organiques et des métaux. Il a été démontré qu'il existe une relation linéaire inversement proportionnelle entre le facteur de concentration des métaux et l'indice de condition.

**Tableau 7:** Teneurs moyennes en métaux lourds de l'eau de mer du port de Mostaganem (site de prélèvement des moules) avec les valeurs limites des paramètres de rejets d'effluents liquides industriels dans l'eau selon le Journal officiel de la république Algérienne N°18, 23 mars 2011). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM (n=3).

Métaux lourds					
Eléments Unités (ppm)	AL	Cu	Fe	Mn	Zn
Longueur d'onde	167.70	324.7	259.9	257.6	213.8
Eau de mer du port de Mostaganem	$0.004 \pm 0.02$	$0.009 \pm 0.001$	$0.098 \pm 0.003$	$0.002 \pm 0.0001$	$0.007 \pm 0.003$
Valeurs limites (Norme)	0.2	2	0.3	0.05	5

### III.3.2. Résultats de l'analyse bactériologique

L'analyse bactériologique permet d'évaluer la qualité d'eau de mer du port de Mostaganem par rapport aux normes fixées par la réglementation Algérienne en vue de déterminer le degré de contamination d'une part et sa relation avec la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* d'autre part. L'analyse bactériologique de l'eau de mer consisterait à rechercher les bactéries indicatrices de pollution (Coliformes, Streptocoques) et les bactéries pathogènes (Salmonelles, vibron cholérique) et de les comparer aux normes dictées par la réglementation Algérienne (Journal officiel de la république Algérienne N° 46, 14 juillet 1993, reprise par le décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993).

L'eau du port de Mostaganem, selon les valeurs enregistrées, peut être considérée comme une eau de qualité bactériologique moyenne avec un taux de coliformes totaux de l'ordre de 240 germes/100 mL comme valeur maximale par rapport à la valeur guide qui est de 500 germes/100 mL. La présence des coliformes fécaux et de l'ordre aussi de 240 germes/100 mL par rapport à la valeur guide qui est de 100 germes/100 mL. Il faut noter l'absence de streptocoques fécaux, de salmonelles et de vibron cholérique (Tableau 8). Si les résultats se situent entre les valeurs guides et impératives, l'eau est dite de qualité moyenne (acceptable), et s'ils dépassent les valeurs impératives, l'eau est considérée comme polluée.

Selon [Benadda \(2019\)](#) le dénombrement des indicateurs de contamination dans l'eau de mer du site Salamandre, indique la présence d'importantes concentrations de coliformes totaux (180 germes/100 mL), de staphylocoques (225 germes/100 mL) et de streptocoques (700 germes/100 mL) ; alors qu'il y a absence de salmonelles et de vibron cholérique.

Le principal danger de pollution bactériologique auquel l'eau de mer est exposée est celui d'une contamination récente par des eaux usées riches en matières fécales ou par un rejet direct d'excréments humains ou animaux. Ainsi, les coliformes fécaux, hôtes habituels de l'intestin des humains et des animaux, sont considérés comme les germes de contamination fécale les plus fiables, et leur présence dans l'eau de mer est l'indication formelle d'une contamination récente.

**Tableau 8:** Profil bactériologique de l'eau de mer du port de Mostaganem (site de prélèvement des moules) comparé aux normes de qualité bactériologique requise des eaux de baignade publiées dans le Journal officiel de la République Algérienne N° 46, 14 juillet 1993, reprise par le décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993).

Microorganismes	Résultat de cette étude	Valeur guide	Valeur Impérative
Coliformes totaux (nombre de UFC/100 mL)	240	500	10000
Coliformes Fécaux (nombre de UFC/100 mL)	240	100	2000
Streptocoques (nombre de UFC/100 mL)	0	100	-
Salmonelles (nombre de UFC/1000 mL)	0	-	0
Vibrien cholérique (nombre de UFC/450 mL)	0	-	0

#### III .4. Résultats de dosage des protéines totales de l'hémolymphe et de la fraction éluee à 40%

La concentration en protéines de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* trouvée est de l'ordre de 1.3 mg/mL. Les substances protéiques contenues dans l'hémolymphe sont des enzymes hydrolytiques et des enzymes lysosomaux de poids moléculaire élevé et qui sédimentent après les étapes d'extraction de la fraction peptidique de l'hémolymphe (deux centrifugations successives à 800×g/15 min et 10000×g/20 min), les protéines de faible poids moléculaire (la fraction peptidique de l'hémolymphe HPF) reste dans le surnageant éluee à 40%. La concentration en protéines de l'HPF dans le surnageant éluee à 40% atteint une valeur de l'ordre de 229 ± 21.84 µg/mL (soit environ 0.23 mg/mL).

Robledo et al. (1995) ont rapporté que la concentration en protéines du sérum des *Mytilus galloprovincialis* cultivées expérimentalement sur une période de 1 an en Galice

(Nord-Ouest de l'Espagne) à deux profondeurs (2 et 5 m), variait de 0.620 à 1.962 mg/mL chez les moules de profondeur de 2 m et de 0.770 à 2.830 mg/mL chez celles de profondeur de 5 m. Ces niveaux de concentration sont supérieurs à ceux enregistrés dans le présent travail chez des moules de profondeur de 2 m.

Santarem et al. (1992) avaient montré que les protéines d'hémolymphe étaient liées à la réponse humorale et cellulaire et variaient selon la saison et l'environnement. Ces résultats laissent penser à une forte dépendance des concentrations en protéines de l'hémolymphe vis-à-vis de la température, la salinité, la disponibilité des aliments et de la pollution.

### **III.5. Résultats d'évaluation des propriétés biologiques de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis***

#### **III.5.1. Etude in vitro**

##### **III.5.1.1. Activité antimicrobienne de la fraction peptidique HPF de *Mytilus galloprovincialis***

L'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'HPF par la méthode des puits sur milieu semi-gélosé, nous a permis d'obtenir les résultats présentés dans le tableau 9. Le test d'activité antimicrobienne a montré que l'HPF de *M. galloprovincialis* inhibait la croissance des souches pathogènes utilisées dans cette expérience. Les diamètres des zones d'inhibition les plus élevés enregistrés par ordre décroissant étaient d'environ  $24.33 \pm 1.15$  mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,  $15.00 \pm 0.00$  mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  $14.33 \pm 1.15$  mm pour *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Enterococcus hirae* ATCC 1059,  $11.33 \pm 1.15$  mm pour *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 et *Shigella dysenteriae* CECT 457, et  $10.00 \pm 0.00$  mm pour *Bacillus cereus* ATCC 10420. Cependant, l'HPF n'a pas réussi à inhiber la croissance de *Micrococcus luteus* ATCC 10420, *Proteus mirabilis* ATCC 13315, *Serratia marcescens* DSM 3012, *Salmonella typhimurium* ATCC 1331, et les deux bactéries bénéfiques, *Bifidobacterium* sp Bb v2 et *Lactobacillus plantarum* qui lui sont restées insensibles. D'autre part, l'extrait HPF s'est révélé très efficace pour inhiber la croissance de la souche de champignon *Candida albicans* ATCC 10231, avec une zone d'inhibition de  $20.00 \pm 0.00$  mm, tout en n'ayant pas réussi à inhiber la croissance des *Aspergillus fumigatus* ATCC 106404. Les résultats obtenus ont démontré que l'HPF de l'hémolymphe des *Mytilus galloprovincialis* possède une propriété antimicrobienne.

Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont un élément clé du système immunitaire inné des invertébrés marins (Pereiro *et al.*, 2021 ; Moreira *et al.*, 2020; Kyoung Kang *et al.*, 2019). La première étude sur les PAMs des bivalves utilisant la génomique inverse, a été menée à la fin des années 1990 (Hubert *et al.*, 1996). De toute évidence, le domaine des PAMs d'invertébrés marins est sous-exploré et offre une opportunité de recherche approfondie sur ces substances. Alors que les micro-organismes pathogènes développent continuellement une résistance aux antibiotiques conventionnels, le développement de nouveaux agents antimicrobiens devient un défi que l'homme doit relever (Hooper *et al.*, 2007).

**Tableau 9:** Diamètres des zones d'inhibition (mm) de souches pathogènes et bénéfiques par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis*.

Souches microbiennes	Diamètre d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24.33 ± 1.15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	15 ± 0.00
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	14.33 ± 1.15
<i>Enterococcus hirae</i> ATCC 10591	14.33 ± 1.15
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644	11.33 ± 1.15
<i>Shigella dysenteriae</i> CECT 457	11.33 ± 1.15
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 13315	-
<i>Serratiamarcescens</i> DSM 30121	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 9884	10 ± 0.00
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10420	1.00 ± 0.00
<i>Bifidobacteriums</i> pBb v2	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	20 ± 0.00
<i>Aspergillus fumigates</i> ATCC 106404	2 ± 0.00

Valeurs rapportées sous forme de moyenne ± écart-type, n=3;  
 (-) indique la non-inhibition de la croissance microbienne;  
 ATCC: American Type Culture Collection;  
 CECT : Colección Española de Cultivos Tipos ;  
 DMSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

L'activité antimicrobienne de certains PAMs d'invertébrés marins a été déjà signalée (Jeyasanta *et al.*, 2020 ; Queensley *et al.*, 2019). Les travaux sur les mollusques *Mytilus edulis* et *Mytilus galloprovincialis* ont conduit à l'isolement de plusieurs PAMs (défensine, mytiline, mytimycine et mytisine) (Chisholm June et Smith, 2009). De plus, Sathyan *et al.* (2014) ont rapporté les activités antimicrobiennes d'extraits bruts de 24 peptides de mollusques différents.

Les PAMs se distinguent par leur charge positive nette et leur distribution amphipathique des résidus d'acides aminés. Ces caractéristiques clés expliquent leur mode d'action avec la membrane des micro-organismes cibles (Marshall et Arenas, 2003). Afin de maintenir leur activité antimicrobienne, les PAMs synthétisés doivent avoir une structure amphipathique et doivent être organisés en zones d'acides aminés hydrophobes et hydrophiles (Arenas *et al.*, 2009), car ils utilisent différents modes pour inhiber les bactéries Gram<sup>+</sup> positives et Gram<sup>-</sup> négatives, ainsi que les champignons (Sathyan *et al.*, 2014).

La première défensine de mollusque a été signalée en 1996 chez la moule méditerranéenne *M. galloprovincialis* après purification à l'aide de plusieurs étapes d'HPLC appliquées à un surnageant de plasma acidifié (Hubert *et al.*, 1996a). La première élution par étapes sur une cartouche C18 avec 40% d'acétonitrile a donné lieu à plusieurs fractions présentant une activité inhibitrice contre *Escherichia coli* et *Micrococcus luteus* (lysodeikticus). Les séparations ultérieures des fractions actives regroupées sur colonnes C8 puis C18 ont abouti à un peptide pur de 4 kDa nommé MGD-1 qui a également montré une activité antibactérienne contre plusieurs espèces *Vibrio*. L'analyse de la structure primaire a révélé 39 acides aminés dont 8 résidus cystéine et un résidu acide aminé modifié indéterminé en position 28 (Hubert *et al.*, 1996a).

La mytiline constitue une autre famille de molécules effectrices chez les moules qui combine 34 acides aminés dont 8 résidus cystéine. Elle existe sous cinq isoformes (A, B, C, D et G1). Les isoformes A et B ont été isolés à partir du plasma de *M. edulis* (Charlet *et al.* 1996), et les isoformes B, C, D et G1 des hémocytes de *M. galloprovincialis* (Mitta *et al.*, 2000d),

La famille de la myticine a été identifiée comme un nouveau peptide avec une séquence partielle de 36 acides aminés comportant 7 résidus cystéine. Elle a été caractérisée à partir des hémocytes (isoformes A de 4.438 kDa et B de 4.562 kDa) et du plasma (isoforme A) de *M. galloprovincialis* (Cheng-hua *et al.*, 2009). Les myticines ont montré une activité

antimicrobienne contre plusieurs bactéries Gram positives (*M. lysodeikticus*, *Bacillus megaterium*, *Enterococcus viridans*), mais pas contre les bactéries Gram négatives marines (*Vibrios*, *Salmonellas*) et non marines (*Brucella suis*) ou encore contre les protozoaires (*Perkinsus marinus*). Seule la myticine B a inhibé la croissance du champignon *Fusarium oxysporum* (Mitta *et al.*, 1999a).

La mytimycine est un nouveau peptide antifongique riche en cystéine isolé du plasma de *M. edulis* avec un poids moléculaire de 6.23 KDa. Douze résidus cystéine sont à l'origine de la formation de six ponts disulfure intramoléculaires. Une recherche dans les bases de données de séquences peptidiques n'a révélé aucune homologie avec des peptides connus (Mitta *et al.* 2000d).

En revanche, la purification de la fraction SPE 40% (Solide Phase Extraction) pré-purifiée à partir de l'hémolymphe de *Crassostrea gigas* a permis d'aboutir à l'identification de peptides antibactériens de différentes masses moléculaires : 4.46, 3.16 et 0.64 KDa (Defer *et al.*, 2009).

L'activité antimicrobienne est la mieux étudiée pour les PAMs. Cette activité résulte principalement de l'interaction des peptides avec la membrane des pathogènes (Diamond *et al.*, 2009). Pour exercer leur activité antimicrobienne, les PAMs agissent directement sur la membrane cytoplasmique des cellules cibles et provoquent un phénomène d'osmose conduisant à la lyse de la cellule. Ils peuvent également agir par inhibition de la synthèse protéique, de la synthèse d'ADN, des activités enzymatiques ou de la perturbation dans la fonction de la paroi.

Les PAMs, qui sont généralement cationiques, interagissent avec la bicouche lipidique de la membrane cytoplasmique qui contient des phospholipides amphiphiles: têtes hydrophiles extérieures et chaînes alkyles hydrophobes à l'intérieur. Notons que la membrane des cellules eucaryotes possède une charge neutre tandis que celle des bactéries Gram négatives et des bactéries Gram positives possède des phospholipides hydroxylés, dû à la présence de lipopolysaccharide pour les Gram négatifs et d'acide lipotéichoïque pour les Gram positives, qui ancrent la paroi cellulaire. La paroi cytoplasmique des cellules fongiques contient également des phospholipides chargés négativement par la présence de phosphatidylinositol ou de (1,3)-b-D-glucanes polymérisés. L'interaction entre les PAMs et la membrane cellulaire est alors assurée par la charge nette externe des phospholipides de la

membrane et la distribution des charges des peptides (Defer, 2009). Par ailleurs, des interactions ligand-récepteur avec les peptides peuvent avoir lieu pour la reconnaissance des PAMs.

Sheringham et al. (2015) ont montré que les extraits acétoniques de deux invertébrés aquatiques *Galatea paradoxa* (*G. paradoxa*) et *Patella rustica* (*P. rustica*) étaient des sources potentielles de peptides antimicrobiens. Bien que l'extrait de *G. paradoxa* possède une activité antibactérienne élevée, la zone d'inhibition la plus élevée contre les bactéries Gram positives et Gram négatives a été observée contre *Escherichia coli* ( $19.7 \pm 0.6$  mm), *Staphylococcus aureus* ( $20.0 \pm 0.0$  mm), *Bacillus subtilis* ( $20.3 \pm 0.6$  mm), *Pseudomonas aeruginosa* ( $20.3 \pm 1.5$  mm), *Salmonella typhimurium* ( $15,3 \pm 0,6$  mm). Les extraits acétoniques de *P. rustica* étaient beaucoup plus efficaces contre les champignons comme *Candida albicans*, avec une zone d'inhibition de  $37.0 \pm 1.0$  mm. Des zones d'inhibition de  $16.7 \pm 1.15$  mm et  $15.0 \pm 1.0$  mm ont été enregistrées respectivement pour *Klebseilla pneumoniae* et *Enterococcus faecalis*.

La fraction obtenue après l'extraction aqueuse de deux mollusques marins, *Pachymelania aurita* (*P. aurita*) et *Tympanotonus fuscatus* Var *Radula* (*T. fuscatus*) collectés dans la région du delta du Niger au Nigéria, ne présentent aucune activité antimicrobienne contre les microorganismes testés, même à la plus haute concentration (100 mg/mL) ; alors que les fractions obtenues après l'extraction acétone-méthanol de *P. aurita* et *T. fuscatus* ont montré une activité antibactérienne à large spectre contre cinq bactéries à la concentration la plus élevée (100 mg/mL) : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 ( $12 \pm 1.4$  mm avec *P. aurita* et  $11.5 \pm 0.7$  mm avec *T. fuscatus*), *Micrococcus luteus* NCIB 196 ( $12 \pm 1.4$  mm avec *P. aurita* et  $12.0 \pm 1.4$  mm avec *T. fuscatus*), *Klebsiella pneumoniae* NCIB 418 ( $11.5 \pm 0.7$  mm avec *P. aurita* et *T. fuscatus*), *Clostridium sporogenes* NCIB 532 ( $11.5 \pm 0.7$  mm avec *P.aurita* et 11 mm avec *T. fuscatus*), *Bacillus stearothermophilus* NCIB 8222 ( $10.55 \pm 0.1$  mm avec *P. aurita* et *T. fuscatus*), *Candida albicans* (12 mm avec les deux mollusques *P. aurita* et *T. fuscaus*). Les extraits alcooliques de *P. aurita* et *T. fuscatus* ne présentent aucune activité antimicrobienne contre *Proteus vulgaris* NCIB 67, *Pseudomonas aeruginosa* NCIB 950, *Bacillus subtilis* NCIB 3610, *Escherichia coli* NCIB 86 et *Serratia marcescens* NCIB 1377 à une concentration de 100 mg/mL d'extrait (Queensley et al., 2019).

Selon Jeyasanta et al. (2020) l'activité antimicrobienne des protéines extraites de *Perna Perna* (moule brune), *Perna Viridi* (moule verte) et de moule perroquet dépend du solvant d'extraction utilisé, étant donné que les extraits méthanolique, éthanolique et acétonique

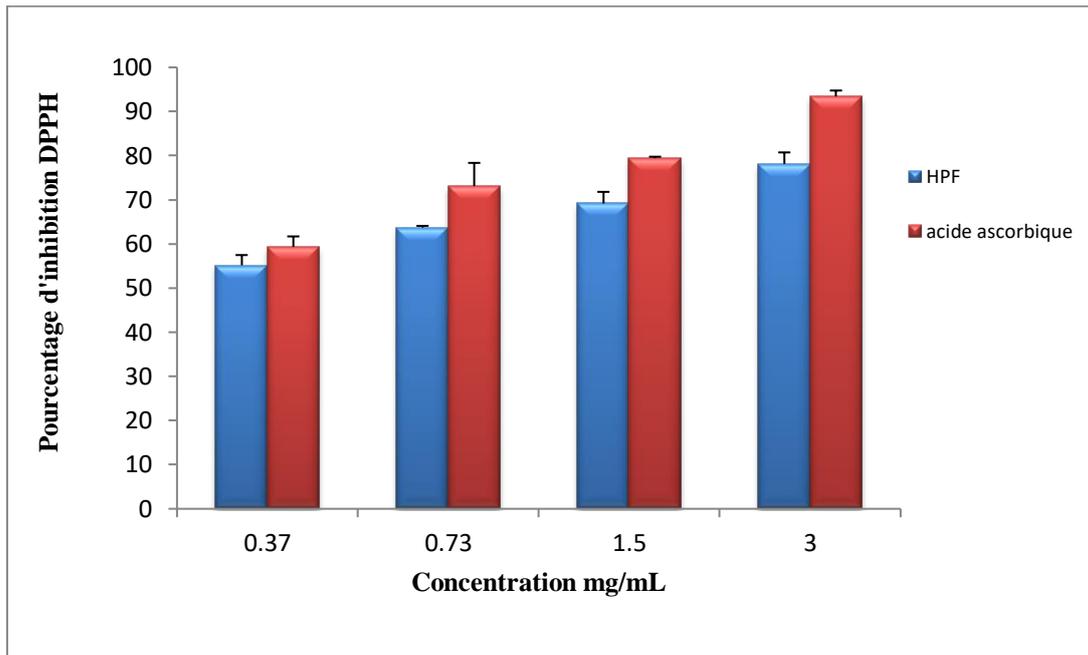
inhibent nettement plusieurs bactéries (diamètres des zones d'inhibition allant de 7 à 20 mm) ; tandis que les extraits d'acétate d'éthyle, d'hexane ou de butanol étaient moins efficaces (diamètres des zones d'inhibition allant de 1 à 7 mm).

### **III.5.1.2. Activité antioxydante de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis***

#### **III.5.1.2.1. Activité de piégeage des radicaux DPPH par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)**

La figure 31 montre une augmentation du pourcentage de réduction du DPPH proportionnelle aux concentrations de l'HPF et du standard, l'acide ascorbique. Selon ces résultats, l'activité de piégeage est dose-dépendante. En effet, le piégeage de ce radical atteint la valeur maximale de  $78.17 \pm 2.59\%$  avec une concentration de 3 mg HPF/mL d'extrait ; tandis que celle de la même concentration d'acide ascorbique est d'environ  $93.43 \pm 1.32\%$ . Cette activité de piégeage du radical DPPH par l'extrait HPF représente près de 84% celle de l'acide ascorbique. Le pourcentage de DPPH piégé augmente avec la concentration de l'extrait HPF utilisé :  $55.18 \pm 2.30$ ,  $63.71 \pm 0.38$ ,  $69.17 \pm 2.65$  et  $78.14 \pm 2.5\%$  pour des concentrations HPF respectives de 0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/mL.

Le pouvoir antiradicalaire de l'acide ascorbique (antioxydant standard) s'est révélé nettement plus élevé que celui de l'extrait HPF puisqu'à 0.37 mg/mL seulement, presque 60% du DPPH était réduite. Dans ce cas d'antioxydant standard, l'effet dose-dépendant s'illustre avec 1.5 et 3 mg HPF/mL qui ont permis de piéger respectivement  $79.45 \pm 0.31\%$  et  $93.43 \pm 1.32\%$  du DPPH du milieu réactionnel. L'acide ascorbique a donc provoqué une réduction presque complète du DPPH en sa forme non radicalaire DPPH-H.

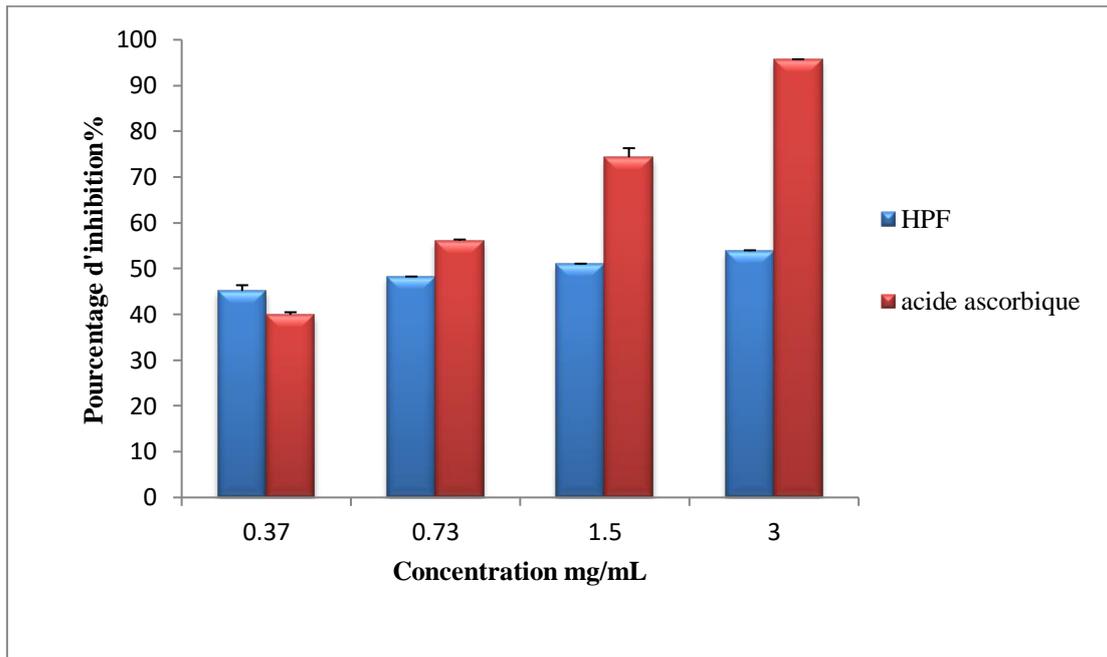


**Figure 31:** Pouvoir antioxydant de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). (p<0.001).

#### III.5.1.2.2. Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)

Dans la présente étude, la tendance des activités de réduction des ions ferriques par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) et l'acide ascorbique est illustrée à la figure 32 où il apparaît que l'augmentation du taux d'inhibition de l'oxydation du fer par l'extrait HPF n'est pas aussi tranchée que celle provoquée par le standard, l'acide ascorbique.

Selon Müller *et al.* (2010) la méthode FRAP est simple, rapide et reproductible. L'activité antioxydante la plus élevée ( $53.86 \pm 1.246\%$ ) exercée par l'extrait HPF a été observée avec 3 mg/mL d'HPF. Le pouvoir réducteur ferrique d'HPF augmente avec la concentration, suggérant une activité dose-dépendante. Ainsi, le pourcentage d'inhibition (PI) de l'oxydation du fer par l'extrait HPF est de l'ordre de  $45.132 \pm 0.14$ ,  $48.24 \pm 0.06$ ,  $51.02 \pm 0.03$  et  $53.86 \pm 1.25\%$  pour des concentrations de 0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/mL respectivement. Par ailleurs, l'acide ascorbique, utilisé à la concentration de 3 mg/mL, inhibe cette oxydation du fer à hauteur de plus de 95%.

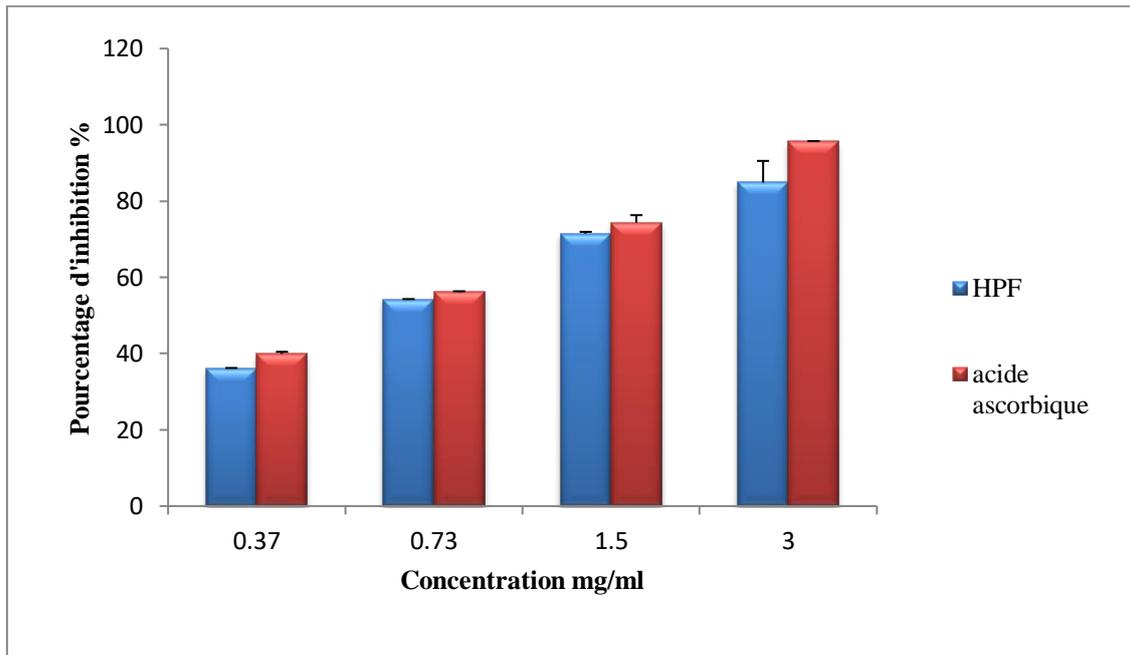


**Figure 32:** Pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). (p<0.001).

### III.5.1.2.3. Activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)

Le radical hydroxyle est fortement oxydant, principalement envers les lipides. La capacité d'un antioxydant à éliminer les radicaux hydroxyles est directement liée à la prévention de la propagation du processus de peroxydation lipidique (Batista *et al.*, 2010). L'antioxydant élimine le radical hydroxyle et inhibe la dégradation du désoxyribose et la formation de couleur qui en résulte (Bektaşoglu *et al.*, 2006).

L'élimination de ces radicaux est d'une grande importance dans les systèmes biologiques pour maintenir la membrane cellulaire intacte. Dans la présente étude, l'HPF de *M. galloprovincialis* a montré une activité très significative de piégeage des radicaux hydroxyles, atteignant un maximum de  $84.86 \pm 5.685\%$  lorsqu'il est utilisé à 3 mg/mL ; tandis que celui de l'acide ascorbique était d'environ de  $95.71 \pm 0.023\%$  (Fig.33).



**Figure 33:** Activité de piégeage des radicaux hydroxyles par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* comparé à celui de l'acide ascorbique comme standard. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n=3). ( $p < 0.001$ ).

Les pourcentages de piégeage des radicaux hydroxyles par l'extrait HPF sont de  $36.12 \pm 0.1$ ,  $54.26 \pm 0.028$ ,  $71.42 \pm 0.52$  et  $84.86 \pm 5.68\%$  pour des concentrations de 0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/mL, respectivement.

L'IC<sub>50</sub> exprime la quantité d'antioxydant requise pour réduire de 50% la concentration du radical libre. Elle est inversement proportionnelle à la capacité antioxydante d'un composé. En effet, plus la valeur de IC<sub>50</sub> est basse, plus l'activité antioxydante est importante (Dung *et al.*, 2008). L'activité antioxydante de l'extrait HPF exprimée en IC<sub>50</sub> a été déterminée graphiquement, et est de l'ordre de 0.27, 1.54 et 0.71 mg/mL pour les tests DPPH, FRAP et radical hydroxyle, respectivement.

Dans l'étude de Sheringham *et al.* (2015), une activité maximale de piégeage du DPPH de 56.77 et 79.77% a été obtenue avec 0.39 mg/mL d'extrait HPF de *Galatea paradoxa* et de *Patella rustica*, respectivement ; tandis qu'une activité minimale de 24.27 et 21.40%, respectivement, a été enregistrée avec 0.003 mg/mL d'extrait HPF pour les mêmes

mollusques. En revanche, une activité maximale (86.77%) et minimale (42.27%) d'inhibition du DPPH a été enregistrée avec 0.39 et 0.003 mg/mL d'acide ascorbique, respectivement.

Selon Zamorano-Apodaca et al. (2020), l'activité de piégeage des radicaux libres DPPH enregistrée de la fraction peptidique avec un poids moléculaire allant de 1 à 5 kDa était de 66%. Les peptides de faible poids moléculaire (MW) pourraient réagir efficacement avec les radicaux libres et inhiber la propagation du cycle de peroxydation lipidique, et par conséquent, ils présentent une activité antioxydante plus élevée (Ranathunga et al., 2006).

En outre, il a été rapporté que l'activité élevée de piégeage des radicaux DPPH des fractions peptidiques est généralement associée à un niveau élevé de teneur en acides aminés hydrophobes (Karoud et al., 2017). Les peptides bioactifs dérivés d'organismes marins font l'objet de recherches actuelles en raison à leurs nombreux bienfaits pour la santé. L'activité antioxydante est l'une des fonctions biologiques les plus importantes des peptides bioactifs. Dai-Hung et Se-Kwon (2013) ont signalé une relation inverse entre l'apport en antioxydants et la maladie.

Niranjan et al. (2005) ont montré que l'activité de piégeage des radicaux libres de la sauce de moules fermentée utilisée à 0.2 mg/mL contre divers radicaux libres était d'environ  $41.3 \pm 0.5$ ,  $40.1 \pm 0.7$  et  $35.4 \pm 0.87$  % contre le superoxyde, l'hydroxyle et le radical carboné, respectivement.

La capacité des peptides purifiés à réduire le fer ferrique  $Fe^{3+}$  en fer ferreux  $Fe^{2+}$  a été utilisée pour évaluer leur pouvoir réducteur, et les valeurs d'absorbance obtenues (0.394 avec 3 mg d'HPF/mL d'extrait et 0.297 avec 0.37 mg d'HPF/mL d'extrait) sont légèrement inférieures à celles rapportées par Zhouyong et al. (2017) (0.441 avec 2 mg/mL de peptides de poids moléculaire inférieur à 3 kDa). Ceci suggère que la purification par chromatographie pourrait améliorer le pouvoir réducteur des fractions peptidiques.

Le mécanisme exact sous-jacent à l'activité antioxydante des peptides n'a pas été entièrement élucidé. Cependant, l'activité antioxydante des peptides est davantage liée à leur composition en acides aminés, leur structure et leur hydrophobicité (Chen et al., 1998). En fonction du processus de formation et des caractéristiques chimiques des radicaux libres, les peptides antioxydants peuvent être des inhibiteurs de la peroxydation lipidique, des piègeurs de radicaux libres ou des chélateurs d'ions de métaux de transition dans les réactions

antioxydantes (Niranjan *et al.*, 2005). Les peptides ayant une activité donneuse d'hydrogène peuvent éliminer les radicaux libres ou inhiber efficacement l'oxydation des lipides ; tandis que ceux ayant une activité de chélation des ions métalliques peuvent diminuer les radicaux libres générés par la catalyse des ions métalliques (RiBang *et al.*, 2015).

L'oxydation est un facteur important dans l'industrie alimentaire car elle entraîne une perte de valeur nutritionnelle, de couleur et de fonctionnalité ; ainsi que des mauvais goûts indésirables et des composés toxiques, qui induisent en outre la détérioration de la nourriture.

En outre, l'accumulation de produits toxiques est dangereuse pour la santé des consommateurs (Sila et Bougatef, 2016, Jang *et al.*, 2016). Par conséquent, l'inhibition de la formation de radicaux libres et les réactions d'oxydation jouent un rôle important dans la prévention ou le retard de l'autoxydation des composants alimentaires (Wattanasiritham *et al.*, 2016).

De nombreux antioxydants de synthèse y compris l'hydroxytoluène butylé (BHT), l'hydroxyanisole butylé (BHA) et les composés tertiaires. butylhydroquinone (TBHQ), sont largement utilisés dans l'industrie alimentaire pour la conservation et le retardement de l'oxydation des lipides (Guo *et al.*, 2015, Chiet *et al.*, 2015). Cependant, les dosages des antioxydants synthétiques sont soumis à une réglementation stricte en raison de leurs risques potentiels pour la santé et leurs effets toxiques (Mirzaei *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). Par conséquent, il y a eu un grand intérêt dans la recherche d'antioxydants sans danger à partir de sources naturelles comme alternative aux antioxydants de synthèse (Nimalaratne *et al.*, 2015).

Au cours des dernières années, des peptides ayant différentes activités, notamment anticancéreux, antioxydant, antimicrobien, des propriétés antihypertensives et de liaison aux minéraux ont été isolées à partir de diverses ressources biologiques, tels que les sous-produits de l'industrie de transformation du poisson (Xing *et al.*, 2016). Les peptides antioxydants ont beaucoup retenu l'attention et ont été largement rapportés en tant que piègeurs de radicaux libres, décomposeurs de peroxyde, inactivateurs de métaux et inhibiteurs d'oxygène pour protéger les aliments et les organismes contre les espèces réactives de l'oxygène (Nimalaratne *et al.*, 2015; Xue *et al.*, 2015).

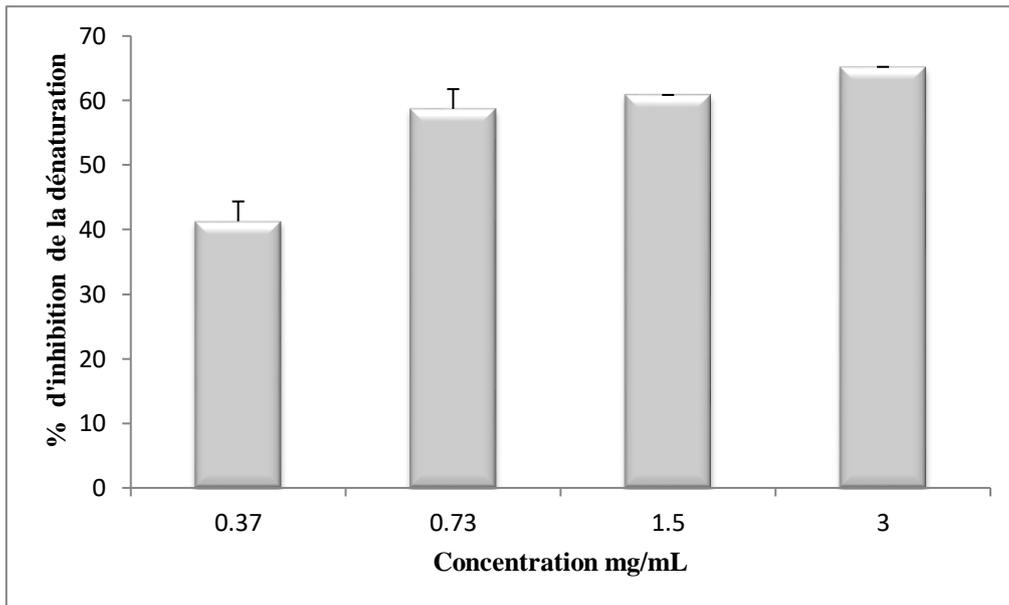
### **III.5.1.3. Activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis***

#### **III.5.1.3.1. Effet inhibiteur de la fraction peptidique (HPF) vis-à-vis de la dénaturation protéique**

L'effet préventif de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* a été étudié en utilisant le test de l'inhibition de la dénaturation de la sérum albumine bovine (BSA). L'HPF présente une bonne protection contre la dénaturation des protéines. La figure 34 indique une augmentation du pourcentage d'inhibition de la dénaturation en fonction des concentrations de la fraction peptidique. Cette tendance semble être dose-dépendante (Pourcentage d'inhibition est dose-dépendant). À la plus faible concentration (0.37 mg/mL), la fraction HPF a présenté un pourcentage d'inhibition de  $41.30 \pm 3.07\%$  ; tandis qu'à la plus grande concentration (3 mg/mL), le pourcentage d'inhibition a atteint  $65.21 \pm 0.00\%$ .

L'inflammation est considérée comme un mécanisme physiologique primaire de défense qui aide l'organisme à se protéger contre différents stimuli. La dénaturation des protéines tissulaires est l'un des sujets les plus documentés en raison de sa relation avec les maladies inflammatoires et arthritiques. Les enzymes lysosomales libérées lors de l'inflammation produisent divers troubles. L'activité cellulaire supplémentaire de ces enzymes est considérée comme liée à une inflammation aiguë ou chronique (Leelaprakash et Mohan Dass, 2011).

L'inflammation est un processus complexe, souvent associé à la douleur et impliquant des phénomènes tels que: une perméabilité vasculaire accrue, une dénaturation accrue des protéines et une altération de la membrane cellulaire (Leelaprakash et Mohan Dass, 2011).



**Figure 34:** Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* sur l'inhibition de la dénaturation protéique. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations ( $n = 3$ ).

La dénaturation des protéines est un processus dans lequel les protéines perdent leur structure tertiaire et leur structure secondaire sous l'effet de stress externe ou d'un composé, tel qu'un acide ou une base forte, un sel inorganique concentré, un solvant organique ou la chaleur. La plupart des protéines biologiques perdent leur fonction biologique lorsqu'elles sont dénaturées. La dénaturation des protéines est une cause bien connue de l'inflammation (Leelaprakash et Mohan Dass, 2011; Ingle et Patel, 2011).

L'inhibition de la dénaturation des protéines a été prise comme mesure de l'activité anti-arthritique in vitro. La production d'auto-antigènes dans certaines maladies arthritiques peut être due à la dénaturation des protéines (Umapathy *et al.*, 2010).

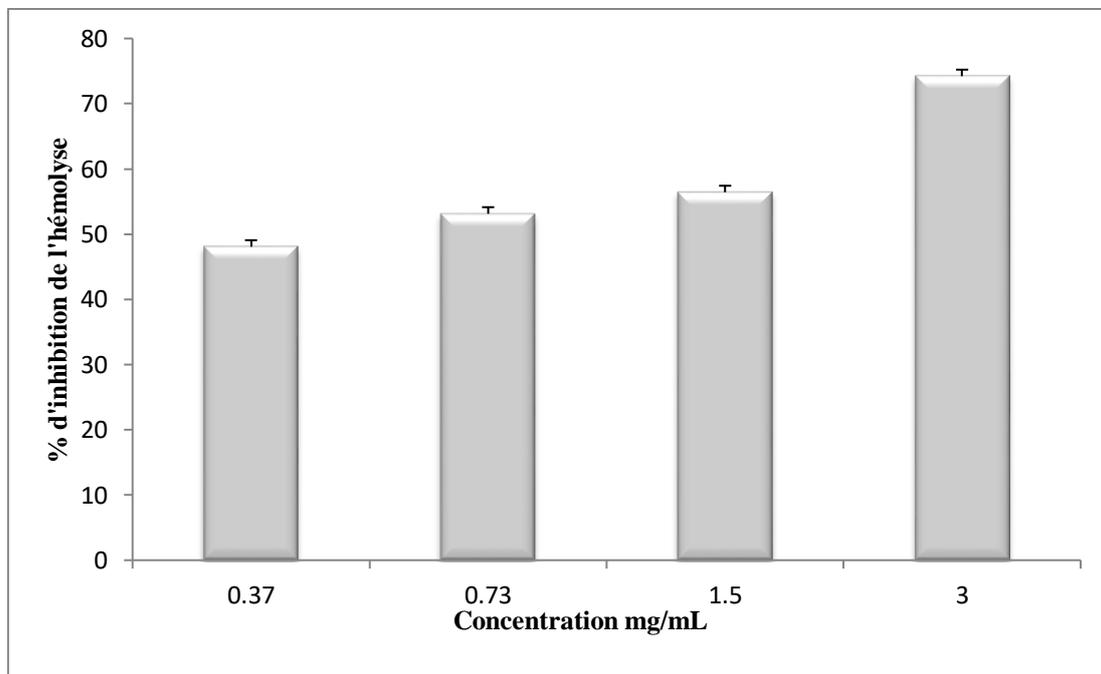
#### **III.5.1.3.2. Effet stabilisateur de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) vis-à-vis de l'hémolyse des hématies (HRBC)**

Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse ou la stabilisation de la membrane érythrocytaire par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* est dose-dépendante en raison de la relation directe entre le niveau de protection et la

concentration de HFP. Le pourcentage d'inhibition de l'hémolyse des érythrocytes par l'HPF est de l'ordre de  $48.07 \pm 0.12$ ,  $53.13 \pm 0.15$ ,  $56.42 \pm 0.16$  et  $74.22 \pm 0.19\%$  respectivement pour les concentrations 0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/mL (Fig. 35).

À la suite d'une réponse inflammatoire, des enzymes lysosomales de neutrophiles activées sont libérées. Ces enzymes peuvent produire divers troubles. La membrane érythrocytaire est analogue à la membrane lysosomale et sa stabilisation implique que l'extrait peut également stabiliser les membranes lysosomales (Leelaprakash et Dass, 2011 ; Shenoy *et al.*, 2010). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) agissent soit en inhibant ces enzymes lysosomales, soit en stabilisant la membrane lysosomale (Vadivu et Lakshmi, 2008).

La membrane cellulaire constitue généralement une première ligne de protection pour la cellule. Ce principe met en évidence les différents intérêts et méthodes d'évaluation des caractéristiques intrinsèques de la membrane : sa stabilité, sa fluidité, sa déformabilité et autres propriétés viscoélastiques. La fragilité osmotique des globules rouges, par exemple, dépend des changements structurels spécifiques que subit leur membrane lorsque la cellule est soumise à un stress osmotique (Mounnissamy *et al.*, 2008).



**Figure 35:** Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* sur d'inhibition de l'hémolyse des hématies. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de 3 déterminations (n = 3).

#### III.5.1.4. Résultats sur la cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis*

L'HPF de *Mytilus galloprovincialis*, utilisé à une concentration de 1000  $\mu\text{M}$ , n'a présenté aucune cytotoxicité contre une lignée cellulaire normale, les kératinocytes cutanés humains (HaCaT) et les lignées cellulaires cancéreuses telles que le carcinome du poumon humain (A549), l'hépatoblastome du foie humain (HepG2), le fibrosarcome humain (HT1080) et la cellule épithéliale pulmonaire de souris exprimant HPV-16 E7 (- CMH classe I), avec une viabilité cellulaire respective de  $88.05 \pm 5.31$ ,  $100.56 \pm 3.27$ ,  $91.33 \pm 0.00$ ,  $127.25 \pm 0.82$  et  $81.64 \pm 2.34\%$ .

La viabilité cellulaire est couramment utilisée en oncologie et en pharmacologie pour déterminer la valeur de la concentration inhibitrice demi-maximale ( $\text{IC}_{50}$ ) d'un composé cytotoxique en culture cellulaire. Ainsi, l' $\text{IC}_{50}$  a été mesurée comme la concentration de peptides capables de réduire de 50% la viabilité cellulaire par rapport aux cellules non traitées. À la concentration de 1000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , une activité immunosuppressive moyenne d'HPF envers la lignée cellulaire de macrophages de souris (préostéoclaste) (RAW264.7) avec une viabilité cellulaire de  $65.53 \pm 2.39\%$ , et une cytotoxicité cancéreuse marginale contre l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS) avec une viabilité cellulaire de  $56.08 \pm 1.48\%$  (tableau 10).

Selon les résultats obtenus, la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) pourrait être généralement considérée comme non toxique pour l'homme, à l'exception d'une cytotoxicité marginale contre la lignée cellulaire de macrophages de souris (RAW264.7) ( $\text{IC}_{50}$   $158 \pm 8.6$   $\mu\text{M}$ ) et d'aucune cytotoxicité spécifique au cancer, sauf une activité anticancéreuse marginale contre l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS) ( $\text{IC}_{50}$   $1054.1 \pm 8.76$   $\mu\text{M}$ ) (tableau 11).

D'après les résultats de [Gerdol et al. \(2015\)](#), les tests MTT ont indiqué que les peptides riches en cystéine (MgCRP-I) de *Mytilus galloprovincialis* n'étaient pas cytotoxiques sur les lignées cellulaires du carcinome colorectal humain (HT-29), du neuroblastome humain (SHSY5Y) et du cancer du sein (MDAMB231) à une concentration de 10 mM.

Malgré les grands progrès réalisés dans le traitement du cancer, il existe actuellement un intérêt considérable pour le développement d'agents anticancéreux dotés d'un nouveau mode d'action en raison du développement de la résistance des cellules cancéreuses aux

médicaments anticancéreux actuels. Un nombre croissant d'études ont montré que certains peptides antimicrobiens (PAMs) cationiques, toxiques pour les bactéries mais pas pour les cellules normales des mammifères, présentent un large spectre d'activité cytotoxique contre les cellules cancéreuses.

Le plasma de la moule *Mytilus galloprovincialis* possède une activité cytotoxique dirigée à la fois contre des cellules de vertébrés (hématies et cellules tumorales de souris) et contre des protozoaires. Les cellules procaryotes (*Escherichia coli* et *Vibrio alginolyticus*) ne sont pas sensibles à l'activité cytotoxique (Hubert *et al.*, 1996).

De telles études ont considérablement accru l'importance des PAMs, tant synthétiques que d'origine naturelle, qui a joué un rôle important à la fois pour une meilleure compréhension du système immunitaire et pour leur potentiel en tant qu'antibiotiques cliniques.

**Tableau 10 :** Cytotoxicité de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* vis-à-vis des kératinocytes épidermiques humains (HaCaT), de la lignée cellulaire de macrophages de souris (RAW264.7, préostéoclastes), de l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS), du carcinome du poumon humain (A549), de l'hépatoblastome du foie humain (HepG2), du fibrosarcome humain (HT1080) des cellules épithéliales de poumon de souris exprimant HPV-16 E7 (TC-1 P3, classe MHC). Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'HPF. L'effet a été mesuré par un test de viabilité cellulaire MTT (% de survie). Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  SEM de trois déterminations.

Cellules	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
HT1080	130.83 $\pm$ 0.98	121.27 $\pm$ 1.14	127.25 $\pm$ 0.82
AGS	99.24 $\pm$ 5.70	85.067 $\pm$ 2.32	56.085 $\pm$ 1.48
HaCaT	99.705 $\pm$ 5.48	96.19 $\pm$ 2.73	88.055 $\pm$ 5.31
HepG2	95.865 $\pm$ 5.15	93.47 $\pm$ 3.29	91.327 $\pm$ 0.00
A549	109.47 $\pm$ 0.5	106.203 $\pm$ 3.84	100.5615 $\pm$ 3.27
TC-1 P3	100.35 $\pm$ 1.38	97.62 $\pm$ 1.21	81.64 $\pm$ 2.34
Raw 264.7	105.47 $\pm$ 8.76	102.11 $\pm$ 0.42	65.53 $\pm$ 2.39

**Tableau 11 :** Concentration inhibitrice de 50% des cellules (IC 50 en  $\mu\text{M}$ ) déterminée sur la base du test MTT.

Composé	IC50 ( $\mu\text{M}$ ) basé sur le test MTT						
	Cellules normales		Cellules cancéreuses				
	HaCaT	RAW264.7	AGS	A549	HepG2	HT1080	TC-1P3
HPF	>1000	158 $\pm$ 8.6	105 $\pm$ 4.1	>1000	>1000	>1000	>1000

Les chercheurs expliquent que l'attraction électrostatique entre les composants chargés négativement des cellules bactériennes et cancéreuses et les PAMs chargés positivement joue un rôle majeur dans la forte liaison et la perturbation sélective des membranes des cellules bactériennes et cancéreuses, respectivement. Cependant, on ne sait pas pourquoi certains peptides de défense de l'hôte sont capables de tuer les cellules cancéreuses ; alors que d'autres ne le font pas. De plus, il n'est pas clair si le ou les mécanismes moléculaires qui sous-tendent les activités antibactériennes et anticancéreuses des PAMs sont identiques ou différents (Hoskin et Ramamoorthy, 2008).

Alemán et al. (2011) ont montré que les hydrolysats de gélatine de calmar géant exerçaient un effet cytotoxique in vitro sur les cellules cancéreuses, avec des valeurs IC<sub>50</sub> de 0.13 et 0.10 mg/mL pour les lignées cellulaires MCF-7 (carcinome du sein humain) et U87 (gliome), respectivement. Les peptides bioactifs étaient différents selon leur espèce, leur composition en acides aminés et leur séquence, et ils peuvent être préparés par différentes méthodes. De plus, certaines méthodes affectent également les activités biologiques des peptides (Agyei et al., 2016).

Il a été rapporté que certains peptides isolés de la viande et des organismes marins, notamment du poisson, présentent une activité anticancéreuse, inhibent la prolifération cellulaire et ont un effet cytotoxique contre les cellules tumorales (Shahidi et Zhong, 2008; Ryan et al., 2011; Najafian et Babji, 2012; Udenigwe et Aluko, 2012).

Par ailleurs, Hsu et al. (2011) ont isolé deux peptides du muscle noir du thon qui a été traité avec deux protéases, la papaïne et la protéase XXII. Les séquences d'acides aminés de ces peptides étaient LPHVLTPEAGAT de l'hydrolysat de papaïne et PTAEGVYMVT de la protéase XXIII et, tous deux présentaient une activité antiproliférative dose-dépendante contre les cellules d'adénocarcinome du sein humain (MCF-7) (Hsu et al., 2011 ; Ryan et al., 2011 ; Udenigwe et Aluko, 2012)

Picot et al. (2006) ont signalé que 18 hydrolysats de protéines isolés du merlan bleu, de la morue, de la plie et du saumon avaient une activité antiproliférative contre 2 lignées cellulaires du cancer du sein humain (MCF-7/6 et MDA-MB-231) (Picot et al., 2006; Shahidi et Zhong, 2008; Ryan et al., 2011). De plus, il a été démontré qu'un peptide hydrophobe isolé de la sauce d'anchois, avec un poids moléculaire de 0.441 KDa, induisait une apoptose dans une lignée cellulaire de lymphome humain (U937) (Lee et al., 2003; Lee et al., 2004; Ryan et al., 2011).

### **III.5.2. Evaluation de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* in vivo chez le rat Wistar : test d'œdème induit par la carragénine**

#### **III.5.2.1. Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) sur l'évolution de l'œdème de la patte de rat Wistar**

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* a été réalisée par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine 1% chez le rat Wistar. Les résultats obtenus sont présentés dans les tableaux 12 et 13.

Les données de tableau 12 indiquent une augmentation progressive du volume de l'œdème plantaire suite à l'injection de carragénine 1%, atteignant 4h après son seuil maximal dans le groupe témoin négatif ( $3.21 \pm 0.006$  mm). Comparés à ce dernier, les deux groupes traités avec les différentes concentrations de la fraction peptidique d'hémolymphe (30 et 60 mg/kg de poids vif), montrent une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'œdème et ce, à partir des 4h ayant suivies l'injection de carragénine. En effet, 6h après induction de l'inflammation, la première concentration d'HPF de 30 mg/kg de poids vif a diminué

l'épaisseur de la patte jusqu'à  $2.63 \pm 0.008$  mm ; tandis que la deuxième concentration d'HPF de 60 mg/kg de poids vif, l'a réduit jusqu'à  $2.5 \pm 0.009$  mm.

Par ailleurs, l'administration du diclofénac (anti-inflammatoire de référence) a prévenu de façon hautement significative ( $p < 0.001$ ), l'évolution de l'inflammation à partir de 3h après injection de carragénine dans le groupe standard ( $2.61 \pm 0.005$  mm) comparé au groupe témoin négatif ( $3.15 \pm 0.01$  mm).

Le tableau 13 et la figure 36 montrent l'effet inhibiteur exercé par la fraction peptidique de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* et le diclofénac sur le développement de l'inflammation en fonction du temps. Il est à noter que le seuil maximal a été atteint au temps 6h après l'injection de carragénine. En effet, les pourcentages d'inhibitions (%) de l'œdème de la patte obtenus avec 30 et 60 mg HPF/Kg de poids vif ont été respectivement de  $28.22 \pm 0.31\%$  et  $42.74 \pm 0.15\%$ . Par comparaison, le diclofénac utilisé à une dose de 20 mg/Kg de poids vif a été plus actif étant donné que le pourcentage d'inhibition était supérieur à  $84.67 \pm 0.028\%$ .

L'injection de carragénine sous le coussinet plantaire provoque une augmentation progressive du volume de l'œdème chez les rats témoins durant les six heures de l'expérimentation. Cependant, l'augmentation du volume de la patte chez les groupes traités par l'HPF a été moins importante par rapport au groupe témoin négatif.

**Tableau 12:** Effet anti-inflammatoire in vivo de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) comparé à celui du standard, le diclofénac, sur l'épaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar après injection de carragénine 1%.

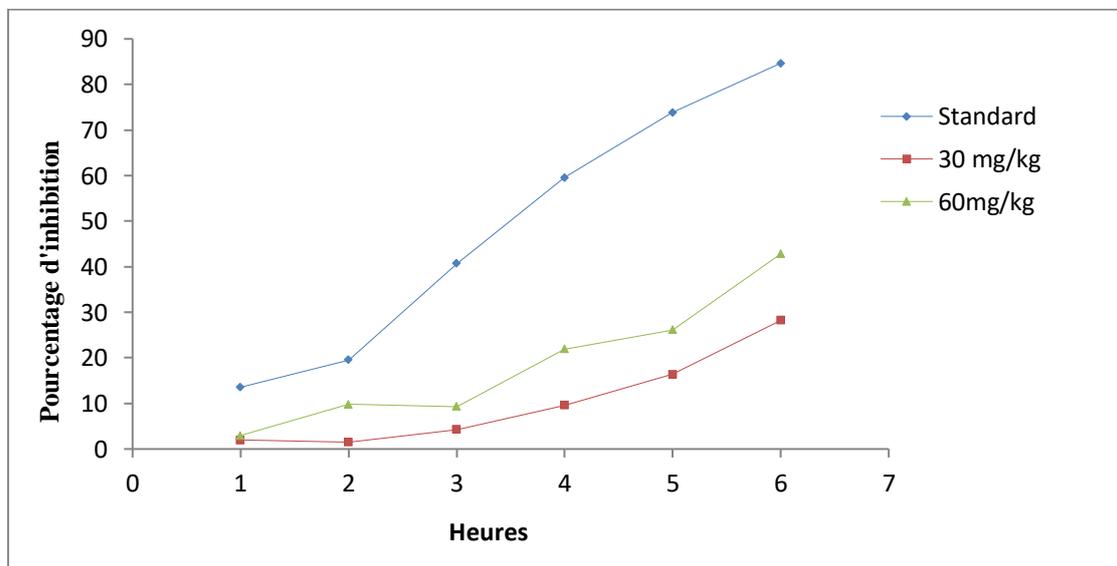
Heure	Epaisseur de l'œdème (mm) de la patte de rat Wistar			
	Témoin négatif (NaCl 0, 9%)	Standard (dichlofenac) (20 mg/Kg)	Fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)	
			30 mg/Kg	60 mg/Kg
0H	1.75 ± 0.011	1.78 ± 0.006	1.74 ± 0.022	1.79 ± 0.034
1H	2.76 ± 0.008	2.74 ± 0.005 <sup>a</sup>	2.73 ± 0.006 <sup>a</sup>	2.77 ± 0.005
2H	3.08 ± 0.008	2.85 ± 0.007 <sup>c</sup>	3.05 ± 0.005 <sup>a</sup>	2.99 ± 0.006 <sup>c</sup>
3H	3.15 ± 0.01	2.61 ± 0.005 <sup>c</sup>	3.08 ± 0.009 <sup>c</sup>	3.06 ± 0.007 <sup>c</sup>
4H	3.21 ± 0.006	2.37 ± 0.009 <sup>c</sup>	3.06 ± 0.005 <sup>c</sup>	2.93 ± 0.000 <sup>c</sup>
5H	3.09 ± 0.009	2.13 ± 0.008 <sup>c</sup>	2.86 ± 0.007 <sup>c</sup>	2.78 ± 0.016 <sup>c</sup>
6H	2.99 ± 0.01	1.97 ± 0.007 <sup>c</sup>	2.63 ± 0.008 <sup>c</sup>	2.5 ± 0.009 <sup>c</sup>

Valeurs exprimées en moyenne ± écart-type (n = 5); Témoin négatif (NaCl 0.9%); Standard: dichlofenac (20 mg/kg). a p < 0.05 ; b p < 0.01 ; c p < 0.001 différences statistiquement significatives en comparaison au groupe témoin négatif.

**Tableau 13:** Pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème de la patte de rat Wistar après injection de carragénine 1% par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) comparé à celui du standard, le diclofénac.

Heure	Le pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème de la patte rat Wistar		
	Standard	Fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF)	
	(20 mg/Kg)	30 mg/Kg	60 mg/Kg
1H	13.86 ± 0,021	1.98 ± 0.056	2.97 ± 0.18
2H	19.54 ± 0.014	1.5 ± 0.42	9.77 ± 0.049
3H	40.71 ± 0.042	4.28 ± 0.03	9.28 ± 0.06
4H	59.58 ± 0.028	9.59 ± 0.014	21.91 ± 0.00
5H	73.88 ± 0.00	16.42 ± 0.00	26.12 ± 0.16
6H	84.67 ± 0.028	28.22 ± 0.31	42.74 ± 0.15

Valeurs exprimées en moyenne ± écart-type (n = 5); Standard: dichlofenac (20 mg/kg).



**Figure 36:** Pourcentage d'inhibition (%) de l'œdème par la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *M. galloprovincialis* utilisée à des concentrations de 30 et 60 mg/Kg de poids vif de rats Wistar mâles ayant reçu de la carragénine 1% comparé à celui du dichlofenac (20 mg/Kg) comme anti-inflammatoire standard.

L'œdème plantaire est l'un des principaux facteurs utilisés pour l'évaluation du degré d'une inflammation aigue et de l'efficacité des nouveaux médicaments anti-inflammatoires (Begum et Sadique, 1988). Son induction par injection de carragénine est utilisé comme modèle expérimental standard (Banerjee *et al.*, 2000).

Ce phénomène se caractérise habituellement par une réponse biphasique. La première phase (1-2h) dépend de la libération de médiateurs chimiques tels que, l'histamine, la sérotonine et la bradykinine. La deuxième phase (3-6h) est soutenue par la libération de prostaglandines, leucotriènes, lysozymes, protéases et oxyde nitrique (NO) (DiRosa *et al.*, 1971; Olajide *et al.*, 1999; Posadas *et al.*, 2004).

Les eicosanoïdes (leucotriènes et prostanoïdes) induisent la biosynthèse d'élastase, collagénase et d'autres composés. Ces enzymes décomposent les protéines structurales en peptides provoquant une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la pression hydrostatique. Cela entraîne par conséquent, la formation d'un œdème et la migration des neutrophiles vers les tissus endommagés (Havsteen, 2002). Ces derniers produisent des radicaux libres dérivés de l'oxygène tels que l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), le radical hydroxyle ( $OH^{\cdot}$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), qui contribuent à la réponse inflammatoire en provoquant des dommages cellulaires (Posadas *et al.*, 2004; Kumar et Kuttan, 2009).

Par ailleurs, les cyclooxygénases-2 (COX-2), enzymes inductibles par les cytokines (facteur de nécrose tumorale alpha  $TNF\alpha$  et interleukines IL-6 et IL-1 $\beta$ ), sont présentes dans les cellules inflammatoires activées et sont connues pour jouer un rôle crucial dans l'inflammation en libérant le médiateur prostanoïde (prostaglandines et thromboxane) (Nussler et Billiar, 1993; Nantel *et al.*, 1999). De même, l'enzyme oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) génère de l'oxyde nitrique (NO) et est considérée comme ayant un rôle central dans les réponses inflammatoires (Fialkow *et al.*, 2007).

Il est reconnu que l'expression du iNOS et des COX-2 est maximale au cours de la deuxième phase (3 – 6h) de l'œdème plantaire (Loram *et al.*, 2007 ; Eddouks *et al.*, 2012). Cette phase est sensible à la majorité des médicaments anti-inflammatoires cliniquement efficaces (Vinegar *et al.*, 1969). Il a été démontré que l'inhibition de la production du NO et des prostaglandines par suppression de l'expression du iNOS et des COX-2 était bénéfique dans le traitement des maladies inflammatoires (Sawatzky *et al.*, 2005).

A travers nos résultats, nous avons constaté que la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de la moule *Mytilus galloprovincialis* des eaux du port de Mostaganem testée à deux différentes concentrations (30 et 60 mg/kg de poids vif) possède un effet anti-inflammatoire considérable, ce qui leur a permis, à partir de 4h, d'inhiber l'inflammation de façon hautement significative comparé au groupe témoin négatif.

Cela laisse penser qu'aux doses administrées, la fraction peptidique aurait empêché la libération des médiateurs pro-inflammatoires de la phase tardive (3 – 6h) en inhibant l'expression des principaux précurseurs (iNOS et COX-2) (Vigo *et al.*, 2004). De plus, de part leurs propriétés antioxydantes, ces derniers auraient également pu agir en inhibant la production des espèces réactives oxygénées (ERO) responsables des lésions cellulaires (Middleton *et al.*, 2000; Preethi *et al.*, 2012).

Par ailleurs, d'après nos recherches, aucune étude n'a été effectuée jusqu'à présent par le test de l'œdème plantaire pour évaluer l'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* ou d'un peptide antimicrobien en général.

### **III.5.2.2. Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* sur les marqueurs de l'inflammation**

#### **III.5.2.2.1. Effet de l'HPF sur la protéine C-réactive (CRPr)**

Le dosage de la protéine C-réactive a été effectué par une technique immunoturbidimétrique automatisée qui a donné les résultats reportés au tableau 14. Six heures après l'injection de carragénine à 1%, la CRPr subit une augmentation chez le groupe témoin négatif (rats non traités par le diclofenac ou l'HPF) avec une valeur de 70 mg/L. Les concentrations de la CRPr enregistrées pour le lot traité par HPF aux deux concentrations 30 et 60 mg/kg de poids vif (52 et 39 mg/L, respectivement), sont bien supérieures à celle du témoin positif (rats traités avec du diclofenac) qui est de 9 mg/L.

La protéine C-réactive (CRP) est une pentraxine rencontrée chez la plupart des vertébrés (souris, rats, homme) et chez les invertébrés comme la limule (*Limulus polyphemus*) (Etlinger et Coe, 1986 ; Nakanishi *et al.*, 1991 ; Shrive *et al.*, 1999). La protéine C-réactive humaine (CRPh) est une protéine de la phase aiguë inflammatoire dont les concentrations

plasmatiques peuvent augmenter jusqu'à 1000 fois suite à des dommages de tissus ou à des infections (Padilla *et al.*, 2003). La CRPh se lie également à la phosphorylcholine que l'on trouve dans les phospholipides membranaires. Parmi les fonctions effectrices exercées par la CRPh lors de la liaison à des ligands, il y a l'activation in vivo et in vitro du complément (Nakanishi *et al.*, 1991; Siegel *et al.*, 1974; Wolbink *et al.*, 1996).

Chez les rats, la CRPr (celle du rat) n'est pas une protéine typique de la phase inflammatoire aiguë en comparaison avec l'haptoglobine sérique et le fibrinogène plasmatique (Giffon *et al.*, 2003). Cependant, contrairement aux humains, les rats ont des concentrations plasmatiques de CRP beaucoup plus élevées, soit environ 300-500 mg/L, ce qui est 100 fois plus élevé que la concentration chez les humains. Contrairement à la CRPh, la CRPr est incapable d'activer le complément malgré une homologie en acide aminés de 70%. Il est aussi important de signaler que la CRPr n'active pas le complément en utilisant le polysaccharide de *Streptococcus pneumoniae* et peut par conséquent l'activer lors de sa liaison avec d'autres ligands (Eldahshan et Azab, 2012).

Quant au groupe de rats traités par l'anti-inflammatoire standard, le dichlofenac, il présente une valeur sensiblement plus diminuée que celle des lots traités par l'HPF. En effet, le taux de CRPr chez les rats du groupe standard (9 mg/L) est inférieur à celui des rats des lots traités par 30 mg/kg (52 mg/L) ou 60 mg d'EPF/Kg de poids vif (39 mg/L).

Ces résultats témoignent de l'effet anti-inflammatoire important de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* des eaux du port de Mostaganem comparativement au lot de rats non traités, mais demeure légèrement inférieur à l'effet anti-phlogogène du diflonenac. Les résultats de la présente étude mettent en évidence la corrélation positive entre la concentration d'HPF et son activité anti-inflammatoire.

Chez toutes les espèces animales étudiées, une augmentation rapide de la concentration de la CRP est constatée dans les heures qui suivent une attaque (Eckersall *et al.*, 1996; Burger *et al.*, 1992). Les cytokines de la réaction inflammatoire (CRI) libérées dans la circulation seront responsables de la réponse systémique de la réaction inflammatoire et de l'augmentation de la concentration plasmatique d'un certain nombre de protéines d'origine hépatique appelées protéines de la réaction inflammatoire positive (PRI+) comme la protéine C Reactive (CRP) (Engler, 1993).

#### **III.5.2.2.2. Effet de l'HPF sur le fibrinogène**

Le dosage du fibrinogène est actuellement utilisé en pratique courante dans les laboratoires d'analyses cliniques pour mettre en évidence les cas d'inflammation. Ainsi, en état inflammatoire (infections, lymphomes, cancers, maladies rhumatoïdes), le taux de fibrinogène peut atteindre 6 à 10 g/L (Baijot, 2006). Le fibrinogène est un marqueur spécifique de l'inflammation chez l'homme mais également chez le rat (Engler, 1993).

Le fibrogène est une protéine plasmatique soluble synthétisée au niveau du foie. Selon une étude menée par Giffen et al. (2003) sur des rats Wistar, l'augmentation du taux de CRP entraîne une augmentation du taux de fibrinogène ; ces auteurs conclent que le fibrinogène est un marqueur très important de l'inflammation. L'augmentation du taux de fibrinogène chez le groupe témoin négatif (8 g/L) est due à l'exposition des rats à une inflammation par la carragénine; tandis que l'HPF réduit l'inflammation (Tableau 14).

#### **III.5.2.2.3. Aspect histologique de la patte de rat Wistar**

Six heures après l'induction de l'inflammation par la carragénine 1%, une étude histologique a été réalisée dans le tissu de la patte et qui est illustrée par la figure 37. Les observations microscopiques lors des examens histopathologiques de pattes des rats nous ont permis de percevoir la réduction de la réponse inflammatoire induite par le traitement à l'HPF et au diclofenac. L'examen microscopique des biopsies de pattes des rats Wistar ayant reçu la carragénine mais non traités (témoin négatif) a montré une accumulation massive de cellules inflammatoires infiltrées (Fig. 37a). En revanche, les biopsies des mêmes rats mais traités avec le diclofénac (standard) ou par l'HPF (30 et 60 mg/kg) ont montré une réduction de la réponse inflammatoire (Fig. 37 b, c et d).

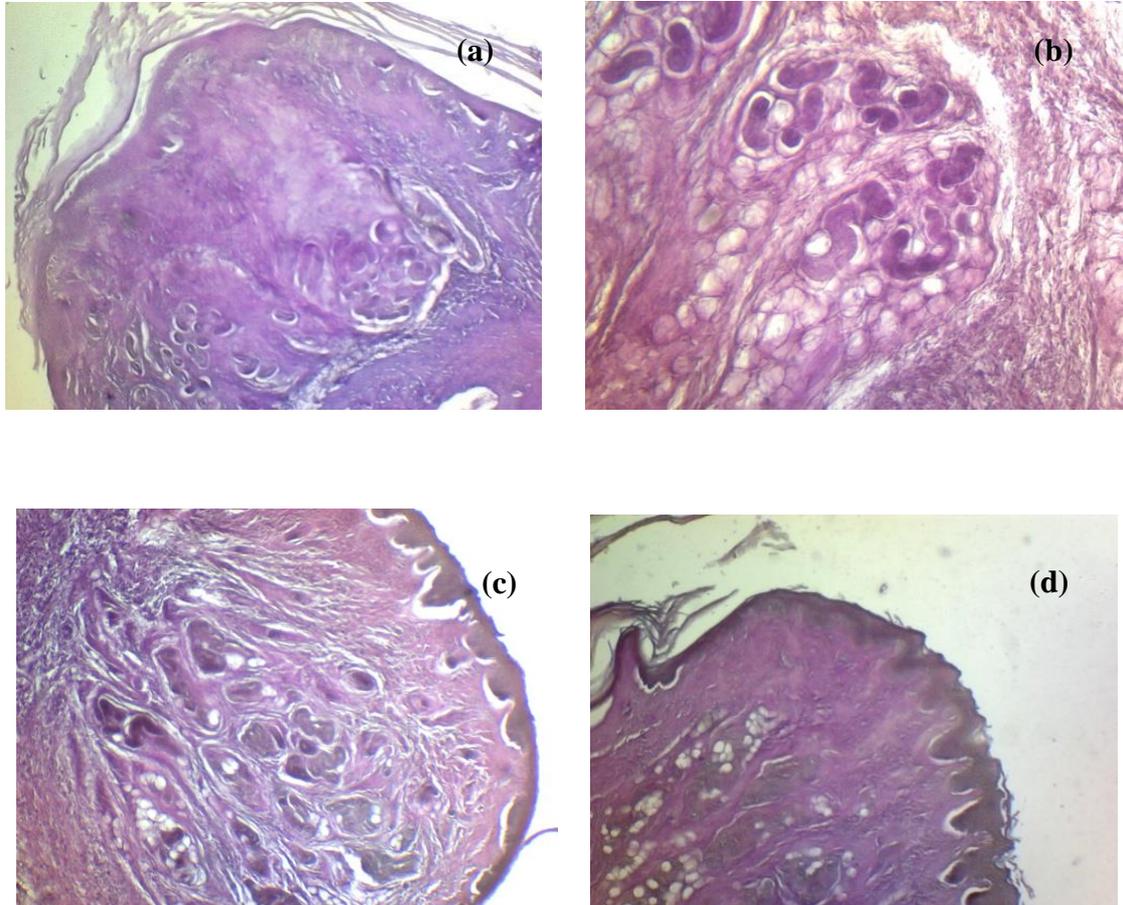
Le nombre de neutrophiles était plus élevé dans les tissus des pattes de rats non traitées que dans ceux des pattes traitées avec l'anti-inflammatoire standard, le diclofénac. La fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* des eaux du port de Mostaganem réduit les neutrophiles dans les tissus enflammés. Selon les résultats de cette étude, l'effet de l'HPF est dose-dépendant.

L'inflammation est une réaction de défense de l'organisme face à diverses attaques qui pouvant être d'origine physique, chimique, biologique (réponse immunitaire) ou infectieuse. Le traitement actuel de l'inflammation utilise des anti-inflammatoires stéroïdiens

(glucocorticoïdes) et non stéroïdiens (AINS) comme l'aspirine. Ces molécules sont efficaces mais leur utilisation prolongée peut provoquer des effets secondaires graves, dont les plus courants sont des hémorragies gastro-intestinales et des ulcères gastroduodénaux (Yamada *et al.* 1987). Il est donc nécessaire de développer de nouveaux agents anti-inflammatoires efficaces avec des effets secondaires minimales.

**Tableau 14:** Effet de la fraction peptidique de l'hémolymphe de *M. galloprovincialis* (30 et 60 mg d'HPF/Kg de poids vif) comparé à celui du standard, le dichlofenac (20 mg/Kg de poids vif), sur les concentrations (mg/L) en protéine C-réactive et (g/L) en fibrinogène chez des rats Wistar ayant reçu de la carragénine 1%.

Groupe de rats expérimentaux	CRP (mg/L)	Fibrinogène (g/L)
Rats témoin négatif (NaCL 0.9%)	70	8
Rats Standard injectés de carragénine 1% et traités au diclofénac (témoin positif)	9	3
Rats injectés de carragénine 1% et traités avec 30 mg/kg d'HPF (échantillon 1)	52	6.5
Rats injectés de carragénine 1% et traités avec 60 mg/kg d'HPF (échantillon 2)	39	4.5



**Figure 37:** Coupes histologiques des pattes de rats enflammées par la carragénine 1% : a- non traitées (témoin négatif), b- traités par dichlofenac (20 mg/Kg) comme anti-inflammatoire standard (témoin positif), c- traités par 30 mg EPF/Kg poids vif (échantillon 1), d- traités par 60 mg EPF/Kg poids vif (échantillon 2).

# Conclusion

## Conclusion

La diversité des organismes vivants du monde marin offre un potentiel important pour la découverte et l'exploitation de substances naturelles bioactives. Au sein de cette biodiversité considérable, les invertébrés marins continuellement exposés aux micro-organismes pathogènes environnants et dotés uniquement d'un système immunitaire primitif, sans mémoire, représentent un réservoir unique de molécules de défense bioactives.

Les peptides antimicrobiens sont des éléments clés du système de défense des invertébrés marins. Leur purification et leur caractérisation présentent un intérêt considérable pour l'identification de nouvelles molécules naturelles, originales d'un point de vue biochimique et efficaces par leur large spectre d'action antimicrobienne.

Cependant, jusqu'à présent, un nombre limité de peptides bioactifs ont été identifiés à partir d'organismes marins, dont la plupart recelant une activité biologique particulière n'ont pas encore été découverts et explorés. Ainsi, les techniques d'exploration, d'isolement et de purification existantes doivent encore être améliorées afin de découvrir davantage de peptides bioactifs marins.

En outre, le problème le plus important est l'application des peptides bioactifs à la santé et à la nutrition humaine, car la plupart des recherches restent au stade de l'expérimentation *in vitro* ou *in vivo* en raison du temps nécessaire et des problèmes de coût. Face au caractère ubiquitaire des peptides antimicrobiens, nous nous sommes attachés à la mise en évidence de telles molécules chez des mollusques bivalves et en l'occurrence la moule *Mytilus galloprovincialis*.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés d'abord aux caractéristiques physico-chimiques des eaux du site de collecte des moules (i.e port de Mostaganem). Les mesures opérées ont montré que l'eau de mer du port de Mostaganem est légèrement alcaline avec un pH égal à  $8.23 \pm 0.32$  et une salinité équivalente à  $37.02 \pm 0.02\%$  de sel. Les valeurs de température suivent un cycle saisonnier, avec  $15.9^{\circ}\text{C}$  en hiver,  $16.8^{\circ}\text{C}$  au printemps,  $21.4^{\circ}\text{C}$  en automne et  $23.2^{\circ}\text{C}$  en été. L'oxygène dissous reste relativement stable durant toutes les saisons et s'affiche à  $7.27 \pm 0.15$  mg/L à l'exception de la période automnale où il chute à  $4.59 \pm 0.31$  mg/L. Les métaux lourds, aluminium (AL), cuivre (Cu), fer (Fe), manganèse (Mn), zinc (Zn), sont présents à des concentrations faibles qui ne dépassent pas la

valeur guide, avec des valeurs respectives de  $0.004 \pm 0.02$ ,  $0.009 \pm 0.001$ ,  $0.098 \pm 0.003$ ,  $0.002 \pm 0.0001$  et  $0.007 \pm 0.003$  ppm, à l'exception du bore (B) présent à une teneur de  $4.704 \pm 0.03$  mg/L. Les résultats de l'indice de condition des moules *Mytilus galloprovincialis*, est de l'ordre de  $30.89 \pm 1.80$ .

Les résultats d'analyse bactériologique de l'eau de mer du port de Mostaganem ont été comparés aux normes fixées par la réglementation algérienne en vue de déterminer le degré de contamination d'une part et sa relation avec la fraction peptidique immunitaire de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* d'autre part. Selon les valeurs enregistrées, les eaux du port de Mostaganem peuvent être considérées comme des eaux de qualité bactériologique moyenne acceptable avec un taux de coliformes totaux de l'ordre de 240 germes/100 mL comme valeur maximale par rapport à la valeur guide qui est de 500 germes/100 mL. La présence des coliformes fécaux sont présents à un niveau élevé de 240 germes/100 mL ; ce qui représente plus que le double de la valeur guide qui est de 100 germes/100 mL. On tien à noter l'absence de streptocoques fécaux, de salmonelles et de vibrion cholérique.

La concentration des protéines dans l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis*, et la fraction éluée à 40% d'acétonitrile sur colonne SPE-C18 atteint une valeur de l'ordre de 1.3 mg/mL et 0.23 mg/mL, respectivement.

La pré-purification de la fraction peptidique de l'hémolymphe sur colonne SPE-C18 et l'éluion par 2 concentrations en acétonitrile (5% et 40%) a permis l'obtention d'éluats protéiques présentant des activités antibactérienne, antioxydante, anti-inflammatoire et de cytotoxicité cancéreuse marginale.

Le test d'activité antimicrobienne a montré que l'HPF de *M. galloprovincialis* inhibait la croissance des souches pathogènes utilisées dans cette expérience. Les diamètres de zone d'inhibition les plus élevés enregistrés par ordre décroissant étaient d'environ  $24.33 \pm 1.15$  mm pour *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,  $15 \pm 0.0$  mm pour *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,  $14.33 \pm 1.15$  mm pour *Escherichia coli* ATCC 10536 et *Enterococcus hirae* ATCC 1059,  $11.33 \pm 1.15$  mm pour *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 et *Shigella dysenteriae* CECT 457, et  $10 \pm 000$  mm pour *Bacillus cereus* ATCC 10420.

Cependant, l'HPF n'a pas réussi à inhiber la croissance de *Micrococcus luteus* ATCC 10420, *Proteus mirabilis* ATCC 13315, *Serratia marcescens* DSM 3012, *Salmonella typhimurium* ATCC 1331, et les deux bactéries bénéfiques, *Bifidobacterium* sp (BbV2) et *Lactobacillus plantarum*. Par ailleurs, l'extrait HPF s'est révélé très efficace pour inhiber la croissance de la souche de champignon *Candida albicans* ATCC 10231, avec une zone d'inhibition de  $20 \pm 0.00$  mm, tout en n'ayant pas réussi à inhiber la croissance des *Aspergillus fumigates* ATCC 106404. Les résultats obtenus ont démontré que l'HPF de l'hémolymphe de *Mytilus galloprovincialis* possède une propriété antimicrobienne.

L'activité antioxydante était dose-dépendante. Les pourcentages d'inhibitions (PI) de l'activité anti-radicalaire de la fraction protéique de l'hémolymphe (HPF) de moule utilisée à une concentration de 3 mg/mL vis-à-vis du DPPH, FRAP, radicaux hydroxyles sont de l'ordre de  $78.14 \pm 2.5$ ,  $53.86 \pm 1.25$  et de  $71.42 \pm 0.52\%$ , respectivement. L'activité antioxydante de l'HPF exprimée en  $IC_{50}$  et déterminée graphiquement a été de l'ordre de 0.27, 1.54 et 0.71 mg/mL pour les tests DPPH, FRAP et radicaux hydroxyles, respectivement.

L'activité anti-inflammatoire de la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) de *Mytilus galloprovansialis* a été évaluée par deux tests in vitro et in vivo. L'effet préventif de l'HPF a été mis en évidence en utilisant le test de l'inhibition de la dénaturation de la sérum albumine bovine (BSA). L'HPF présente une bonne protection contre la dénaturation des protéines. À la plus faible concentration (0.37 mg/mL), la fraction HPF a inhibé la dénaturation de la BSA à hauteur de  $41.30 \pm 3.07\%$  ; tandis qu'à la plus grande concentration (3 mg/mL), le pourcentage d'inhibition a atteint  $65.21 \pm 0.00\%$ .

Pour ce qui est de l'effet protecteur de différentes concentrations (0.37, 0.73, 1.5 et 3 mg/mL) de la fraction peptidique de l'hémolymphe (EPF) vis-à-vis de l'hémolyse des globules rouges, le pourcentage d'inhibition de cette hémolyse par l'HPH est de l'ordre de  $48.07 \pm 0.12$ ,  $53.13 \pm 0.15$ ,  $56.42 \pm 0.16$  et de  $74.22 \pm 0.19\%$  , respectivement.

L'HPF de *Mytilus galloprovincialis*, utilisé à une concentration de 1000  $\mu$ M, n'a exercé aucune cytotoxicité contre une lignée cellulaire normale, des kératinocytes cutanés humains (HaCaT) et des lignées cellulaires cancéreuses telles que le carcinome du poumon humain (A549), l'hépatoblastome du foie humain (HepG2), fibrosarcome humain (HT1080) et cellule épithéliale pulmonaire de souris exprimant HPV-16 E7 (- CMH classe I), avec une viabilité

cellulaire respective de  $88.05 \pm 5.31$ ,  $100.56 \pm 3.27$ ,  $91.33 \pm 0.00$ ,  $127.25 \pm 0.82$  et  $81.64 \pm 2.34\%$ .

Ainsi, l'IC<sub>50</sub> a été mesurée comme la concentration de peptides capables de réduire de 50 % la viabilité cellulaire par rapport aux cellules non traitées. À la concentration de 1000 µM/mL, une activité immunosuppressive moyenne de l'HPF envers la lignée cellulaire de macrophages de souris (préostéoclaste) (RAW264.7) avec une viabilité cellulaire de  $65.53 \pm 2.39\%$ , et une cytotoxicité cancéreuse marginale contre l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS) avec une viabilité cellulaire de  $56.08 \pm 1.48\%$  ont été enregistrées.

Selon ces résultats, la fraction peptidique de l'hémolymphe (HPF) pourrait être généralement considérée comme non toxique pour l'homme, à l'exception d'une cytotoxicité marginale contre la lignée cellulaire de macrophages de souris (RAW264.7) (IC<sub>50</sub> =  $158 \pm 8.6$  µM) et d'aucune cytotoxicité spécifique au cancer, sauf une activité anticancéreuse marginale contre l'adénocarcinome de l'estomac humain (AGS) (IC<sub>50</sub> =  $105.41 \pm 8.76$  µM).

L'évaluation de l'activité anti-inflammatoire in vivo de la fraction peptidique (HPF) de *Mytilus galloprovincialis* a été réalisée par le test de l'œdème plantaire induit par injection de la carragénine à 1% chez le rat Wistar. Les résultats obtenus indiquent une augmentation progressive du volume de l'œdème plantaire suite à l'injection de l'agent phlogogène, la carragénine 1%, atteignant 4h après l'injection son seuil maximal dans le groupe témoin négatif ( $3.21 \pm 0.006$  mm). Les deux groupes traités avec les différentes concentrations de la fraction peptidique de l'hémolymphe (30 et 60 mg/kg poids vif), montrent une diminution hautement significative ( $p < 0.001$ ) de l'œdème et ce, à partir des 4 heures qui ont suivi l'injection. En effet, 6h après induction de l'inflammation, la première concentration d'HPF de 30 mg/kg poids vif a diminué l'épaisseur de la patte jusqu'à  $2.63 \pm 0.008$  mm ; tandis que la deuxième concentration d'HPF de 60 mg/kg poids vif, l'a réduit jusqu'à  $2.5 \pm 0.009$  mm. En effet, les pourcentages d'inhibitions (%) de l'œdème de la patte de rat Wistar obtenus à 30 et 60 mg d'HPF/Kg poids vif d'HPF ont été respectivement de  $28.22 \pm 0.31\%$  et  $42.74 \pm 0.15\%$ . Par comparaison, le diclofénac, à la dose de 20 mg/Kg poids vif, a été plus actif étant donné que le pourcentage d'inhibition était supérieur à  $84.67 \pm 0.028\%$ .

Six heures après l'injection de carragénine à 1%, la CRPr subit une augmentation chez le groupe témoin négatif (rats non traités par diclofenac ou HPF) avec une valeur de 70 mg/L. Les concentrations de la CRPr (52 et 39 mg/L), enregistrées pour les lots traités

respectivement par 30 et 60 mg d'HPF/kg poids vif sont supérieures à celle (9 mg/L) des rats enflammés et traités au dichlofenac (témoin positif).

L'examen microscopique des coupes histologiques de pattes enflammées de rat ont mis en évidence la réduction de la réponse inflammatoire induite par le traitement à l'HPF et au diclofenac. L'examen microscopique des biopsies de pattes des rats Wistar ayant reçu la carragénine mais non traités par l'HPF ou le dichlofenac (témoin négatif) a montré une accumulation massive de cellules inflammatoires infiltrées. En revanche, les biopsies des mêmes rats mais traités avec 20 mg de dichlofenac/Kg poids vif (témoin positif) ou avec 30 et 60 mg d'HPF/kg de poids vif (échantillons 1 et 2) ont montré une réduction de la réponse inflammatoire.

Les perspectives liées à cette thématique sont nombreuses et pressantes. Elles se résument en ce qui suit : En guise de perspectives, il serait intéressant de compléter ce travail par :

- Explorer et définir les conditions d'environnement de vie des moules favorisant la biosynthèse de peptides d'intérêt santé et agro-alimentaire.
- La purification de la fraction peptidique de l'hémolymphe par les techniques de chromatographie liquide comme celles d'exclusion moléculaire, d'échange d'ions, chromatographie d'interactions hydrophobes, HPLC et d'étude structurale par la spectroscopie de masse et la RMN;
- Détermination du poids moléculaire des peptides purifiés ;
- Séquençage des peptides, acides aminés prépondérants, proportion en cystéine, et détermination des fractions bioactives;
- Exploration de la relation composition-structure et fonctionnalité des peptides purifiés
- Etude de la stabilité des peptides dans les conditions industrielles : pH, température.....etc.

# Références bibliographiques

## Références Bibliographiques

-A-

1. **Abada-Boudjema Y., Mouëza M.** (1981). Structure des populations d'une moulière naturelle en baie d'Alger. *Acta Oecol. Oecol. Gener*, 2:183-194.
2. **Adarsh verma M., Ajay K.P., Kavitha D. & Anurag K.B.** (2011). Antidenaturation and antioxidant activities of *Annona cherimola* in vitro. *Int. J. Pharm. Biol. Sci*, 2: 1-6.
3. **Afnor.** (1984). Recommandations aux Auteurs des Articles Scientifiques et Techniques pour la Rédaction de Résumés. Norme AFNOR NF Z 44-004. Paris, France: Association Française de Normalisation.
4. **Agyei D., Ongkudon C.M., Wei C.Y., Chan A.S. & Danquah M.K.** (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioproducts Processing*, 98: 244–256.
5. **Aleman A., Gimenez B., Montero P. & Gomez-Guillen M.** (2011). “Antioxidant activity of several marine skin gelatins”. *LWT-Food Science and Technology*, 44: 407–413.
6. **Allam B. & Paillard C.** (1998). Defense factors in clam extrapallial fluids. *Dis. Aqua. Org*, (33):123-129.
7. **Amiard J.C., Bacheley H., Barillé A.L., Barillé L., Geffard A. & Himery N.** (2004). Temporal changes in nickel and vanadium concentrations and in condition index and metallothionein levels in three species of molluscs following the “Erika” oil spill. *Aquatic Living Resources*, 17: 281-288.
8. **Aminot A. & Kérouel R.** (2004). Hydrologie des écosystèmes marins: paramètres et analyses. Editions Quae. 336p.
9. **Andral B., Galgani F. & Blotiere C.** (2007). MYTILOS and MYTIMED projects: Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean Sea.
10. **Andral B., Stanisiere J.Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F. & Boissery P.** (2004). Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin*, 49(9- 10):704-712.
11. **Andres E. & Dimarcq J.L.** (2007). Peptides antimicrobiens cationiques : de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments : mise à jour. *Médecine et maladies infectieuses*, 37 :194-199.

12. **Anonyme.** (1987). Note du secrétariat générale, conseil de l'Europe. Convention relative à la conservation de la de la vie sauvage et du milieu naturel de l'europe.Strasbourg.1-2 Septembre1987.
13. **Arenas G., Guzmán F., Cárdenas C., Mercado L., Sergio H. & Marshall.** (2009). A novel antifungal peptide designed from the primary structure of a natural antimicrobial peptide purified from *Argopecten purpuratus* hemocytes. *Peptides*, 30:1405-1411.
14. **Atindehou M.** (2012). Caractérisation structurale et biologique de nouveaux agents antibactériens naturels actifs dans les infections intestinales : des peptides de la chromogranine A et des principes actifs de chromolaena odorata, Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, université de Strasbourg: 417.

-B-

15. **Bachelot M.** (2010). Contamination de moules (*Mytilus sp.*) en milieu marin par des substances pharmaceutiques et produits de soin. Thèse d'Université Montpellier 1.
16. **Baijot S.** (2006).Cours de biologie clinique, HENaC, 2005-2006.
17. **Balseiro P., Falcó A., Romero A., Dios S., Martínez-López A., Figueras A., Estepa A. & Novoa B.** (2011). *Mytilus galloprovincialis* Myticin C : A Chemotactic Molecule with Antiviral Activity and Immunoregulatory Properties. PLoS ONE 6, e23140.
18. **Banerjee S., Sur T.P., Mandal S., Das P.C. & Sikdar S.** (2000). Assessment of the anti-inflammatory effects of *Swertia chirata* in acute and chronic experimental models in male albino rats. *Indian J Pharmacol*,32 : 21-24.
19. **Barnabé G. & Barnabé-Quet R.** (1997). Ecologie et aménagement des eaux côtières. Ed. Lavoisier Technique et Documentation, Paris (France). 391p.
20. **Batista I., Ramos C., Coutinho J., Bandarra N.M. & Nunes M.L.** (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18–24.
21. **Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D. & Widdows J.** (1985). The Effects of Stress and Pollution onMarine Animals. New York: Praeger.
22. **Beaumont A. & Cassier P.** (2004). Biologie Animale, Des Protozoaires aux Métazoaires épithélioneuriens, Tome I, Dunod, 1998, Paris : 459.

23. **Beer Lambert.** (1852). “Bestimmung der Absorption des rothen Lichts in farbigen Flüssigkeiten” (Determination of the absorption of red light in colored liquids), *Annalen der Physik und Chemie*, 86: 78–88.
24. **Begum V.H. & Sadique J.** (1988). Long term effect of herbal drug *Withania somnifera* on adjuvant induced arthritis in rats. *Indian J Exp Biol*, 26(11): 877-882.
25. **Bektaşoğlu B., Esin Çelik S., Özyüre M., Güçlü K. & Apak R.** (2006). Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(3): 1194-1200.
26. **Benadda H.** (2019). Evaluation de la contamination métallique (Cu,Zn,Cd,Fe) et microbiologique (Coliformes fécaux, Staphylococcus aureus, Streptocoques fécaux, Salmonella) des oursins et holothuries et du milieu dans différents sites côtiers de. Thèse présentée pour l’obtention du diplôme de doctorat en sciences Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie Filière : Sciences Biologiques Spécialité : Ecologie et Environnement Marin.
27. **Beninger P.G. & Lucas A.** (1984). Seasonal variations in condition reproductive activity, and gross biochemical composition of two species of adult clam reared in a common habitat: *tapes decussates* L. *Jefreys* and *T. philippinarum* (Adams et Reeve. 1850). *J. expl mar. Boil. Eco*, 1(79): 19-37.
28. **Benzie I.F.F. & Strain J.J.** (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytic Biochemistry*, 239: 70-76.
29. **Bierne N., Borsa P., Daguin C., Jollivet D., Viard F., Bonhomme F. & David P.** (2003). Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Molecular Ecology*, 12(2), 447–461.
30. **Biomnis précis de biopathologie d’analyses médicales spécialisées.** (2012). Rédigé par Jonathan Evans, MD. Publié par McKesson Provider Technologies
31. **Blois M.S.** (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181: 1199-1200.
32. **Bouchard P. & Bouchard N.** (2004), La sexualisation précoce des filles peut accroître leur vulnérabilité, *Sisyphé* : 6.
33. **Boukadida Ammar K.** (2018). Etude des réponses de la moule *Mytilus* spp exposée à des stress métallique et thermique durant les stades embryo-larvaires. Thèse présentée

pour obtenir le titre de docteur en Sciences Biologiques et Biotechnologie et Géochimie et Écotoxicologie.

34. **Bowdish D.M., Davidson D.J., Speert D.P. & Hancock R.E.** (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol*, 172:3758-65.
35. **Bradshaw J.P.** (2003). Cationic Antimicrobial Peptides. *Biodrugs*, 17(4):233-240.
36. **Braff D.L., Light G.A., Ellwanger J., Sprock J., & Swerdlow N.R.** (2005). Female schizophrenia patients have prepulse inhibition deficits. *Biol Psychiatry*, 57: 817–820.
37. **Braga F.G., Bouzada M.L.M., Fabri R.L., Matos M.D.O., Moreira F.O., Scio E. & Coimbra E.S.** (2007). Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 396-402.
38. **Brahmachary M., Krishnan S.P.T., Koh J.L.Y., Khan A.M., Seah S.H., Tan T.W., Brusic V. & Bajic V.B.** (2004). ANTIMIC: a database of antimicrobial sequences. *Nucleic Acids Res*, 1: 32.
39. **Brandenburg K., Andrä J., Garidel P. & Gutschmann T.** (2011). Peptide-based treatment of sepsis. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 90: 799-808.
40. **Brand-Williams W., Cuvelier M. E. & Berset C.** (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, (28) : 25-30.
41. **Brhoumi B.** (2014). Biosurveillance de la pollution de la lagune de Bizerte (Tunisie) par l'analyse comparative des niveaux de contamination et de l'écotoxicité des sédiments et du biote. *Ecologie, environnement*. Université de Bordeaux. Français: 350.
42. **Brian-Jaisson F.** (2014). Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie Spécialité : Microbiologie / Biochimie. Université de Toulon.
43. **Brogden K.A., Ackermann M., McCray P.B. & Tack B.F.** (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22: 465-478.
44. **Bugyi F., Turiák L., Drahos L. & Toth G.** (2023). Optimization of reversed phase solid-phase extraction for shotgun proteomics analysis. *J Mass Spectrom*, 58:e4965.

45. **Bulet P., Cociancich S., Dimarcq J.L., Lambers J., Reichhart J.M., Hoffmann D., Hetru C. & Hoffmann J.A.** (1991) Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family., *J. biol. Chem.*,(266) :24520-24525.
46. **Bulet, P., Stocklin, R. & Menin, L.** (2004). Antimicrobial peptide: from invertebrate to vertebrate. *Immunological Reviews*, 198: 169–184.
47. **Burdick M.D., Harris A., Reid C.J., Iwamura T. & Hollingsworth M.A.** (1997). Oligosaccharides expressed on MUC1 by pancreatic and colon tumor cell lines. *J Biol Chem*, 272:24198-24202.
48. **Burger J., Brzorad J. & Gochfeld M.** (1992). Effects of an oil spill on emergence and mortality in fiddler crabs *Uca pugnax*. *Environmental Monitoring and Assessment* 22(2):107–115.

-C-

49. **Cahen D.** (2006). Dossier didactique, moule natures, Muséum des Sciences naturelles.
50. **Canesi L., Gallo G., Gavioli M. & Pruzzo C.** (2002). Bacteria–hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves. *Microscopy research and technique*,(57): 469-476.
51. **Cavallo R.A., Acquaviva M.I. & Stabili L.** (2009). Culturable heterotrophic bacteria in seawater and *Mytilus galloprovincialis* from a Mediterranean area (Northern Ionian Sea – Italy). *Environ. Monit. Assess*, 149: 465–475.
52. **Chakraborty K. & Joy M.** (2020). High-value compounds from the molluscs of marine and estuarine ecosystems as prospective functional food ingredients: An overview. *Food Research International*,137: 109637.
53. **Chan S.C., Yau W.L., Wang W., Smith D.K., Sheu F.S. & Chen H.M.** (1998). Microscopic observations of the different morphological changes caused by anti-bacterial peptides on *Klebsiella pneumoniae* and HL-60 leukemia cells. *J Peptide Sci*, 4:413-425.
54. **Charlet M., Chernysh S., Philippe H., Hétru C., Hoffmann J. & Bulet P.** (1996). Innate immunity. Isolation of several cysteine-rich antimicrobial peptides from the blood of a mollusc, *Mytilus edulis*. *J. Biol.Chem.* (271): 21808-21813.

55. **Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K. & Nokihara K.** (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 49–53.
56. **Cheng T.C.** (1996). Hemocytes: forms and functions. *Maryland sea grant college*, 299-329.
57. **Cheng-Hua L., Jian-Min Z. & Lin-Sheng S.** (2009). A review of advances in research on marine molluscan antimicrobial peptides and their potential application in aquaculture. *Molluscan Research*, 29(1): 17–26.
58. **Chi C.F., Hu F.Y., Wang B., Li, Z.R. & Luo H.Y.** (2015). Influence of amino acid compositions and peptide profiles on antioxidant capacities of two protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) dark muscle. *Mar. Drugs*, 13: 2580–2601.
59. **Chisholm June R.S. & Smith V.J.** (2009). Antibacterial activity in the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *J Marine Biol Assoc U K. Cambridge University Press*, 72(03): 529–37.
60. **Chu F.L.E.** (2000). Defense Mechanisms of Marine Bivalves. *Mar. Biotech*, 1-42.
61. **Chung S.K., Osawa T. & Kawakishi S.** (1997). Hydroxyl radical scavenging effects of species and scavengers from *brown mustard* (*Brassica nigra*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 61: 118-123.
62. **Clauss A.** (1957). “Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des fibrinogens,” *Acta Haematologica*, 17 (4):237–246.
63. **Copin-Montégut G.** (1996). Chimie de l'eau de mer, *In: océanographique*, I. (Ed.), France, 319p.
64. **Coustau C., Renaud F. & Delay B.** (1991). Genetic characterization of the hybridization between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis* on the Atlantic coast of France. *Marine Biology*, 111(1), 87–93.

-D-

65. **Daffre S., Bulet P., Spisni A., ehret-sabatier L., Rodrigues E.G. & Travassos L.R.** (2008). Bioactivenatural peptides. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed). *Studies in Natural Product Chemistry*, (35): 597-691.

66. **Dame R.F.** (1996). Bivalves as components of ecosystem health. In the Ecology of marine bivalves. An Ecosystem Approach, pp.213-226. Ed. by R.F.Dame. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, FA pp254.
67. **David W., Hoskin & Ayyalusamy R.** (2008). Studies on Anticancer Activities of Antimicrobial Peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1778(2): 357–375.
68. **De Yang, Chen Q., Schmidt A.P., Anderson G.M., Wang J.M., Wooters J., Oppenheim J.J. & Chertov O.** (2000). LL37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptorlike 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med*, 192:1069-74.
69. **Defer D., Bourgougnon N. & Fleury Y.** (2009). Screening for antibacterial and antiviral activities in three bivalve and two gastropod marine molluscs. *Aquaculture*, 293:1-7.
70. **Delval C.** (1984). Réactions du flet vis-à-vis des pollutions par les métaux (Cu, Zn, Cd et Pb) sur le littoral de la mer du Nord : détoxification, métallothioneines. Thèse 3eme cycle USTL Lille.172p.
71. **Dennison S. R., Wallace J., Harris F. & Phoenix D. A.** (2005) Amphiphilic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptides and their structure/function relationships. *Proteinand Peptide Letters*, (12): 31-39.
72. **Destoumieux-Garzón D., Rosa R.D., Schmitt P., Barreto C., Vidal-Dupiol J., Mitta G., Gueguen Y. & Bachere E.** (2016). Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 371 : 20150300.
73. **Diamond G., Beckloff., Weinberg A. & Kisich K. O.**(2009). The roles of antimicrobial peptides in innate host defense." *Curr Pharm Des*, **15**(21): 2377-92.
74. **DiRosa M., Giroud J.P. & Willoughby D.A.** (1971). Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Patho*, 104(1): 15-29.
75. **Dobrzynska J., Szachowicz-Petelska B., Sulkowski S. & Figaszewski Z.** (2005). Changes in electric charge and phospholipids composition in human colorectal cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 276:113–119.

76. **Dung N.T., Kim J.M. & Kang S.C.** (2008). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and the ethanol extract of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry buds. *Food and Chemical Toxicology*, 46(12): 3632-3639.

**-E-**

77. **Eckersall P.D., Saini P.K. & McComb C.** (1996). The acute phase response of acid soluble glycoprotein,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 51 (3-4): 377-385.
78. **Eddabra R.** (2011). Evaluation de la contamination bactériologique des eaux usées des stations d'épuration du Grand Agadir: Isolement, caractérisation moléculaire et antibiorésistance des espèces du genre *Vibrio*. Thèse de doctorat en microbiologie. Université Ibn Zohir et Université de Strasbourg, Agadir, p.34- 38.
79. **Eddouks M., Chattopadhyay D. & Zeggwagh N.A.** (2012). Animal models as tools to investigate antidiabetic and anti-inflammatory plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 14: 142087-142087.
80. **El Kadi F.Z., Bénali A.I., Bénali M. & Belbraouet S.** (2014). Effect of Sodium Metabisulphite on Blood Metabolic Statuts of Wistar Rats. *Food Nutr.Sci*, 5: 1529-1537.
81. **Eldahshan O.A. & Azab S.S.** (2012). Anti-inflammatory Effect of Apigenin-7-neohesperidoside (Rhoifolin) in Carrageenin-Induced Rat Oedema Model. *J. Appl. Pharm. Sci*, 02 : 74-79.
82. **Engler R.** (1993). Protéines de la réaction inflammatoire. *Veterinary Research, BioMed Central*, 24 (4):337-343.
83. **Etlinger H.M. & Coe J.E.** (1986). Complement Activation by female protein, the hamster homologue of human C-reactive protein. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol*, 81:189-191.

**-F-**

84. **FAO.** (2014). The state of the world fisheries and aquaculture (Roma: Fisheries and Aquaculture Department), 176.

85. **Fázio O.V.J., Bulet P., Miranda M.T., Daffre S. & Miranda A. (2006).** Structure-activity relationship studies of gomesin: importance of the disulfide bridges for conformation, bioactivities, and serum stability. *Biopolymers*, 84 (2): 205-218.
86. **Fialkow L., Wang Y., Downey G.P. (2007).** Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology & Medicine*, 42(2): 153-164.
87. **Fisher C.D. (1986).** Organizational Socialization: An Integrative View. *Research in Personnel and Human Resources Management*, (4): 101-145.
88. **Fisher W.S. (1988).** Environmental influence on bivalve hemocyte function. In: Fisher, W.S. (Ed.), Disease processes in marine bivalve molluscs. *Am. Fish. Soc. Special Publication*, 225-237.
89. **Fleury Y., Defer D. & Bourgougnon N. (2008).** Antimicrobial peptides and antiviral activities from marine fished or farmed animals, in “Added Value to Fisheries Waste”, J.B. Bergé Ed., Transworld Research Network – Indian publisher. Chapter 8, 163-196.
90. for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by
91. **Fuller G.M., Ritchie D.G. (1982).** A regulatory pathway for fibrinogen biosynthesis involving an indirect feedback loop. *Ann NY Acad Sci*, 389: 308-2.

-G-

92. **Gagniaire B. (2005).** Etude des effets de polluants sur les paramètres hématocytaires de l’huitre creuse, *Crassostrea gigas*-interaction entre environnement, mécanismes de défense et maladies infectieuses. Thèse de doctorat option : Océanologie Biologique et Environnement Marin, pp : 377.
93. **Gerdol M., Puillandre N., De Moro G., Guarnaccia C., Lucafo M., Monica Benincasa M., Zlatev V., Manfrin C., Torboli V., Giulio Giulianini P., Sava G. & Venie Pallavicini A. (2015).** Identification and Characterization of a Novel Family of Cysteine-Rich Peptides (MgCRP-I) from *Mytilus galloprovincialis*. *Genome Biol. Evol*, 7(8): 2203–2219. 17.
94. **Giffen P.S., Turton J., Andrews C.M., Barrett P., Clarke C.J., Fung K.W., Munday M.R., Roman I.F., Smyth R., Walshe K. & York M.J. (2003)** Markers of experimental acute inflammation in the Wistar Han rat with particular reference to haptoglobin and C-reactive protein. *Arch Toxicol*, 77: 392-402.

95. **Ginet R. & Roux A.L.** (1989). Les plans d'organisation du règne animal: manuel de zoologie/R. Ginet, A.L. Roux, Paris : Doin. 2-7040-0491-9.
96. **Gonzalez J.J.A., Hernandez J.R.O., Ibarra O.O., Gomez J.J.U. & Fuentes V.O.** (2007). Poultry by-product meal as a feed supplement in mid-lactation dairy cows. *J. Anim. Vet*, 6: 139-141.
97. **Gosling E.** (1992). Systematics and geographic distribution of *Mytilus*. In: The mussel *Mytilus*: ecology, physiology, genetics and culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science* Ed Amsterdam, Elsevier, Amsterdam, (25): 1-20.
98. **Grassé P.P. & Doumenc D.** (1998). Zoologie Invertébrés. *Masson*, Paris: 296.
99. **Gueguen Y., Romestand B., Fievet J., Schmitt P., Destoumieux-Garzón D., Vandembulcke F., Bulet P. & Bachère E.** (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology*, 46:516-522.
100. **Guo P., Qi Y., Zhu C. & Wang Q.** (2015). Purification and identification of antioxidant peptides from Chinese cherry (*Prunus pseudocerasus* Lindl.) seeds. *J. Funct. Foods*, 19: 394-403.
101. **Guo X., Ford S.E. & Zhang F.** (1999). Molluscan aquaculture in China. *J Shellfish Res*, 18: 19-31.
102. **Haddouchi F., Lazouni H.A., Meziane A. & Benmansour A.** (2009). Etude physicochimique et microbiologique de l'huile essentielle de *Thymus fontanesii* Boiss & Reut. *Afrique Science*, 05 (2) : 246 - 259.

**-H-**

103. **Hancock R.E.W. & Chapple D.S.** (1999). Peptide Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (6):1317-1323.
104. **Hancock R.E.W. & Sahl H.G.** (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnol*, 24(12):1551-7.
105. **Harrison R.G.** (1990). Hybrid zones: windows on evolutionary process. *Oxford. Surv. Evol. Biol*, 7, 69-128.
106. **Havsteen B.H.** (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96(2-3): 167-202.

107. **Hubert F., Noel T. & Roch P.** (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels. *Eur. J. Biochem*, 240: 302–306.
108. **Hilbish T.J., Lima F. P., Brannock P.M., Fly E.K., Rognstad R.L. & Wethey D.S.** (2012). Change and stasis in marine hybrid zones in response to climate warming. *Journal of Biogeography*, 39(4), 676–687.
109. **Hooper C., Day R., Slocombe R., Handlinger J. & Benkendorff K.** (2007). Stress and immune responses in abalone: Limitations in current knowledge and investigative methods based on other models. *Fish and Shellfish Immunology*, 22: 363–379.
110. **Hsu K.C., Li-Chan E.C. & Jao C.L.** (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, 126 (2): 617–622.
111. <http://aps.unmc.edu/AP/main.php>. The Antimicrobial Peptide Database. University of Nebraska at Omaha.
112. **Huang Y.Z., Edwards M.J., Rounis E., Bhatia K.P. & Rothwell J.C.** (2005). Theta burst stimulation of the human motor cortex. *Neuron*, 45(2): 201–6.
113. **Hubert F., Noel T. & Roch P.** (1996). A member of the arthropod defensin family from edible Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *European Journal of Biochemistry*, 240: 302–306.
114. **Hummel H., Amiard-Trique C., Bachelet G., Desprez M., Marchand J., Sylvand B., Amiard J.C, Rybarczyk H., Bogaards R.H, Sinke J., De Wit Y. & De Wolf L .** (1996). Sensitivity to stress of the estuarine bivalve *Macomabalthica* from areas between the Netherlands and its southern limits (Gironde). *J Sea Res*, 35(Suppl 4):315-321.
115. **Hyotylanen T., Karels A. & Oikari A.** (2002). Assessment of bioavailability and effects of chemicals due to remediation actions with caging mussels (*Anodonta anatina*) at a creosote-contaminated lake sediment site. *Water Res*, 36: 4497– 4504.

-I-

116. **Ingle Pravin V. & Patel Devang M.** (2011). C- Reactive Protein in various disease condition. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 4: 9-13.

**-J-**

- 117. Jang H.L., Liceaga A.M. & Yoon K.Y.** (2016). Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. *J. Funct. Foods*, 20: 433–442.
- 118. Je J.Y., Park P.J., Byun H.G., Jung W.K. & Kim S.K.** (2005). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilusedulis*. *Bioresour. Technol*, 96: 1624-1629.
- 119. Jensen M.A., Coetzer M., Vant Wout A.B., Morris L. & Mullins J.I.** (2006). A reliable phenotype predictor for human immunodeficiency virus type 1 subtype C based on envelope V3 sequences. *Journal of virology*, (80):4698-704.
- 120. Jeyasanta K.I., Sathish N., Patterson J. & Edward J.K.P.** (2020). Macro-, meso- and microplastic debris in the beaches of Tuticorin district, Southeast coast of India. *Mar Pollut. Bull*, 154 : 111055.
- 121. Journal officiel de la république Algérienne.** (1993).N° 46, 14 juillet 1993, reprise par le décret exécutif n° 93-164 du 10 juillet 1993.
- 122. Jung W.K. & Kim S.K.** (2009). Isolation and characterisation of an anticoagulant oligopeptide from blue mussel. *Mytilusedulis. Food Chem*, 117: 687- 692.
- 123. Jung WK, Qian ZJ, Lee SH, Su YC, Nak JS, Byun HG and Kim SK.** 2007. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytiluscoruscus*. *J. Med. Food.*, 10 :197-202.
- 124. Jurd R.D.** (2000). Instant notes in animal biology. *Scientific Publisher*.

**-K-**

- 125. Kadri Skander E.** (2015). Qualité bactériologique des eaux du littoral Nord Est Algérien. Thèse Présentée en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat es sciences en Sciences de la Mer. Université Badji Mokhtar-Annaba
- 126. Kamel N.** (2014). Effets combinés des facteurs environnementaux et des polluants chimiques chez la moule *Mytilus galloprovincialis* : Harmonisation des biomarqueurs d'exposition suivant les recommandations OSPAR et MEDPOL. THÈSE de doctorat, Discipline : Environnement, Spécialité : Ecotoxicologie

127. Karadag A., Ozcelik B. & Saner S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2 (1):41-60.
128. Karagözler A., Erdag B. & Calmaz Emek Y. (2008). Antioxidant activity and proline content of leaf extracts from *Dorystoechas hastate*. *Food Chemistry*, 111(2), 400-407.
129. Karoud W., Sila A., Krichen F., Martinez-Alvarez O. & Bougatef A. (2017). Characterization, surface properties and biological activities of protein hydrolysates obtained from Hake (*Merluccius merluccius*) heads. *Waste and Biomass Valorization*, 10 (2): 287-297.
130. Khabbal Y., Ait El Cadi M., Alaoui K., Faouzi M.G.A. & Cherrah Y. (2006). Activité antiinflammatoire de *Zygophyllum goetulum*. *Phytothér*, 5: 227-229.
131. Khelil F.Z. (2007). Evaluation de la contamination de l'eau de mer et d'un mollusque la moule, *Mytilus galloprovincialis* (Lmck, 1819) Pêché du port d'Oran. Magister en Sciences de l'Environnement, Université d'Oran, Al, pp: 182.
132. Kim E.K., Kim Y.S., Hwang J.W., Lee J.S., Moon S.H., Jeon B.T. & Park P.J. (2013). Purification and characterization of a novel anticancer peptide derived from *Ruditapes philippinarum*. *Process Biochemistry*, 48 (7): 1086-1090.
133. Kim Y.S., Ahn C.B. & Je J.Y. (2016). Anti-inflammatory action of high molecular weight *Mytilus edulis* hydrolysates fraction in LPS induced RAW264.7 macrophage via NF- $\kappa$ B and MAPK pathways. *Food Chem*, 202: 9-14.
134. Koczulla R., von Degenfeld G. & Kupatt C. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*, 111:1665-1672.
135. Koenig G. (2003). L'organisation dans une perspective interactionniste in :Vidaill et B.(coord.). *op. cit*, 15-34.
136. Kumar P.P. & Kuttan G. (2009). *Vernonia cinerea* L. scavenges free radicals and regulates nitric oxide and proinflammatory cytokines profile in carrageenan induced paw edema model. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 31(1): 3.94-102.
137. Kyoung Kang H., Ho Lee H., Ho Seo C. & Park Y. (2019). Antimicrobial and Immunomodulatory Properties and Applications of Marine-Derived Proteins and Peptides. *Mar. Drugs*, 17: 350.

-L-

- 138. Lai Y. & Gallo R.L.** (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends in immunology*, 3: 131-141.
- 139. Lamarck J.B.D.** (1819). Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. *Belin, Paris*, 6, 343.
- 140. Langdon C.J. & Newell R.I.E.** (1990). Utilization of detritus and bacteria as food sources by two bivalve suspension feeders, the oyster *Crassostrea virginica* and the mussel *Geukensia demissa*. *Mar.Ecol.Prog.Ser*,58:299-310.
- 141. Lanhers M.C., Fleurentin J., Rolland A., Vinche A.** (1992). Activité anti-inflammatoire d'un extrait de *Peumus boldus* Molina (*Monimiaceae*). *Phytotherapy*, 38-39, 12-13.
- 142. Leelaprakash G. & Mohan Dass S.** (2011). In vitro anti-inflammatory activity of methanol extract of *Ennicostema Axillare*. *Int. J. Drug Develop. & Res*,3: 189-196.
- 143. Lesne J., Baleux B., Bousaid A. & Hassani L.** (1991). Dynamics of non O1 *Vibrio cholerae* in experimental sewage stabilization ponds under arid Mediterranean climate. *Water Sci.Technology*, 22:387-390.
- 144. Levy O.** (2004). Antimicrobial Proteins and Peptides: Anti-Infective Molecules of Mammalian Leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, (76): 909-925.
- 145. Linnaeus C.** (1758). *Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata. Holmiae [ Stockholm]: L. Salvii, 824 pp.
- 146. Lipmann F., Gevers W., Kleinkauf H. & Roskoski Jr R.** (1971). Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology*, 35: 1-34.
- 147. Loram L.C., Fuller A., Fick L.G., Cartmell T., Poole S. & Mitchell D.** (2007). Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *Journal of Pain*, 8(2): 127-136.
- 148. Louisot P.** (1983). Catabolisme des protéines et métabolisme des amino-acides. I: Biochimie générale et médicale, structurale, métabolique sémiologique. *Villeurbane, Simep*, 702-750.
- 149. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. & Randall R.J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Che*, 193(1):265-75.

- 150. Lubet P. & Aloui N.** (1987). Limites létales thermiques et action de la température sur la gagamétogénèse et l'activité neurosécrétoire chez la moule (*Mytilus edulis et Mytilus galloprovincialis*, Mollusques bivalves. *Haliotis*, (16): 309-316.
- 151. Lubet P. & Delongcamp D.** (1969). Etude des variations annuelles des constituants Lipidiques chez *Mytilus Edulis L.* à Luc sur Mer. *C.r. Soc. Biol*, (163): 1110-1112.
- 152. Lubet P.** (1959). Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectindés. *Rev., Trav. Inst. Pêches Marit*, 23(4): 548.
- 153. Lubet P.** (1973). Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (LmK., 1819). *Synop.F.A.O. Pêche*, 88.

**-M-**

- 154. Maataoui B.S., Hmyene A. & Hilali S.** (2006). Activités anti-radicalaires d'extraits de jus de fruits dufiguier de barbarie (*Opuntia ficus indica*). *Lebanese Science Journal*,7(1): 3-8.
- 155. MAERH.** (2003). Ministère de l'Agriculture, de l'Environnement et des Ressources Hydrauliques. Etude sur la dépollution industrielle dans le bassin versant du lac de Bizerte. Etude réalisée par le groupement de bureaux d'études COMETE-Engineering et IHE pour le compte du MAERH.
- 156. Marrack J.R. & Richards C.B.** (1971). Light scattering studies of the formation aggregates in mixture of antigen and antibody. *J. immunol*, 20: 1019-1040.
- 157. Marshall S.H. & Arenas G.** (2003). Antimicrobial peptides: a natural alternative to chemical antibiotics and a potential for applied biotechnology. *Electronic J. Biotechnol*,6: 271-284.
- 158. Martin M. C., Zwingelstein G. & Jouanneteau J.** (1970). Composition des lipides de différents tissus de *Mytilus galloprovincialis*. *Ann. Inst. Michel Pacha*, (2): 27-35.
- 159. McDonald P., Henderson A.R. & Heron S.J.E.** (1991). *The biochemistry of silage*. Chalcombe Publications, London.
- 160. Medjour, A.** (2014) .Etude comparative des caractéristiques physico-chimiques du lait collecté à partir de chamelles (*Camelus dromedarius*) conduites selon deux systèmes d'élevage (extensif et semi-intensif), thèse Magister en Biologie, université Mohammed Khider, Biskra : 16.

161. Meerloo van J., Kaspers G.J. & Cloos J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 731: 237-245.
162. Middleton E.J., Kandaswami C. & Theoharides T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharm Rev*, 52 (4): 673 751.
163. Mirzaei M., Mirdamadi S., Ehsani M.R., Aminlari M. & Hosseini E. (2015). Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate. *J. Funct. Foods*, 19: 259–268.
164. Mitta G., Hubert F. & Roch P. (2000c). Mytilin B and MGD2, two antimicrobial peptides of marine mussels: gene structure and expression analysis. *Developmental & Comparative Immunology*, 24: 381–393.
165. Mitta G., Hubert F., Noel T. & Roch P. (1999a). Myticin, a novel cysteine-rich antimicrobial peptide isolated from haemocytes and plasma of the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Eur. J. Biochem*, (265) : 71–78.
166. Mitta G., Vandenbulcke F. & Roch P. (2000d). Original involvement of antimicrobial peptides in mussel innate immunity. *FEBS Letters*, 486:185–190.
167. Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F. & Roch P. (1999b): Mussel defensins are synthesised and processed in granulocytes then released into plasma after bacterial challenge. *J. Cell Sci*, (112) : 4233- 4242.
168. Mitta G., Vandenbulcke F., Hubert F., Salzet M. & Roch P. (2000). Involvement of Mytilins in Mussel Antimicrobial Defense. *Journal of biological chemistry*, 275 (17): 12954–12962.
169. Mizushima Y. & Kobayashi M. (1968). Interaction of anti-inflammatory drugs with serum preteins, especially with some biologically active proteins. *J of Pharma Pharmacol*, 20:169- 173
170. Modassir Y. & Ansari A. (2000). Effect of petroleum hydrocarbon on physiological and biochemical parameters in an estuarine clam (*Paphia malabarica*). *Fichery Technology*, 37; 40-45.
171. Molyneux P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarinn J. Sci. Technol*, 26 : 211-219.
172. Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P. & Davidson D.J. (2020). Antimicrobial host defence peptides: functions and clinical potential, *Nat. Rev. Drug Discov*, 19 (5):311–332.

- 173. Moreira R., Romero A., Rey-Campos M., Pereiro P., Rosani U., Novoa B & Figueras A.** (2020). Stimulation of *Mytilus galloprovincialis* Hemocytes With Different Immune Challenges Induces Differential Transcriptomic, miRNomic, and Functional Responses. *Frontiers in Immunology*, 11: 606102.
- 174. Mounnissamy V.M., Kavimani S., Balu V. & Drlin Q.S.** (2008). Evaluation of anti-inflammatory and membrane stabilizing properties of ethanol extract of *Canjera rehedi*. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 6: 235-237.
- 175. Müller L., Gnoyke S., Popken A.M. & Böhm V.** (2010). Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations LWT. *Food Sci. Technol*, 43 (6): 992-999.
- N-
- 176. Naciri M.** (1998). Dynamique d'une population de moules, *Mytilus galloprovincialis* (Lmk.), vivant sur la côte atlantique marocaine. *Bull. Inst. Sci., Rabat*, (21): 43-50.
- 177. Najafi A.L. & Babji A.S.** (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33(1):178–185.
- 178. Nakanishi Y., Kodama H., Murai T., Mikami T. & Izawa H.** (1991). Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *Am. J. Vet. Res*, 52: 397-401.
- 179. Nantel F., Denis D., Gordon R., Northey A., Cirino M., Metters K.M. & Chan C.C.** (1999). Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. *British Journal of Pharmacology*, 128(4): 853-859.
- 180. Narbonne J.F., Aarab N., Clérandeau C., Daubéze M., Narbonne J., Champeau O. & Garrigues P.** (2005). Scale of classification based on biochemical markers in mussels: application to pollution monitoring in Mediterranean coasts and temporal trends. *Biomarkers*, (10): 58-71.
- 181. NCCLS.** (2001). Quality Control Values for Veterinary-Use Fluoroquinolones. *J Clin Microbiol*, 39(4): 1680–1681.
- 182. Nimalaratne C., Bandara N. & Wu J.** (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. *Food Chem*, 188: 467–472.

- 183. Niranjan R., Eresha M., Won-Kyo J., Jae-Young J. & Se-Kwon K.** (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Research International*, 38: 175–182.
- 184. Nielsen F.H.** (2014). Update on human health effects of boron. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(4): 383-387.
- 185. Nussler A.K. & Billiar T.R.** (1993). Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *Journal of Leukocyte Biology*, 54(2): 171-178.

**-O-**

- 186. O.M.S.** (1983). Détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par le test des tubes multiples. N° 5. Rev.1.
- 187. Olajide O.A., Makinde M.J. & Awe S.O.** (1999). Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *J Ethnopharmacol*, 66 (1): 113-117.
- 188. Otero-González A.J., Magalhães B.S., Garcia-Villarino M., López-Abarrategui C., Sousa D.A, Dias S.C. & Franco O.L.** (2010). Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *FASEB J*, 24:1320-1334.
- 189. Oyedepo O.O. & Femurewa A.J.** (1995). Anti-protease and membrane stabilizing activities of extracts of *Fagra zanthoxiloides*, *Olox subscorpioides* and *Tetrapleura tetraptera*. *Int J of Pharmacology*, 33: 65-69.

**-P-**

- 190. Padilla J., Leung E. & Phipps R.P.** (2003). Human B lymphocytes and B lymphomas express PPAR-gamma and are killed by PPAR-gamma agonists. *Clin. Immunol*, 103:22–33.
- 191. Pagliassotti M.J., Davis S.N. & Cherrington A.D.** (1994). The role of the liver in maintaining glucose homeostasis: Austin R.G. Landes Company.
- 192. Pampanin D.M., Volpato E., Marangon I. & Nasi C.** (2005). Physiological measurements from native and transplanted mussel (*Mytilus galloprovincialis*) in the canals of Venice. Survival in air and condition index. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140: 41-52.

- 193. Panayotova V., Merdzhanova A., Dobрева D.A., Bratoeva K. & Makedonski L.** (2020). Nutritional composition, bioactive compounds and health-beneficial properties of black sea shellfish. *Journal of IMAB - Annual Proceeding. Scientific Papers*, 26 : 3.
- 194. Pelmont, J.** (1995). *Enzymes catalyseurs du monde vivant*. Press universitaire de Grenoble Pp. 7; 621; 652-654.
- 195. Pereiro P., Moreira R., Novoa B. & Figueras A.** (2021). Differential Expression of Long Non-Coding RNA (lncRNA) in Mediterranean Mussel (*Mytilus galloprovincialis*) Hemocytes under Immune Stimuli. *Genes*, 12:1393.
- 196. Peteiro L.G., Babarro J.M.F., Labarta U. & Fernandez-Reiriz M.J.** (2003). Growth of *Mytilus galloprovincialis* after the Prestige oil spill. *ICES Journal of Marine Science*, 63:1005-1013.
- 197. Pfaller M.A., Messer S.A., Karlsson A. & Bolmström A.** (1998). Evaluation of the Etest method for determining fluconazole susceptibilities of 402 clinical yeast isolates by using three different agar media. *J Clin Microbiol*, 36(9):2586-9.
- 198. Pinta M. collaborateurs,** (1979). *Spectrométrie d'absorption atomique. Applications à l'analyse chimique*. Tome 1, 2ème Ed., Masson-ORSTOM, Paris, 259 p.
- 199. Posadas L., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L. & Cirino G.** (2004) Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 331-338.
- 200. Posadas L., Bucci M., Roviezzo F., Rossi A., Parente L., Sautebin L. & Cirino G.** (2004). Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142(2): 331-338.
- 201. Preethi K., Premasudha P. & Keerthana K.** (2012). Anti-inflammatory activity of *Muntingia calabura* fruits. *Pharmacognosy Journal*, 4(30): 51-56.
- 202. Prior R.L., Wu X. & Schaich K.** (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

-Q-

- 203. Qin C.L., Huang W., Zhou S., Wang X.C., Liu H.H., Fan M., Wang R.X., Gao P. & Liao Z.** (2014). Characterization of a novel antimicrobial peptide with chitin-binding domain from *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2):362-370.
- 204. Queensley E., Grace O. & Omolaja O.** (2019). Peptide profile and free radical scavenging activity of the low molecular weight peptide fraction from whole body extracts of *Tympanotonus fuscatus var radula* (Linnaeus) and *Pachymelania aurita* (Muller). *Int. J. Biol. Chem. Sci*, 13(4): 2275-2285.

-R-

- 205. Ranathunga S., Rajapakse N. & Kim S.K.** (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology*, 222(3-4): 310-315.
- 206. Ratheesh M., Shyni G.L., Sindhu G. & Helen A.** (2009). Protective Effects of Isolated Polyphenolic and Alkaloid Fractions of *Ruta graveolens* L. on Acute and Chronic Models of Inflammation. *Inflamm*, 33: 18- 24.
- 207. Rouane Hacene O.** (2013). Biosurveillance de la qualité des eaux côtières du littoral occidental algérien, par le suivi des indices biologiques, de la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux lourds (Zn, Cu, Pb et Cd) chez la moule *Mytilus galloprovincialis* et l'oursin *Paracentrotus lividus*. Thèse, Doctorat en biologie, Sciences de l'environnement. Université d'Oran faculté des sciences, département de biologie.
- 208. RiBang W., CuiLing W., Dan L., Xing-Hao Y., JiaFeng H., Jiang Z., Binqiang L., HaiLun H. & Hao L.** (2015). Overview of Antioxidant Peptides Derived from Marine Resources: The Sources, Characteristic, Purification, and Evaluation Methods. *Appl Biochem Biotechnol*, 176: 1815–1833.
- 209. Ritchie R.F.** (1967). A simple direct and sensitive technique of the measurement of scientific proteins in cerebrospinal fluid. *J. lab. Clin. Med*, 70: 512-517.
- 210. Robledo J.A.F., Santa&m M.M. & GonzBlez A.P.** (1995). Figueras Seasonal variations in the biochemical composition of the serum of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. and its relationship to the reproductive cycle and parasitic load. *Aquaculture*, 133: 311-322.

- 211. Rodier J.** (1975). *An Analysis of Water, Natural Water, Waste Water, Sea Water: Chemistry, Bacteriology, Biology*. Dunod.
- 212. Rodier J.** (1978). "L'analyse de l'eau: eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer; chimie, physico-chimie, bactériologie, biologie", *Dunod Tech, Paris*, 1135 : 913-919.
- 213. Rodier J.** (1984). *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer*. Edition Dunod Paris. AFNOR NF VO8-010 et ISO 6887-1.
- 214. Rodier J.** (1996). *L'analyse de l'eau: Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer, Ed. Dunod, 8ème Edition, Paris, Dunod, pp.1394*.
- 215. Rodier J.** (2005). *L'Analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer*. 8eme édition. Paris. 1384 p.pp747.
- 216. Romestand B., Molina F., Richard V. & Roch P.** (2003). Key role of the loop connecting the beta strands of mussel defensin in its antimicrobial activity. *European Journal of Biochemistry*, 270: 2805-2813.
- 217. RRNO.** (2006). *Surveillance du milieu marin. Travaux du réseau national d'observation de la qualité du milieu marin. Rapport DEL/PC, RA708, Ifremer: 76*.
- 218. Ryan J.T., Ross R.P., Bolton D., Fitzgerald G.F., Stanton C.** (2011). Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients*, 3(9): 765–791.

-S-

- 219. Sakat S., Juvekar A.R. & Gambhire M.N.** (2010). In vitro antioxidant and anti-inflammatory activity of methanol extract of *Oxalis corniculata* Linn. *International Journal of Pharma and Pharmacological Sciences*, 2(1):146-155.
- 220. Salazar M.H. & Salazar S.M.** (1991). Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research*, 32: 131-150.
- 221. Santa M.M., Figueras A.J., Robledo J.A.F. & Caldas J.R.** (1992). Variation of the defence mechanisms in two groups of mussels, *Mytilus galloprovincialis* Lmk. Seasonal and environmental effects-preliminary results. *Aquaculture*, 107: 185-188.
- 222. Sathyan N., Chaithanya E.R., Anil Kumar P.R., Sruthy K.S. & Philip R.** (2014). Comparison of the antimicrobial potential of the crude peptides from various groups of marine molluscs. *Int J Res Marine Sci*, 3(2): 16-22.
- 223. Sato H. & Feix J.B.** (2008). Lysine-Enriched Cecropin-Mellitin Antimicrobial Peptides with Enhanced Selectivity. *Antimicrob. Agents Chemother*, 52: 4463-4465.

224. Sawatzky D.A., Megson I.L. & Rossi A.G. (2005). Sildenafil offers protection against NSAID-induced gastric injury. *The British Journal of Pharmacology*, 146(4): 447- 478.
225. Schikorski D., Cuvillier-Hot V., Leippe M., Boidin-Wichlacz C., Slomianny C. & Macagno E. (2008). Microbial challenge promotes the regenerative process of the injured central nervous system of the medicinal leech by inducing the synthesis of antimicrobial peptides in neurons and microglia. *J. Immunol*, 181(2): 1083-1095.
226. Schröder J.M. & Harder J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, (63):469–486.
227. Shahidi F. & Zhong Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4): 914–931.
228. Shenoy S., Shwetha K., Prabhu K., Maradi R., Bairy K.L. & Shanbhag T. (2010). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Tephrosia purpurea* in rats. *Asian Pac. J. Trop. Med*, 3: 193-5.
229. Sheringham B.L., Darko G., Ocansey E. & Ankomah E. (2015). Antimicrobial and antioxidant properties of the crude peptide extracts of *Galatea paradoxa* and *Patella rustica*. SpringerPlus, 4: 500.
230. Shooshtarizadeh S., Safavi M., Mahmoodi M. & Yarmohammadian M.H. (2010). Self-directed learning readiness and learning styles among nursing students of esfahan medical university. *Journal of Education in Medical Sciences*, 27-36.
231. Shrive A.K., Metcalfe A.M., Cartwright J.R. & Greenhough T.J. (1999). C-reactive protein and SAP-like pentraxin are both present in *Limulus polyphemus* haemolymph: crystal structure of Limulus SAP. *J. Mol. Biol*, 290: 997- 1008.
232. Siegle J., Rent R. & Gewurz H. (1974). Interaction of C-reactive protein with the complement system. I. Protamin-induced consumption of complement in acute phase sera. *J. Exp. Med*, 140: 631-647.
233. Sila A. & Bougatef A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods*, 21: 10–26.
234. Sinha M., Kaushik S., Kaur P., Sharma S. & Singh T.P. (2013). Antimicrobial Lactoferrin Peptides: The Hidden Players in the Protective Function of a Multifunctional Protein. *International Journal of Peptides*, 1-12.

- 235. Skibinski D.O.F., Beardmore J.A. & Cross T.F.** (1983). Aspects of the population genetics of *Mytilus* (*Mytilidae*; Mollusca) in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*, 19(2), 137–183.
- 236. Solanki H.K., Dushyant A.S., Pankaj M.M. & Chirag A.P.** (2015). Evaluation of anti-inflammatory activity of probiotic on carrageenan-induced paw edema in Wistar rats. *Int. J. Biol. Macromol*, 72: 1277–1282.
- 237. Songy P. & Avezard J.** (1963). Documents pour l'étude des invertébrés (non Arthropodes). Cours de sciences naturelles. Classique Hachette, p : 84.
- 238. Soto M., Ireland M.P. & Marigómez I.** (2000). Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in "Mussel-Watch" programmes. *Science of the Total Environment*, 247: 175-187.
- 239. Srinivas B., Sarin M.M. & Sarma V.V.S.S.** (2011). Atmospheric dry deposition of inorganic and 992 organic nitrogen to the Bay of Bengal: Impact of continental outflow, *Mar. Chem.*, 127(1–4):170–179.
- 240. Steinstraesser L., Kraneburg U., Jacobsen F. & Al-Benna S.** (2008). Host defense peptides and their antimicrobial-immunomodulatory duality. *Immunobiology*.
- 241. Strömngren T.** (1982). Effect of heavy metals (Zn, Hg, Cu, Cd, Pb, Ni) on the length growth of *Mytilus edulis*. *Marine Biology*, 72: 69-72.

-T-

- 242. Tani S., Kawaguchi T., Kato M., Kobayashi T., Tsukagoshi N.** (2000). A novel nuclear factor SREB binds to a cisacting element SRE, required for inducible expression of the *Aspergillus oryzae* Taka-amylase A Gene in *A. nidulans* *Mol. Gen. Genet*, 263: 232-238
- 243. Tasiemski A., Schikorski D., Le Marrec-Croq F., Pontoire-Van Camp C., Boidin Wichlacz C. & Sautière P.E.** (2007). Hedistin: a novel antimicrobial peptide containing bromotryptophan constitutively expressed in the NK cells-like of the marine annelid, *Nereis diversicolor*. *Dev. Comp. Immunol*, 31: 749–762.
- 244. Tsankova G., Todorova T., Ermenlieva N., Merdzhanova A., Panayotova V., Dobрева D. & Peytcheva K.** (2012). Antibacterial activity of different extracts of black mussel (*mytilus galloprovincialis*) from the black sea, BULGARIA. *Journal of IMAB*, 27: 1.

- 245. Turgeon D.D., Quinn J.F., Bogan A.E., Coane V., Hochberg F.G. & Lyon W.G.** (1998). Noms communs et scientifiques des invertébrés aquatiques des Etats-Unis et du Canada : Mollusque, 2ème ED. Publication spéciale 26 de Société Américaine de pêche. Société Américaine de pêche. Bethesda, Le maryland, Etats-Unis. 526, ISBN: 1-888569-01-8.

-U-

- 246. Udenigwe C.C. & Aluko, R.E.** (2012). Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Food Science*, 77(1):R11–R24.
- 247. Umopathy E., Ndebia E.J., Meeme A., Adam B., Menziwa P., Nkeh-Chungag B.N. & Iputo J.E.** (2010). An experimental evaluation of *Albuca setosa* aqueous extract on membrane stabilization, protein denaturation and white blood cell migration during acute inflammation. *J. Med. Plant. Res*, 4: 789-795.

-V-

- 248. Vadivu R. & Lakshmi K.S.** (2008). *In vitro* and *In vivo* anti-inflammatory activity of leaves of *Symplocos cochinchinensis* (Lour) Moore ssp laurina. *Bangladesh J. Pharmacol*, 3: 121-124.
- 249. Vasudevan M., Gunnam K.K., Parle M.** (2006). Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Daucus carota* seeds extract. *Journal of Health Science*, 52(5):598-606.
- 250. Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., & al.** (2011). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, 12: 69.
- 251. Venier P., Varotto L., Rosani U., Millino C., Celegato B., Bernante F., Lanfranchi G., Novoa B., Roch P., Figueras A. & Pallavicini A.** (2001). Insights into the innate immunity of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*. *BMC Genomics*, 12:69.
- 252. Vigo E., Cepeda A., Gualillo O. & Pérez-Fernandez R.** (2004). *In-vitro* anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages. *J Pharm Pharmacol*, 56(2): 257-263.

**253. Vinegar R., Schreiber W. & Hugo R.** (1969). Biphasic development of carrageenin edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 166(1): 96-103.

-W-

**254. Wang B., Gong Y.D., Li Z.R., Yu D., Chi C.F. & Ma J.Y.** (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelus griseus*) muscle. *J. Funct. Foods*, 6: 176–185.

**255. Wang B., Li L., Chi C.F., Ma J.H., Hong-Yu L. & Yin-feng X.** (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 138 (2013): 1713–1719.

**256. Wattanasiritham L., Theerakulkait C., Wickramasekara S., Maier C.S. & Stevens J.F.** (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chem*, 192: 156–162.

**257. Weiss E. A.** (2002). *Spice Crops*, CABI Publishing International, New York, pp. 411.

**258. Wiesner J. & Vilcinskis A.** (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence*, 1(5):440-64.

**259. Wolbink G.J., Brouwer M.C., Buysmann S., Ten Berge I.J. & Hack C.E.** (1996). CRP-mediated activation of complement in vivo; assessment by measuring circulating complement –C- reactive protein complexes. *J. Immunol*, 157: 473-479.

-X-

**260. Xing L., Hu Y., Hu H., Ge Q., Zhou G. & Zhang W.** (2016). Purification and identification of antioxidative peptides from dry-cured Xuanwei ham. *Food Chem*, 194: 951–958.

**261. Xue Z., Wen H., Zhai L., Yu Y., Li Y., Yu W., Cheng A., Wang C. & Kou X.** (2015). Antioxidant activity and anti-proliferative effect of a bioactive peptide from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Food Res. Int*, 77: 75–81.

-Y-

262. Yamaguchi T., Takamura H., Matoba T. & Terao J. (1998). HPLC method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl. *Biosci Biotech Biochem*, 62:1201–1204.
263. Yamshchikov A.V., Kurbatova E.V., Kumari M., Blumberg H.M., Ziegler T.R., Ray S.M. & Tangpricha V. (2010). Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. *Am J Clin Nut. Sep*, 92(3):603-11.
264. Yang L., Harroun T.A., Weiss T.M., Ding L. & Huang H.W. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? a case study on melittin pores. *Biophys. J*, 81 (3):1475–1485.
265. Yang, Y., Mitta G., Chavanieu A., Calas B., Sanchez J. & Roch P. (2000). Solution structure and activity of the synthetic fourdisulfide bond Mediterranean Mussel defensin (MGD-1). *Biochemistry*, 39: 14436–14447.
266. Yoganandam G., Prakash K., Ilango O., Sucharita D. (2010). Evaluation of Anti-inflammatory and Membrane Stabilizing Properties of various extracts of *Punica granatum* L.(Lythraceae). *Int.J. PharmTech. Research*, 2: 1060-1063.
267. Yoon W.H., Park H.D., Lim K. & Hwang B.D. (1996). Effect of O-glycosylated mucin on invasion and metastasis of HM7 human colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 222:694-699.
268. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I. & Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Search life-sciences literature*, 318(5858):1917-1920.

-Z-

269. Zamorano-Apodaca J.C., Garcia-Sifuentes C.O., Carvajal-Millan E., Vallejo-Galland B., Scheuren-Acevedo S.M. & Lugo-Sanchez M.E. (2020). Biological and functional properties of peptide fractions obtained from collagen hydrolysate derived from mixed by-products of different fish. *Food Chemistry*, 331: 127350.

- 270. Zhang H., Zhang T., Kong J., Luo K. & Chang, Y.** (2009). Effects of earthworm and housefly larva on growth and white spot syndrome virus anti-infection of *Fenneropenaeus chinensis*. *J. Fisheries China*, 33 (3): 503-510.
- 271. Zhang H.B., Jin L.L. & Wang Q.Y.** (2011). Activities of antimicrobial peptides and the reconstruction of the natural antimicrobial peptides. *Chem. Life*, 31 (2): 227-232.
- 272. Zheng W., Yaoyao H., Xiaolan L., Qiuping Z., Renjin D., Hong R., Wenjing H., Xinduo W., Hongwei G. & Dan Z.** (2023). Design, synthesis and anticancer evaluation of polymethoxy aurones as potential cell cycle inhibitors. *Journal Pre-proof* e21054.

# Annexes

**Annexe n°1**

**Tableau :** Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (Eau).

Nombre de tubes positifs	Nombre de germes/100ml	Nombre de tubes positifs	Nombre de germes/100ml
001	3	300	23
010	3	301	39
100	4	302	64
101	7	310	43
110	7	311	75
111	11	312	120
120	11	320	93
200	9	321	150
201	14	322	210
210	15	330	240
211	20	331	460
220	21	332	1100
221	28	333	>2400

## Annexe n°2

### Modèle de Fiche d'échantillonnage de la moule *Mytilus galloprovincialis*



Département de Biologie - Faculté des Sciences de la nature et de la vie

Université de Mostaganem

Responsable: Pr.

RIAZI. A



Référence station	Site :	Code :
Coordonnées		
Latitude :		Longitude :
Etat du temps	Ensoleill <input type="checkbox"/> Peu nuageux <input type="checkbox"/> Très nuageux <input type="checkbox"/> Pluvieux <input type="checkbox"/>	
	Type de nuage :	Précipitations :
	Direction du vent :	Vitesse du vent :
Etat de la mer	Très calme    Calme    Peu agitée    Agitée    Très agitée	
	Houle Direction : Hauteur : Période :	Courants Direction : Vitesse :
Paramètres physico-chimiques & biologiques	Température (°) :	pH :
	Salinité (‰) :	O <sub>2</sub> dissous (mg/l ; %) :
Références de l'échantillon	Nature :	Espèce :
	Date du prélèvement :	Heure du prélèvement :
	Profondeur (hauteur d'eau) :	Nature du substrat :

### **Annexe n°3**

#### **solution de Lowry**

Solution A (500ml): 2.86g NaOH, 14.31g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;

Solution B (100ml): 1.4g CuSO<sub>4</sub>.5(H<sub>2</sub>O);

Solution C (100ml): 2.85g Na<sub>2</sub>Tartrate.2(H<sub>2</sub>O).

Solution de Lowry (0.7ml/echantillon)= Solution A+Solution B+Solution C avec le rapport (V/V) de 100:1:1.

### **Annexe n° 4**

#### **Milieux de culture**

La composition des milieux de culture ci-après, est calculée pour un litre de milieu de culture. Tous les milieux préparés (bouillons ou gélosés) sont autoclavés à 121°C/15min.

#### **Mueller Hinton gélosé (MH) (g/l)**

Extrait deviande.....	3 g
Hydrolysat acidedecaséine.....	17,5 g
Amidon... ..	1.5g
Agar... ..	16 g

pH = 7,3

#### **Mueller Hinton semi solide (MH) (g/l)**

Extrait deviande.....	3 g
Hydrolysat acidedecaséine... ..	17,5 g
Amidon... ..	1.5 g
Agar.....	8 g

pH = 7,3

**Potato Dextrose Agar (PDA) (g/l)**

Filtrat de pommedeterre.....	200 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	20 g

pH = 5,6

**Sabouraud additionné de chloramphénicol gélosé (g/l)**

Peptone.....	10 g
Glucose .....	20 g
Agar .....	15 g
Chloramphénicol... ..	0.5 g

pH = 6

**Bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB)**

Peptone.....	10.0 g
Lactose.....	10.0 g
Bile.....	20.0 ml
Vert brillant.....	13,0 mg

pH = 7,4

**Eau peptonée exempte d'indole**

Peptone.....	10 g
Tryptone.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g

PH=7.2

**Rothe : S/C**

Peptone.....	20,0 g
Glucose.....	5,0 g
Azide.....	0,2 g

NaCl.....	5,0 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	2,7 g
Dihydrogénophosphate de potassium.....	2,7 g
PH = 6, 8	

### **Litsky**

Peptone .....	20.0 g
Glucose.....	5.0 g
Azide.....	0.2 g
Ethyl-violet .....	0.5 g
NaCl.....	5.0 g
Hydrogénophosphate de potassium.....	2.7 g
Dihydrogénophosphate de potassium .....	2.7 g
pH= 6.8	

### **Eau peptonée tamponnée**

Peptone.....	10,00 g
Chlorure de sodium .....	5,00 g
Phosphate disodique anhydre.....	3,57 g
Phosphate monopotassique anhydre.....	1,50 g
pH 7.0 ± 0.2.	

### **SFB (bouillon sélénite-fèces)**

Peptone.....	5g
Tryptone.....	5g
Manitol.....	4g
Phosphate disodique.....	4g
pH = 7±0.2	

Ajouter au moment d'emploi l'additif SFB en respectant les quantité (1 additif pour un tube de 10ml S/C.

### **Héktoen**

Protéose-peptone.....	12,0 g
Extrait de levure : facteur de croissance.....	3,0 g
Lactose : critère de différenciation.....	12,0 g
Saccharose : critère de différenciation.....	12,0 g
Salicine : critère de différenciation.....	2,0 g
Citrate de fer III et d'ammonium révélateur d'H <sub>2</sub> S.....	1,5 g
Sels biliaires : inhibiteur.....	9,0 g
Fuchsine acide : inhibiteur.....	0,1 g
Bleu de bromothymol : indicateur de pH.....	0,065 g
Chlorure de sodium : maintien de la pression osmotique.....	5,0 g
Thiosulfate de sodium : précurseur d'H <sub>2</sub> S.....	5,0 g
Agar.....	14,0 g

pH = 7,5 ± 0,2

### **Eau peptonée alcaline**

Peptone exempte d'indole.....	10,0 g
Chlorure de sodium .....	5,0 g

pH = 7,2

### **Gélose Nutritive Alcaline Biliée (GNAB)**

Peptone de viande.....	10g
Xtrait de viande .....	3g
Chlorure de sodium.....	5g
Bile de bœuf desséchée .....	2g
Agar .....	18g

PH= 8